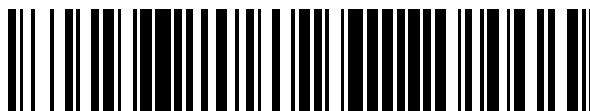


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 577**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

C07K 16/20 (2006.01)

C07K 14/445 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2008** **PCT/GB2008/001262**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2008** **WO08122811**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2008** **E 08736933 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017** **EP 2176418**

54 Título: **Vectores adenovirales que codifican un patógeno o antígeno tumoral**

30 Prioridad:

10.04.2007 GB 0706914

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2017

73 Titular/es:

OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED
(100.0%)
Buxton Court, 3 West Way, Botley
Oxford OX2 0JB, GB

72 Inventor/es:

DRAPER, SIMON;
REYES, ARTURO;
SRIDHAR, SARANYA;
HILL, ADRIAN;
GILBERT, SARAH y
GOODMAN, ANNA

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 638 577 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vectores adenovirales que codifican un patógeno o antígeno tumoral

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevas composiciones de vectores adenovirales inmunogénica y a su uso en inmunización.

10 Antecedentes

Se ha demostrado que la vacunación es uno de los medios más eficaces para prevenir enfermedades, en particular enfermedades infecciosas. La mayoría de las vacunas funcionan induciendo anticuerpos que protegen contra la infección por el patógeno relevante. Sin embargo, muchas nuevas vacunas tienen como objetivo el brazo celular del sistema inmunológico y funcionan induciendo células T efectoras y de memoria. Estas pueden estar dirigidas a patógenos intracelulares y tumores. Se están desarrollando muchas nuevas vacunas inductoras de células T que pueden usarse profilácticamente o terapéuticamente.

Las células T inducidas por vacunación pueden ser útiles de diversas maneras. Además de reducir el riesgo de enfermedades en los vacunados, pueden utilizarse en protocolos de transferencia adoptivos para reducir el riesgo de infección o enfermedad en aquellos que reciben estas células. También pueden ser útiles en el diagnóstico.

Un método cada vez más utilizado para inducir una respuesta inmune es clonar un antígeno o epítipo de interés en un vector. Los vectores pueden ser plásmidos, bacterianos o virales. Las vacunas de ADN plasmídico están bajo intenso desarrollo y diversos vectores virales parecen ser útiles para la vacunación. Estos incluyen poxvirus, tales como el virus de la vacuna modificado Ankara (MVA), vectores de la viruela aviar, tales como la viruela aviar y la viruela del canario y ALVAC, vectores del herpesvirus (incluyendo herpes simple y CMV), alfavirus y adenovirus. Existe un interés creciente en el uso de adenovirus como vectores de vacunas debido a su capacidad para inducir fuertes respuestas celulares y de anticuerpos.

Las enfermedades que pueden ser el objetivo de vectores de adenovirus mejorados incluyen, pero no se limitan a, paludismo, tuberculosis, VIH/SIDA, VHC, VHB, VHS, HPV, CMV, enfermedades causadas por bacterias encapsuladas tales como neumococo, enfermedades parasitarias tales como leishmaniasis y Una amplia gama de tumores y cánceres, tales como linfomas, leucemias, melanoma, cánceres renales, de mama, de pulmón, de próstata, pancreático y colorrectal.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de los inventores de que en vacunas de vectores adenovirales que aumentan la longitud del promotor heterólogo que controla la expresión del antígeno de interés aumenta la inmunogenicidad del vector adenoviral y la eficacia protectora.

Los adenovirus forman la familia *Adenoviridae* y se clasifican en cinco géneros (1). Aisladas por primera vez en 1953 del tejido adenoide humano extraído durante una amigdalectomía (2), se ha descrito un gran número de especies que son infecciosas para los seres humanos y una amplia gama de animales. Todos los adenovirus tienen una partícula icosaédrica similar al virión de tamaño mediano (60-90 nm), no envuelta, con una cápside proteica (240 hexones y 12 pentones) que encierra un genoma de ADN de doble hebra de -34-43 kbp dentro del núcleo (3). Hasta ahora se han descrito cincuenta y un serotipos de adenovirus humano (AdHu), basándose en estudios serológicos de respuestas de anticuerpos neutralizantes cruzados a la proteína hexónica y el botón terminal de la fibra pentónica. Estos serotipos se han agrupado además en seis subgrupos o especies (A-F) dentro del género *Mastadenovirus*, basado en el análisis filogenético y su reacción de hemaglutinación (1). Los adenovirus muestran un amplio tropismo con la mayoría de los serotipos humanos, incluyendo el ampliamente estudiado AdHu5 (subgrupo C), uniéndose inicialmente al receptor del adenovirus Coxsackie (CAR) (4), seguido de internalización del virión tras la interacción de los motivos Arg-Gly-Asp (RGD) en la base pentónica con las integrinas $\alpha_v\beta_3$ - o $\alpha_v\beta_5$ (5). CAR se expresa ampliamente en muchos tipos celulares, pero solo en las células dendríticas (CD) lo hace a niveles bajos. Algunos virus dentro del subgrupo B no se unen al CAR. AdHu35, por ejemplo, se une a la proteína reguladora del complemento, proteína del cofactor de membrana (MCP/CD46) (6), mientras que AdHu3 se une a las moléculas coestimuladoras CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2) expresadas por las APC (7). Algunos serotipos son ubicuos e infectan a la mayoría de los niños durante la lactancia, tales como AdHu1, 2 y 5, causando infecciones agudas leves de las vías respiratorias superiores. Otros, sin embargo, pueden conducir a infecciones graves e incluso mortales, tales como neumonía (AdHu3 y 7), especialmente en individuos inmunocomprometidos (8) y niños (9).

Inicialmente, los adenovirus se desarrollaron como vehículos para terapia génica. Los intentos de reemplazar los genes faltantes o defectuosos mediante transferencia génica adenoviral fueron en gran medida infructuosos tanto en animales experimentales como en voluntarios humanos debido a respuestas inmunes innatas y adaptativas inducidas por los antígenos adenovirales (3). Sin embargo, la demostración por parte de los terapeutas génicos de la

inducción de potentes respuestas inmunitarias celulares y humorales específicas del transgén inició el uso de estos virus como vectores de la vacuna con resultados altamente satisfactorios demostrados primero usando una glicoproteína recombinante del virus de la rabia (10). El genoma adenoviral está bien caracterizado y comparativamente fácil de manipular (11, 12). La delección de regiones cruciales del genoma viral, tal como E1, Hace
 5 que los vectores tengan una replicación defectuosa, lo que aumenta su previsibilidad y elimina efectos secundarios patogénicos no deseados. Los adenovirus con replicación defectuosa pueden crecer hasta un título elevado en cultivo tisular, utilizando líneas celulares que proporcionan los productos del gen E1 esenciales que faltan en *trans* (13). Pueden aplicarse sistemáticamente, así como a través de las superficies mucosas y su termoestabilidad relativa facilita su uso clínico. Mientras que los adenovirus bovinos, porcinos y ovinos están siendo explorados para
 10 su uso veterinario (3), los estudios de vectores de adenovirus de diferentes serotipos humanos han mostrado una inmunogenicidad variable. La mayoría de los estudios ahora se centran en los candidatos más prometedores, incluyendo AdHu5, AdHu35 y AdHu11. Estos vectores pueden inducir potentes respuestas protectoras mediadas por células T y B frente a un intervalo de antígenos codificados por virus y parásitos (10, 14-17). Sin embargo, los problemas que rodean a la inmunidad preexistente frente a virus ubicuos tales como AdHu5 y AdHu35 siguen siendo un gran obstáculo para el despliegue clínico de estos vectores. Dependiendo de la región en estudio, el 35-80 % de los adultos humanos portan anticuerpos neutralizantes AdHu5 y el 5-15 % de anticuerpos neutralizantes AdHu35 (18).

Los vectores de adenovirus de replicación defectuosa con delección de E1 pueden generarse a partir de "clones moleculares", donde la totalidad del genoma entero se encuentra dentro de un plásmido bacteriano (11). Las construcciones de vacuna pueden ligarse al sitio de delección E1 usando kits disponibles comercialmente. Tras la eliminación de las secuencias bacterianas mediante digestión con enzimas de restricción y la exposición de las repeticiones terminales invertidas (ITR), el plásmido puede transfectarse en una línea celular de empaquetado que suministra el producto génico E1 esencial en *trans*, generando de este modo el virus recombinante puro.

La cápside adenoviral solo permitirá un aumento del 5 % en el tamaño del genoma antes de que el envasado eficiente y la estabilidad viral se interrumpa, un 1,8 kbp extra en el caso del vector AdHu5 (3) bien estudiado. Los vectores con delección de E1 y la región no esencial E3 (21) pueden acomodar hasta 7,5 kbp de ADN extraño y siguen siendo la elección principal para estudios de vacunas usando este vector.

Por lo tanto, de acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un vector adenoviral que comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica un patógeno o antígeno tumoral bajo el control de dicho promotor, donde dicho promotor comprende un elemento regulador del promotor IE1 del CMV y el potenciador del promotor IE1 de CMV y un fragmento de la región 5' no traducida del gen IE1 del CMV que incluye el intrón A y excluye el exón B y el intrón B, donde el elemento regulador, el potenciador y el fragmento de la región no traducida del gen IE1 del CMV del promotor tienen una longitud total de 1,9 kb y donde dicho antígeno no es un antígeno del parásito del paludismo murino.

En una realización, la composición puede ser una composición de vacuna. Preferentemente, la composición de vacuna es adecuada para administración humana y puede usarse para provocar una respuesta inmunitaria protectora contra el antígeno codificado.

En una realización preferida, el vector adenoviral es un vector adenoviral de simio. Más preferentemente, el adenovirus de simio. En una realización preferida, el vector adenoviral es un vector adenoviral de simio. Más preferentemente, el vector adenoviral de simio es el vector AdC6 (C6), AdC7 (C7), AdC9 (C9). Estos virus están detallados en S. Roy et al. Virology (2004) Volumen 324, pág. 361-372. En dicho documento AdC6 se denomina SAdV-23; AdC7 se denomina SAdV-24; y AdC9 se denomina SAdV-25. En otras publicaciones AdC9 también se denomina AdC68 (por ejemplo, Fitzgerald et al. J Immunology 2003, 170:1416-22).

Se entenderá que el desarrollo de vectores de adenovirus de simio, por ejemplo, adenovirus de chimpancé, contra los cuales la inmunidad preexistente no es prevalente ni en seres humanos (1-2 %) ni en algunas otras especies de simios, tales como macacos rhesus, a menudo usados para pruebas preclínicas (19, 20) es deseable.

Se comprenderá además que en muchas aplicaciones es preferible que el vector de adenovirus sea deficiente en la replicación, lo que significa que se han vuelto incapaces de replicarse debido a una delección funcional o la eliminación completa de un gen que codifica un producto génico esencial para la replicación viral. A modo de ejemplo, los vectores de la invención se pueden hacer defectuosos en la replicación por eliminación de todo o parte del gen E1 y, opcionalmente, también la región E3 y/o la región E4.

Debe entenderse que los promotores del CMV son bien conocidos en la técnica. Existen numerosas versiones del promotor temprano inmediato (IE) del CMV como se muestra en la Figura 1. Se sabe que estos pueden utilizarse para dirigir la expresión del antígeno en células eucariotas huésped (22). Se ha demostrado que el promotor potenciador de IE del CMV produce altos niveles de expresión de transgenes en tejidos eucarióticos en comparación con otros promotores. Se demostró que una vacuna de ADN que expresaba los antígenos Gag/Env del VIH-1 bajo el control del promotor del CMV, en lugar de la repetición terminal larga del virus de la leucemia murina AKV endógeno, era más inmunogénica en macacos (23).

Se sabe además que la inclusión del intrón A del CMV da como resultado una expresión transgénica mejorada sobre el promotor potenciador del IE del CMV solo *in vitro* e *in vivo* (24,25) usando vectores de ADN plasmídico.

Sin embargo, no se ha realizado ninguna evaluación de la inmunogenicidad comparativa de estos vectores con diferentes promotores.

Más recientemente, la expresión de un gen de la luciferasa de luciérnaga se ha evaluado usando un vector AdHu5 y se observó una mejor expresión con la adición de la secuencia del intrón A (26). De nuevo no se realizaron estudios de respuestas inmunitarias. Se ha sugerido que la inclusión del intrón puede incrementar la velocidad de poliadenilación y/o transporte nuclear asociada con el empalme de transcritos primarios pre-ARNm (27). Tal investigación sobre la función del promotor con vectores adenovirales y vectores plasmídicos se ha dirigido a mejorar la expresión del transgén con el fin de mejorar la eficacia de los vectores de terapia génica, donde el resultado deseado es una expresión prolongada de alto nivel del transgén.

Será evidente para el experto en la técnica que, aunque se requiere alguna expresión para inmunogenicidad, la expresión aumentada de un gen no se correlaciona con una inmunogenicidad aumentada. De hecho, la expresión aumentada de un transgén puede conducir a inestabilidad del vector o la no viabilidad del virus recombinante.

Será evidente que el antígeno puede ser cualquier antígeno de interés ya sea exógeno o endógeno. Los antígenos exógenos incluyen todas las moléculas encontradas en organismos infecciosos. Por ejemplo, inmunógenos bacterianos, inmunógenos parásitos e inmunógenos víricos.

Las fuentes bacterianas de estos inmunógenos incluyen las responsables de la neumonía bacteriana, meningitis, cólera, difteria, pertussis, tétanos, tuberculosis y lepra.

Las fuentes parasitarias incluyen parásitos de paludismo, tales como *Plasmodium*, así como especies de tripanosoma y leishmania.

Las fuentes víricas incluyen poxvirus, por ejemplo, virus de la viruela, virus de la viruela vacuna y virus orf; virus del herpes, por ejemplo, virus del herpes simple tipo 1 y 2, virus B, virus de la varicela zoster, citomegalovirus y virus Epstein-Barr; adenovirus, por ejemplo, mastadenovirus; papovavirus, por ejemplo, papilomavirus, tales como HPV16, y poliomavirus, tales como virus BK y JC; parvovirus, por ejemplo, virus adenoasociados; reovirus, por ejemplo, reovirus 1, 2 y 3; orbivirus, por ejemplo, fiebre por garrapatas de Colorado; rotavirus, por ejemplo, rotavirus humanos; alfavirus, por ejemplo, virus de la encefalitis oriental y virus de la encefalitis venezolana; rubivirus, por ejemplo, rubéola; flavivirus, por ejemplo, virus de la fiebre amarilla, virus de la fiebre del dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas y virus de la hepatitis C; coronavirus, por ejemplo, coronavirus humanos; paramixovirus, por ejemplo, parainfluenza 1, 2, 3 y 4 y paperas; morbillivirus, por ejemplo, virus del sarampión; neumovirus, por ejemplo, virus sincitial respiratorio; vesiculovirus, por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular; lisavirus, por ejemplo, virus de la rabia; ortomixovirus, por ejemplo, gripe A y B; bunyavirus, por ejemplo, virus de LaCrosse; flebovirus, por ejemplo, virus de la fiebre del Valle del Rift; nairovirus, por ejemplo, virus de la fiebre hemorrágica del Congo; hepadnaviridae, por ejemplo, hepatitis B; arenavirus, por ejemplo, virus de 1cm, virus de Lasso y virus de Junin; retrovirus, por ejemplo, HTLV I, HTLV II, VIH-1 y VIH2; enterovirus, por ejemplo, poliovirus 1, 2 y 3, virus coxsackie, ecovirus, enterovirus humanos, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis E y virus Norwalk; rinovirus, por ejemplo, rinovirus humanos; y filoviridae, por ejemplo, virus de Marburg (enfermedad) y virus del ébola.

Los antígenos de estas fuentes bacterianas, víricas y parasitarias pueden considerarse antígenos exógenos porque normalmente no están presentes en el huésped y no están codificados en el genoma del huésped.

Por el contrario, los antígenos endógenos están normalmente presentes en el huésped o están codificados en el genoma del huésped, o ambos. La capacidad para generar una respuesta inmune a un antígeno endógeno es útil en el tratamiento de tumores que soportan ese antígeno o en la neutralización de factores de crecimiento para el tumor. Un ejemplo del primer tipo de antígeno endógeno es HER2, el objetivo del anticuerpo monoclonal denominado Herceptin. Un ejemplo del segundo, factor de crecimiento, tipo de antígeno endógeno es la hormona liberadora de gonadotropina (llamada GnRH) que tiene un efecto trófico en algunos carcinomas de la glándula prostática.

Preferentemente, el antígeno es un antígeno de un patógeno infeccioso de seres humanos o ganado.

En una realización preferida, el antígeno proviene de un patógeno que causa paludismo. Preferentemente, el antígeno es un antígeno de *P. falciparum*.

Preferentemente, el antígeno del paludismo es un antígeno de paludismo pre-eritrocítico o de fase sanguínea.

En realizaciones particularmente preferentes de la presente invención, el antígeno de paludismo es ME-TRAP, CSP, MSP-1 o fragmentos de los mismos o AMA1.

Preferentemente, cuando el antígeno del paludismo es un antígeno de MSP-1 tiene la secuencia de PfM117 (SEQ ID NO. 1) o PfM128 (SEQ ID NO. 3).

El paludismo es una enfermedad contra la cual ha sido muy difícil generar inmunidad protectora tanto en seres humanos como en modelos de animales pequeños. Por lo tanto, los resultados analizados más adelante indican que el uso de los enfoques de inmunización descritos en la presente invención tienen un potencial general para su uso en la generación de vacunas muy potentes en seres humanos y otras especies.

En una realización preferente adicional, el antígeno es un antígeno de micobacterias. Preferentemente, el antígeno es un antígeno de *M. tuberculosis*. Más preferentemente, el antígeno es un antígeno 85A DE *M. tuberculosis*.

Los inventores han descubierto que la expresión de antígeno potenciada resultante de la presencia del promotor largo del CMV que incluye el intrón A conduce a un aumento notablemente sorprendente en la potencia inmunogénica de estos vectores de vacuna y a una eficacia protectora mejorada frente a la exposición al patógeno.

Las composiciones de vectores víricos inmunogénicos anteriores pueden formularse en formas de dosificación farmacéuticas, junto con vehículos adecuados farmacéuticamente aceptables, tales como diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes, etc. La forma de dosificación puede contener otros excipientes farmacéuticamente aceptables para modificar condiciones tales como el pH, la osmolaridad, el sabor, la viscosidad, la esterilidad, la lipofiliidad, la solubilidad etc.

Las formas de dosificación adecuadas incluyen formas de dosificación sólidas, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos dispersables, sellos y supositorios, incluyendo formulaciones de liberación sostenida y de liberación retardada. Los polvos y comprimidos pueden comprender, generalmente, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 70 % del principio activo. Los vehículos y excipientes sólidos adecuados son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, etc. Los comprimidos, polvos, sellos y cápsulas son todas formas de dosificación adecuadas para administración oral.

Las formas de dosificación líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Las preparaciones de forma líquida pueden administrarse mediante inyección intravenosa, intracerebral, intraperitoneal, intradérmica, parenteral o intramuscular o infusión. Las formulaciones inyectables estériles pueden comprender una solución o suspensión estéril del agente activo en un diluyente o disolvente no tóxico, farmacéuticamente aceptable. Los diluyentes y disolventes adecuados incluyen agua estéril, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio, etc. Las formas de dosificación líquidas pueden incluir también soluciones o aerosoles para administración intranasal.

Las preparaciones en aerosol adecuadas para inhalación pueden incluir soluciones y sólidos en forma de polvo, que pueden combinarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un gas comprimido inerte.

También se incluyen formas de dosificación para administración transdérmica, que incluyen cremas, lociones, aerosoles y/o emulsiones. Estas formas de dosificación pueden incluirse en parches transdérmicos del tipo matriz o depósito, que son generalmente conocidos en la materia.

Las preparaciones farmacéuticas se pueden preparar convenientemente en forma de dosificación unitaria, según procedimientos estándar de formulación farmacéutica. La cantidad de compuesto activo por dosis unitaria se puede variar de acuerdo con la naturaleza del compuesto activo y el régimen de dosificación previsto.

Los agentes activos se han de administrar a sujetos humanos en "cantidades terapéuticamente eficaces", que se considera que significan una dosificación suficiente para proporcionar un resultado médicamente deseable en el paciente. La dosificación exacta y la frecuencia de administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de agente activo variará, dependiendo de factores tales como la naturaleza de la sustancia activa, la forma de dosificación y la vía de administración.

Los medicamentos y composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar sistémica o localmente. Esto es aplicable tanto al uso como al método de la invención por igual. La administración sistémica puede ser mediante cualquier forma de administración sistémica conocida, por ejemplo, por vía oral, intravenosa o intraperitoneal. La administración local puede ser mediante cualquier forma de administración local conocida, por ejemplo, por vía tópica.

En realizaciones particularmente preferidas, la composición farmacéutica incluye al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un vector adenoviral que comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica un patógeno o antígeno tumoral bajo el control de dicho promotor, donde dicho promotor comprende un elemento regulador del promotor IE1 del CMV y el potenciador del promotor IE1 de CMV y un fragmento de la región 5' no traducida del gen IE1 del CMV que incluye el intrón A y

excluye el exón B y el intrón B, donde el elemento regulador, el potenciador y el fragmento de la región no traducida del gen IE1 del CMV del promotor tienen una longitud total de 1,9 kb para su uso como medicamento o vacuna.

Preferentemente, el vector adenoviral es un vector adenoviral de simio.

5

Preferentemente, el vector adenoviral es deficiente en la replicación.

Preferentemente, el antígeno es un antígeno de un patógeno infeccioso de seres humanos o ganado.

10 De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención se proporciona el uso de un vector adenoviral que comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno del paludismo bajo el control de dicho promotor, donde dicho promotor comprende un elemento regulador y el potenciador del promotor IE1 del CMV y un fragmento de la región 5' no traducida del gen IE1 del CMV que incluye el intrón A y excluye el exón B y el intrón B, donde el elemento regulador, el potenciador y el fragmento de la región no traducida del gen IE1 del CMV del promotor tienen una longitud total de 1,9 kb en la fabricación de una vacuna o inmunoterapéutico para la prevención o el tratamiento del paludismo. Preferentemente, el antígeno del paludismo no es de un parásito murino.

15

Preferentemente, el vector adenoviral es un vector adenoviral de simio.

20 Preferentemente, el vector adenoviral es deficiente en la replicación.

En una realización preferida, el antígeno del paludismo codificado es un antígeno de *P. falciparum*. Más preferentemente, el antígeno del paludismo es un antígeno de paludismo pre-eritrocítico o de fase sanguínea. Incluso más preferentemente, el antígeno del paludismo es ME-TRAP, CSP, MSP-1 o fragmentos de los mismos o AMA1.

25

En una realización más preferente, cuando el antígeno del paludismo es un antígeno de MSP-1 tiene la secuencia de PfM117 (SEQ ID NO. 1) o PfM128 (SEQ ID NO. 3).

30 De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención se proporciona el uso de un vector adenoviral que comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno de *M. tuberculosis* bajo el control de dicho promotor, donde dicho promotor comprende un elemento regulador del promotor IE1 del CMV y el potenciador del promotor IE1 de CMV y un fragmento de la región 5' no traducida del gen IE1 del CMV que incluye el intrón A y excluye el exón B y el intrón B, donde el elemento regulador, el potenciador y el fragmento de la región no traducida del gen IE1 del CMV del promotor tienen una longitud total de 1,9 kb en la fabricación de una vacuna o inmunoterapéutico para la prevención o el tratamiento de la tuberculosis.

35

Preferentemente, el vector adenoviral es un vector adenoviral de simio.

40 Preferentemente, el vector adenoviral es deficiente en la replicación.

En una realización preferida, el antígeno codificado es un antígeno 85A de *M. tuberculosis*.

45 De acuerdo con un quinto aspecto de la invención, se proporciona un vector adenoviral que comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno del paludismo bajo el control de dicho promotor, donde dicho promotor comprende un elemento regulador del promotor IE1 del CMV y el potenciador del promotor IE1 de CMV y un fragmento de la región 5' no traducida del gen IE1 del CMV que incluye el intrón A y excluye el exón B y el intrón B, donde el elemento regulador, el potenciador y el fragmento de la región no traducida del gen IE1 del CMV del promotor tienen una longitud total de 1,9 kb para su uso en la prevención o tratamiento del paludismo.

50

Preferentemente, el antígeno del paludismo no es de un parásito murino.

Preferentemente, el vector adenoviral es un vector adenoviral de simio.

55 Preferentemente, el vector adenoviral es deficiente en la replicación.

Preferentemente, el antígeno del paludismo es un antígeno de *P. falciparum*.

Preferentemente, el antígeno del paludismo es un antígeno de paludismo pre-eritrocítico o de fase sanguínea.

60

Preferentemente, el antígeno de paludismo es ME-TRAP, CSP, MSP-1 o fragmentos de los mismos o AMA1. Más preferentemente, el antígeno del paludismo es un antígeno MSP-1 tiene la secuencia de PfM117 (SEQ ID NO. 1) o PfM128 (SEQ ID NO. 3).

65 De acuerdo con un sexto aspecto de la invención, se proporciona un vector adenoviral que comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno de *M. tuberculosis* bajo el control de dicho promotor,

donde dicho promotor comprende un elemento regulador del promotor IE1 del CMV y el potenciador del promotor IE1 de CMV y un fragmento de la región 5' no traducida del gen IE1 del CMV que incluye el intrón A y excluye el exón B y el intrón B, donde el elemento regulador, el potenciador y el fragmento de la región no traducida del gen IE1 del CMV del promotor tienen una longitud total de 1,9 kb para su uso en la prevención o tratamiento de la tuberculosis.

Preferentemente, el vector adenoviral es un vector adenoviral de simio.

Preferentemente, el vector adenoviral es deficiente en la replicación.

En una realización preferida, el antígeno codificado es un antígeno 85A de *M tuberculosis*.

Será evidente que los medicamentos descritos en cualquiera de los aspectos anteriores pueden comprender uno o más vehículos, transportadores, diluyentes, excipientes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

De acuerdo con un séptimo aspecto de la presente invención se proporciona un producto, combinación o kit que comprende:

a) una composición de sensibilización que comprende un vector adenoviral que comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica un patógeno o antígeno tumoral bajo el control de dicho promotor, donde dicho promotor comprende un elemento regulador del promotor IE1 del CMV y el potenciador del promotor IE1 de CMV y un fragmento de la región 5' no traducida del gen IE1 del CMV que incluye el intrón A y excluye el exón B y el intrón B, donde el elemento regulador, el potenciador y el fragmento de la región no traducida del gen IE1 del CMV del promotor tienen una longitud total de 1,9 kb; y

b) una composición de refuerzo que comprende un vector de virus de la viruela recombinante, comprendiendo dicho vector de viruela que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un patógeno o antígeno tumoral que es el mismo que al menos un antígeno de la composición de sensibilización.

Preferentemente, el vector adenoviral es un vector adenoviral de simio. Más preferentemente, el vector adenoviral de simio es el vector AdC6 (C6), AdC7 (C7) o AdC9 (C9).

Preferentemente, el antígeno no es un antígeno de parásito de paludismo murino.

Preferentemente, el antígeno es un antígeno de un patógeno infeccioso de seres humanos o ganado.

En una realización preferida, el antígeno proviene de un patógeno que causa paludismo. Preferentemente, el antígeno es un antígeno de *P. falciparum*. Más preferentemente, un antígeno del paludismo pre-eritrocítico o de fase sanguínea. Incluso más preferentemente, el antígeno del paludismo es ME-TRAP, CSP, MSP-1 o fragmentos de los mismos o AMA1.

Cuando el antígeno del paludismo es un antígeno de MSP-1 tiene la secuencia de PfM117 (SEQ ID NO. 1) o PfM128 (SEQ ID NO. 3).

En una realización preferente adicional, el antígeno es un antígeno de micobacterias. Más preferentemente, el antígeno es un antígeno de *M. tuberculosis*. Incluso más preferentemente, el antígeno es un antígeno 85A DE *M. tuberculosis*.

También se proporciona el uso de la combinación para la producción de un kit para generar una respuesta de células T protectora contra al menos un antígeno diana de un patógeno o tumor en un sujeto.

También se describe un método para obtener una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición inmunogénica o vacuna de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención suficiente para provocar una respuesta inmunitaria.

Será evidente que se puede administrar al sujeto la composición o vacuna para propósitos profilácticos o inmunoterapéuticos, dependiendo del antígeno.

Se puede inmunizar al sujeto usando un régimen de sensibilización-refuerzo heterólogo.

El experto entenderá que el régimen de sensibilización-refuerzo heterólogo se refiere a un régimen donde una cantidad eficaz de una primera composición inmunogénica o vacuna de acuerdo con la presente invención se administra a un individuo en un primer punto de tiempo y, después, una cantidad eficaz de una segunda composición inmunogénica o vacuna que codifica el mismo antígeno que la composición inmunogénica o vacuna de acuerdo con la presente invención se administra en un segundo momento. Se entenderá que en un régimen de sensibilización-refuerzo heterólogo, la primera y segunda composición inmunogénica o vacunas son diferentes.

Preferentemente, la segunda composición inmunogénica o vacuna se administra 2-8 semanas después de la primera composición inmunogénica o vacuna.

Resultará evidente para el experto en la técnica que el término sujeto tal como se utiliza en la presente invención se refiere a cualquier sujeto animal. Este puede ser, particularmente, un sujeto mamífero, incluyendo un ser humano.

Por lo tanto, los productos de la invención pueden ser útiles no solo en el uso humano sino también en usos veterinarios, por ejemplo en el tratamiento de mamíferos domesticados, incluyendo ganado (por ejemplo, ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras, caballos, o en el tratamiento de mamíferos salvajes, tales como los cautivos en zoológicos).

En otro aspecto, el producto de la invención puede usarse para el tratamiento de sujetos no mamíferos, incluyendo aves, tales como pollos, pavos, patos, gansos y similares.

También se describe un vector adenoviral de simio que comprende un promotor heterólogo largo, donde el promotor es un fragmento de la región 5' no traducida del gen IE1 del CMV que incluye el intrón A y al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un patógeno o antígeno tumoral de interés.

Preferentemente, el promotor no incluye el exón B.

Preferentemente, el vector adenoviral de simio es deficiente en la replicación.

Preferentemente, el antígeno es un antígeno de un patógeno infeccioso de seres humanos o ganado.

El antígeno puede proceder de un patógeno que causa paludismo. Preferentemente, el antígeno es un antígeno de *P. falciparum*. Más preferentemente, un antígeno del paludismo de fase sanguínea. Incluso más preferentemente, el antígeno del paludismo es ME-TRAP, CSP, MSP-1 o fragmentos de los mismos o AMA1.

Cuando el antígeno del paludismo es un antígeno de MSP-1 tiene la secuencia de PfM117 (SEQ ID NO. 1) o PfM128 (SEQ ID NO. 3).

El antígeno es un antígeno de micobacterias. Más preferentemente, el antígeno es un antígeno de *M. tuberculosis*. Incluso más preferentemente, el antígeno es un antígeno 85A DE *M. tuberculosis*.

También se describe un método para mejorar la inmunogenicidad de células T de una composición o vacuna de vector adenoviral inmunogénico de acuerdo con el primer aspecto, que comprende administrar dicha vacuna en combinación con un adyuvante CpG.

Será evidente que el adyuvante CpG puede administrarse antes, junto con, o posteriormente a dicha composición inmunogénica o vacuna.

También se describe una composición que comprende una composición o vacuna de vector adenoviral inmunogénico de acuerdo con el primer aspecto y un adyuvante de CpG.

También se describe la composición anterior para su uso como medicamento.

También se describe un kit que comprende la composición o vacuna vectores adenovirales inmunogénicos del primer aspecto y un adyuvante de CpG para su uso en la generación de una respuesta inmunitaria en un sujeto contra al menos un patógeno o antígeno tumoral.

Se entenderá que una composición inmunogénica a la que se ha hecho referencia en cualquiera de los aspectos anteriores puede ser, en ciertas realizaciones, una vacuna.

Será evidente que el antígeno de acuerdo con cualquier aspecto de la presente invención puede ser cualquier antígeno de interés como se describe en relación con el primer aspecto.

Será evidente que cualquier característica descrita como preferente en relación con un aspecto de la invención también se prefiere en relación con otros aspectos de la invención a menos que se indique otra cosa, y que las realizaciones preferentes relacionadas con una característica se divulgan en combinación con realizaciones preferentes relacionadas con otras características.

La invención se describirá adicionalmente a continuación con referencia a los ejemplos siguientes y la figura, donde:

La figura 1 muestra promotores del CMV.

1) Secuencia completa del promotor de IE del CMV de GenBank. 2) La versión "larga" de 1,9 kbp del promotor mencionado en este documento. 3) Promotor con intrón quimérico de Promega (Southampton, Reino Unido)

usado para expresar ME-TRAP. 4) La versión "pequeña" de 0,6 kbp del promotor mencionado en este documento.

La Figura 2 muestra la cuantificación de la expresión del antígeno mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

Las células 293A se infectaron con AdHu5 que expresa **(a)** MSP-1₄₂ o **(b)** 85A, bajo el control del promotor largo o pequeño. Se recogieron las células en tampón RLT, y se extrajo el ARN y se transcribió de forma inversa en ADNc. Los niveles de la secuencia diana del ADNc de MSP-1₄₂, 85A y AdHu5 E4orf1 se midieron mediante PCR en tiempo real. La expresión génica relativa se calculó como la proporción de copias de ARNm de antígeno diana con respecto a las copias de E4orf1. Cada columna representa la proporción media $\pm$ S.E.

La figura 3 muestra la cuantificación del antígeno MSP-1₄₂ mediante Western Blot.

Las células 293A se infectaron sin virus (calle 1) Ad42SP (calle 2) o Ad42LP (calle 3) en medio de cultivo celular sin FCS. Los sobrenadantes del cultivo celular se cosecharon una vez que fue evidente el 100 % de CPE y se concentraron por centrifugación a través de tubos Centricon YM 30 (Millipore, Watford, Reino Unido). Las proteínas de los sobrenadantes del cultivo celular se separaron mediante SDS-PAGE y se electrotransmitieron sobre membrana de nitrocelulosa, antes de la tinción con mAb conjugado con HRP al marcador PK/V5 C-terminal. La mancha se desarrolló y se expuso a la película fotográfica.

La masa molecular prevista para MSP-142-PK es 46 kDa.

La figura 4 muestra respuestas de células T secretoras de IFN- γ específicas del péptido inducidas por vacunación (a) Ad-MSP-1₄₂ o (b) Ad-85A.

Se inmunizaron ratones BALB/c i.d. con 10^{10} vp de cada adenovirus, y las respuestas medidas en los bazo de ratones inmunizados 14 días después de la inmunización mediante ELISPOT de IFN- γ *ex vivo*. Las columnas representan el número medio de SFC de IFN- γ por millón de esplenocitos $\pm$ S.E. ($n = 3$ ratones/grupo). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, comparando las respuestas entre los grupos que fueron inmunizados con vectores AdHu5 que expresaban el antígeno relevante bajo el control del promotor largo (LP) o corto (SP).

La Figura 5. muestra respuestas de anticuerpos IgG completos específicas de MSP-1₁₉ inducidas por Ad42SP o Ad42LP.

Se inmunizó a los ratones BALB/c i.d. con 10^{11} de vp Ad42SP o con 5×10^{10} de vp Ad42LP. las respuestas de IgG completas contra MSP-1₁₉ se midieron mediante ELISA anti-GST-MSP-1₁₉ en el suero de ratones 13 días después de la inmunización. GST controles todos negativos (datos no mostrados). Las columnas representan la media del título del criterio de valoración $\log_{10} \pm$ IC del 95 %. ($n = 3$ ratones/grupo). * $p \leq 0,05$, comparando las respuestas entre grupos.

La Figura 6 muestra la cinética de las respuestas de anticuerpos IgG completos específicas de MSP-1₁₉ inducidas por Ad42LP.

Se inmunizó a los ratones BALB/c una vez i.d. con 5×10^{10} de vp Ad42 la semana 0. Se analizaron las respuestas de IgG completas contra MSP-1₁₉ mediante ELISA anti-GST-MSP-1₁₉ en el suero de los ratones tomadas a intervalos de 14 días. Los puntos representan los resultados de dos experimentos como la media del título del criterio de valoración $\log_{10} \pm$ IC del 95 %. ($n = 18$ ratones). *** $p \leq 0,001$, comparando las diferencias entre los puntos de tiempo mediante análisis pareado de datos de ratones individuales.

La Figura 7 muestra respuestas de anticuerpos IgG específicas de MSP-1₁₉ inducidas por vacunación de sensibilización-refuerzo de AdM42

Se inmunizó a los ratones BALB/c i.d. con 5×10^{10} de vp Ad42LP y se realizaron refuerzos i.d. con 5×10^7 de ufp MVA que expresan el mismo antígeno dos u ocho semanas después. Las respuestas de IgG completas contra MSP-1₁₉ se midieron mediante ELISA anti-GST-MSP-1₁₉ en el suero de los ratones 13 días después de la segunda inmunización. Las columnas representan los resultados de dos o tres experimentos como la media del título del criterio de valoración $\log_{10} \pm$ IC del 95 %. ($n = 11-22$ ratones/grupo). *** $p \leq 0,001$, comparando las respuestas entre los dos grupos.

La Figura 8 muestra la exposición a esporozoítos de *P. yoelii* de ratones BALB/c inmunizados con AdM42 (8 semanas).

Se inmunizó a los ratones BALB/c como se describe en la tabla 1 y se expusieron a 50 esporozoítos de *P. yoelii* 14 días después de la inmunización final (día 0). La parasitemia en el estadio de la sangre se monitorizó diariamente mediante frotis de sangre fina teñido con Giemsa a partir del día 5 y se calculó el porcentaje de pRBC. Los resultados se muestran para: **(a)** controles vírgenes no inmunizados $n = 6$; **(b)** AdM42 (8 semanas) $n = 6$.

Los ratones no protegidos que sucumbieron a la infección o fueron sacrificados ($a \geq 80$ % de la parasitemia en la fase sanguínea) se indican con el símbolo de cruz t.

La Figura 9 muestra inmunogenicidad a ME-TRAP.

(a) Amplitud de la respuesta inmune a ME-TRAP. Se inmunizaron ratones BALB/c con 1×10^9 de vp de vectores adenovirales que codifican ME-TRAP. Las respuestas inmunitarias se midieron 2 semanas más tarde mediante

ELISPOT después de la estimulación de células con péptidos superpuestos que cubren toda la secuencia del transgén ME.TRAP. Los datos son la media $\pm$ s.d. para tres ratones por grupo. (b) Cinética de la respuesta inmune a ME.TRAP. Se inmunizaron ratones BALB/c con vectores adenovirales (1×10^{10} vp) y de la viruela aviar (1×10^7 ufp). La magnitud de la respuesta inmunitaria se midió después de la estimulación de esplenocitos con péptido Pb9 y la detección de células T CD8⁺ productoras de IFNgamma⁺ mediante citometría de flujo a diferentes intervalos. (c) Número total de células T CD8⁺ productoras de IFNgamma⁺ por bazo durante el pico de las respuestas efectoras y de memoria para cada vector. Los cálculos se realizaron en los mismos grupos de ratones de la figura 1b. (d) El porcentaje de células T CD8⁺ productoras de IFNgamma⁺ de ratones representativos sobre la estimulación de péptidos Pb9. El panel superior muestra el pico de la respuesta efectora para cada vector (20 días después de la sensibilización para los vectores adenovirales y 7 días después de la sensibilización para los vectores poxvirales). La fase de memoria se midió a los 60 días de la sensibilización. Los datos son media $\pm$ s.e.m. para tres ratones por grupo.

La **Figura 10** muestra la inmunogenicidad a ME.TRAP en ratones C57BL/6.

(a) Amplitud de la respuesta inmunitaria. Se inmunizaron ratones con 1×10^9 de vp de vectores adenovirales que codifican ME.TRAP. Las respuestas inmunitarias se midieron 2 semanas más tarde mediante ELISPOT después de la estimulación de células con péptidos superpuestos que cubren toda la secuencia del transgén ME.TRAP. Los datos son la media $\pm$ s.d. para tres ratones por grupo. (b) El porcentaje de las células T CD8⁺Y CD4⁺ IFNgamma⁺ de un grupo de 3 ratones tras estimulación peptídica. El panel superior muestra la respuesta de las células T CD8⁺ para cada vector (20 días después de la sensibilización) y el panel inferior muestra la respuesta de las células T CD4⁺.

La Figura 11 muestra la adquisición del fenotipo efector y las funciones citolíticas por las células T CD8⁺A diferentes intervalos después de la vacunación.

Se inmunizó a los ratones BALB/c como se describe en la figura 1. Los datos muestran el porcentaje de coexpresión de CD8⁺ IFNgamma⁺ CD43^{hi} (a) y CD8⁺ IFNgamma⁺ Granzyme B (b). (c) Expresión de Granzyme B a partir de ratones representativos los días indicados después de la sensibilización. El histograma muestra la expresión de GrB (fondo blanco) después de la tinción con GrB antihumano, en comparación con un control de isotipo (fondo gris). El número corresponde al MFI de la muestra positiva (línea negra continua). Los datos en los gráficos son la media $\pm$ s.e.m. para tres ratones por grupo.

Figura 12. Muestra el análisis de la respuesta de la memoria por marcadores fenotípicos.

Se inmunizó a los ratones BALB/c como se describe en la figura 1. Los esplenocitos se tiñeron de forma conjunta para CD8, IFNgamma⁺ y (a) CD62L, (b) CD127, (c) IL-2 y (d) CD27. Las barras muestran los porcentajes de células dentro del compartimiento de IFNgamma⁺. Los datos son media $\pm$ s.e.m. para tres ratones por grupo.

Figura 13. Muestra el análisis de las respuestas de anticuerpos a Pf TRAP.

Los anticuerpos IgG contra la región TRAP se analizaron mediante ELISA en suero de grupos de al menos 3 ratones BALB/c después de 2 semanas de inmunización con vectores individuales. Los resultados se informaron como un factor de dilución necesario para una muestra con el fin de alcanzar la D.O. de un suero virgen.

Figura 14. Muestra inmunogenicidad de varios adenovirus que codifican el inserto PfM115 en ratones BALB/c.

Después de una única inmunización intradérmica (5×10^{10} de vp) con los diversos vectores adenovirales la semana 0 se detectaron buenos niveles de anticuerpos en el fragmento de 19Kd de PfMSP1 a las 2 semanas en todos los ratones y estos títulos aumentaron hasta la semana 8, cuando a todos los ratones se administró una MVA que codificaba el mismo inserto, que conduce a un incremento adicional de los títulos de anticuerpos. Los vectores adenovirales de simio parecen similares en inmunogenicidad al vector AdHu5. El AdHu5PfM115C4bp codifica una secuencia de núcleo C-terminal adicional de la proteína C4bp del complemento.

La **Figura 15** muestra la evaluación del potencial efecto potenciador inmunitario potencial de una secuencia CpG (CpG 1826) añadida al vector adenovirus AdHu5 PfM115.

Se inmunizó a los ratones BALB/c por vía intradérmica una vez y las respuestas de células T se evaluaron 14 días después. Se utilizó una gran reserva de péptidos superpuestos que abarcaban el inserto para evaluar respuestas de IFN-gamma de células T CD8 (arriba) y CD4 (abajo).

Ejemplos

En los siguientes Ejemplos se han utilizado varios antígenos en las vacunas de vector de adenovirus de la presente invención:

El antígeno 85A de *Mycobacterium tuberculosis* (28, 29).

El extremo C de 42 kDa de la proteína 1 de superficie de merozoíto del antígeno palúdico de fase sanguínea-1 (MSP-1₄₂) del parásito murino *Plasmodium yoelii* (30).

La proteína del circumsporozoíto (CSP) del antígeno del esporozoíto del paludismo del parásito del paludismo

murino *P. berghei*

El inserto del antígeno palúdico pre-eritrocítico cadena de múltiples epítomos-proteína de adhesión relacionada con la trombospodina (ME-TRAP) de *P. falciparum* (31, 32).

5 Una proteína de fusión de las regiones del antígeno de la etapa sanguínea de *P. Falciparum* MSP-1 denominado PfM117

Una proteína de fusión de las regiones del antígeno de la etapa sanguínea de *P. Falciparum* MSP-1 denominado PfM128

10 **Ejemplo 1: Producción de vacunas de vectores de adenovirus que contienen antígenos de paludismo murino y un antígeno de tuberculosis.**

1.1 Aumento de la expresión del antígeno por el promotor del CMV en vectores AdHu5 recombinantes.

15 Se compararon vectores AdHu5 que codifican MSP-1₄₂ de *P. yoelii* de paludismo murino o el antígeno 85A de *M. tuberculosis*, usando vectores que impulsan la expresión del transgén por la versión "pequeña" de 0,6 kbp del promotor IE del CMV (sin intrón A) o la versión "larga" de 1,9 kbp del promotor (con el elemento regulador, potenciador e intrón A). Las versiones pequeña y larga del promotor se denominan SP y LP respectivamente. El nivel de expresión de antígeno por los vectores AdHu5 se ensayó *in vitro* mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo

20 real (Figura 2). El nivel de expresión de antígeno se normalizó con el transcrito AdHu5 E4orf1. En ambos casos, se midieron niveles de expresión del antígeno significativamente más altos después de la infección de células 293A con vectores AdHu5 que expresaban antígeno bajo el control del promotor largo. El nivel global de expresión del antígeno puede ser dependiente del antígeno, dado que los vectores que codifican 85A expresaron niveles significativamente más altos de antígeno en comparación con cualquiera de los vectores que codifican MSP-1₄₂.

25 Estos resultados se confirmaron para los vectores que codifican MSP-1₄₂ mediante Western Blot (Figura 3). El antígeno MSP-1₄₂ incluye el epítipo PK (secuencia de aminoácidos IPNPLLGLD) como una fusión C-terminal. El antígeno se detecta usando el anticuerpo monoclonal anti-PK (también conocido como anti-V5) de Serotec (Oxford, Reino Unido).

30 1.2 Aumento de la inmunogenicidad de células T por los promotores del CMV en vectores AdHu5 recombinantes.

Se inmunizaron grupos BALB/c por vía intradérmica (i.d.) con 10¹⁰ vp de cada adenovirus y las respuestas se midieron en el bazo con respecto a los epítomos de células T, CD8⁺ y CD4⁺ conocidas 14 días después mediante ELISPOT de interferón gamma *ex vivo* (Figura 4). Los epítomos MSP-1₄₂ son todos epítomos de H-2^d restringidos de

35 clase I (Figura 4a). p11 es un epítipo H-2^d de clase I restringido conocido en 85A, mientras que p15 es uno restringido de clase II (Figura 4b). Las respuestas solo se detectaron contra epítomos conocidos en MSP-1₄₂ cuando los ratones fueron inmunizados con Ad42LP, mientras que las respuestas a 85A fueron inducidas por ambos vectores, tendiendo aquellos contra p15 a ser más fuertes en el grupo Ad85ALP. Estos datos se correlacionan con el nivel de expresión de antígeno medida mediante RT-PCR en tiempo real (Figura 2).

40

1.3 Aumento de la inmunogenicidad de anticuerpo por los promotores del CMV en vectores AdHu5 recombinantes.

Se inmunizaron grupos de ratones BALB/c mice i.d. con 10¹⁰ vp de Ad42LP o Ad42SP. Se analizaron las respuestas de anticuerpos IgG enteras contra el extremo C de MSP-1₄₂ (MSP-1₁₉) mediante ELISA dos semanas más tarde

45 (Figura 5). No hubo respuestas detectables de anticuerpos contra MSP-1₁₉ después de la inmunización con Ad42SP, mientras que Ad42LP sensibilizó una respuesta significativamente más alta, con un título final de aproximadamente 1000. Esta respuesta, inducida por Ad42LP, continúa aumentando con el tiempo, alcanzando una meseta a las 6-8 semanas (Figura 6). Esta respuesta de anticuerpos puede reforzarse a un nivel significativamente más alto mediante MVA que codifica el mismo antígeno. Las respuestas de anticuerpos son significativamente más altas después de

50 este régimen heterólogo de sensibilización-refuerzo con AdM. Si los ratones sensibilizados con Ad42LP son estimulados 8 semanas en lugar de 2 semanas más tarde (Figura 7).

1.4 Protección de ratones contra la exposición a *P. yoelii* en fase sanguínea letal mediante inmunización con AdM-MSP-1₄₂.

55

La protección proporcionada por el régimen de sensibilización-refuerzo se investigó mediante el examen de la protección proporcionada por la inmunización con AdM-MSP-1₄₂ contra la exposición a *P. Yoelii* en fase sanguínea letal en ratones. Se inmunizó a los grupos de ratones BALB/c i.d. con 5 x 10¹⁰ de vp Ad42LP y se realizaron refuerzos con MVA que expresaba el mismo antígeno dos u ocho semanas después. Todos los regímenes de

60 inmunización utilizaron el vector Ad42LP, y MVA que expresaba el mismo antígeno. Los ratones fueron expuestos i.v. a 10⁴ pRBC de *P. yoelii* 14 días después de la inmunización final. Los regímenes homólogos de sensibilización-refuerzo se incluyeron como comparación. El 76 % de los ratones inmunizados con el régimen de AdM42 utilizando un intervalo de ocho semanas de sensibilización-refuerzo estaban completamente protegidos frente a una exposición letal a 10⁴ glóbulos rojos parasitados (pRBC) como se muestra en la Tabla 1.

65

Tabla 1

Régimen de inmunización	Nº. de ratones protegidos/expuestos	% Protegidos	Mediana (intervalo) del pico % de Parasitemia de ratones protegidos
AdM42 (2 semanas)	0/6	0 %	N/A
AdM42 (8 semanas)	4/5 + 4/6 + 5/6	76 %	1,2 %/0,004 %/27,7 %
MM42 (8 semanas)	0/3	0 %	N/A
AdAd42 (8 semanas)	0/3	0 %	N/A
No expuestos	0/4 + 0/4 + 0/4	0 %	N/A

La tabla resume los resultados de los experimentos individuales y el nivel general de eficacia protectora. Se incluyen la mediana y el intervalo de parasitemia máxima de los ratones que sobrevivieron en cada grupo. El crecimiento exponencial del parásito da como resultado una parasitemia ≥ 80 % en fase sanguínea en 5-7 días después de la infección en ratones no expuestos o desprotegidos, momento donde se sacrifican los ratones. Los ratones protegidos pueden controlar y, en última instancia, eliminar la infección del paludismo en fase sanguínea.

Estos resultados podrían replicarse en una segunda cepa de ratón y, en este caso, el 100 % de los ratones C57BL/6 sobrevivieron a la exposición, en comparación con ninguno de los controles no inmunizados no expuestos como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Régimen de inmunización	Nº. de ratones protegidos/expuestos	% Protegidos	Mediana (intervalo) del pico % de Parasitemia de ratones protegidos
AdM42 (8 semanas)	6/6	100 %	14,7 %/3,7 %/56,4 %
No expuestos	0/6	0 %	N/A

El 100 % de ratones BALB/c inmunizados con este régimen también fueron protegidos contra una exposición a 50 esporozoítos de *P. yoelii*-el modo natural de la infección por paludismo (Figura 8).

1.5 Protección estéril de ratones a la exposición a esporozoítos de *P. berghei* mediante inmunización con AdHu5-PbCSP

El vector de AdHu5 recombinante para la proteína del circumsporofo (CSP) de *P. berghei* se generó con el antígeno bajo el control del promotor largo (33). Se inmunizó a los ratones BALB/c como se indica en la Tabla 3. Algunos grupos de ratones recibieron una sola inmunización i.d. de AdHu5 que expresan PbCSP y se expusieron dos u ocho semanas más tarde. Los grupos restantes se inmunizaron con regímenes de sensibilización-refuerzo heterólogos utilizando AdHu5 y MVA que expresaban PbCSP. El intervalo de tiempo en semanas entre las dos inmunizaciones se indica entre paréntesis. Todos los regímenes de inmunización utilizaron el vector AdHu5 que expresaba PbCSP bajo el control del promotor largo. Los ratones fueron expuestos i.v. a 10^3 esporozoítos de *P. berghei*. La parasitemia en la fase sanguínea se monitorizó diariamente mediante frotis de sangre fina teñido con Giemsa a partir del día 5 en ratones expuestos. Los ratones están protegidos debido a la ausencia continuada de parasitemia patológica en sangre hasta el día 21. El 33 % de los ratones se protegió contra la exposición después de una única inmunización con Ad-PbCSP y la infección dos semanas más tarde como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Régimen de inmunización	Intervalo de tiempo entre la inmunización y exposición	Nº. de ratones protegidos/expuestos	% de Protección
Ad-PbCSP	2 semanas	4/12	33 %
Ad-PbCSP	8 semanas	1/6	18 %
No expuestos	2 semanas/8 semanas.	0/12	0 %
Ad-MVA PbCSP (intervalo de sensibilización-refuerzo 2 semanas)	2 semanas		66 %
Ad-MVA PbCSP (intervalo de sensibilización-refuerzo de 8 semanas)	2 semanas		100 %
No expuestos	2 semanas		0 %

La inmunización con Ad-PbCSP induce una potente respuesta de las células T CD8⁺ contra el epítipo H-2^d restringido de clase I, Pb9 (34). Si estos ratones son reforzados con MVA que codifica PbCSP ocho semanas más tarde, el 100 % de los ratones son refractarios a la exposición a esporozoítos de *P. berghei* Tabla 3 y Ref. (33).

5 Ejemplo 2 Producción de paludismo humano pre-eritrocítico (*P. Falciparum*) Vacunas antigénicas con vectores de adenovirus humanos y simios

La vacunación con vacunas pre-eritrocíticas ha demostrado ser particularmente prometedora para abordar el enorme problema de salud global de la paludismo (1,2) con cierta eficacia en ensayos clínicos de inmunidad a esta etapa del ciclo de vida del paludismo dirigida hacia el esporozoíto y al posterior esquizonte intrahepáticos (37). Anteriormente se ha demostrado que la respuesta inmunitaria celular es importante en la inmunidad pre-eritrocítica con células T CD8⁺ y la producción de IFN-gamma desempeñan un papel central en la protección del paludismo hepático (38). La proteína de adhesión relacionada con la trombospodina (TRAP) es un antígeno expresado en los esporozoítos que se ha demostrado anteriormente que induce una respuesta protectora de células T CD8⁺ (39). TRAP se probado extensamente en ensayos clínicos de vacunas como una proteína de fusión con una cadena multiepitopo que contiene epítipos adicionales de células B, células T CD8⁺ y CD4⁺, conocida como ME.TRAP (40, 41). En seres humanos, se ha demostrado que los regímenes de sensibilización-refuerzo de FP9-MVA.ME.TRAP inducen respuestas de células T tanto CD8⁺ como CD4⁺ que conferían protección estéril en algunos voluntarios (42, 43). Los vectores adenovirales del serotipo humano 5 se han utilizado previamente en un modelo de ratón de *P. yoelii* de paludismo y han demostrado una inmunogenicidad excelente y una protección significativa después de solo una dosis única (44). Sin embargo, una limitación importante que impide el uso de este serotipo en los seres humanos es la presencia omnipresente de AdH5, con infecciones infantiles frecuentes que dan como resultado seroconversión. Se ha informado que casi todos los adultos tienen anticuerpos contra AdH5 (45), y del 45 % al 80 % de los individuos poseen anticuerpos neutralizantes (NAB) contra el virus (46). Para eludir el problema de la inmunidad preexistente a AdH5, ha aumentado el interés en el uso de serotipos adenovirales de origen simio que no circulan a niveles apreciables en poblaciones humanas, con una serie de estudios que demuestran la capacidad de estos vectores para provocar respuestas de células T CD8⁺ tanto en ratones como en modelos de primates no humanos de SARS (47) y el VIH (48, 49).

En este trabajo actual, los inventores demuestran por primera vez en un modelo de paludismo de ratón que con el uso de un intrón A largo que contiene el promotor del CMV, como se ha definido anteriormente, cuatro vectores adenovirales de simio, AdC6, AdC7, AdC9 (también conocido como C68 (50)), puede inducir respuestas de células T CD8⁺ excelentes con frecuencia superan a AdH5. Además, se produjo inducción de altos niveles de protección estéril a una exposición con *P. Berghei* después de una sola vacunación con los vectores. Finalmente, en condiciones de inmunidad preexistente a los vectores adenovirales de simio de AdH5, se mantuvo un alto grado de protección que se anuló con el uso del serotipo humano 5.

2.1 Materiales y métodos

Ratones e inmunizaciones

Se usaron ratones BALB/c hembra de 4 a 6 semanas de edad y se inmunizaron por vía intradérmica, que previamente se ha demostrado que provoca una mejor inmunogenicidad cuando se compara con otras vías, por ejemplo subcutánea, intramuscular (58). MVA.ME.TRAP (MVA) o FP9.ME.TRAP se administraron a una dosis de 1×10^6 o 1×10^7 ufp y adenovirus a una dosis de 1×10^9 o 1×10^{10} partículas víricas (v.p.).

Vectores virales

Todos los vectores expresan el transgén ME.TRAP que se ha descrito previamente (40, 71). El inserto ME.TRAP es un transgén híbrido de 2398 pb que codifica una proteína de 789 aa. La cadena de ME contiene el epítipo de Pb9 de BALB/c H-2K^d entre un número de otros epítipos de células B y T (72). Los vectores adenovirales de simio (SAdV) y el vector AdHu5 se construyeron con una región del CMV larga portadora del intrón promovido como se describe (73). La construcción del MVA (71) y del FP9 (43) se ha descrito anteriormente.

IFN γ ELISPOT *ex vivo*

Se cultivaron esplenocitos tratados con ACK o PBMC se cultivaron durante 18-20 horas en placas de membrana IPVH (Millipore) con el inmunodominante H-2Kd-epítipo restringido de P9b (SYIPSAEKI) a una concentración final de 1 μ g/ml. ELISPOT se realizó como se describió anteriormente (74). Para analizar la amplitud de la respuesta inmune, los esplenocitos se estimularon con grupos de péptidos de 20 unidades que se superponían por 10aa que abarcaban toda la longitud de TRAP (43,71) así como un grupo de péptidos que cubrían la cadena ME, todos a una concentración final de 5 μ g/ml.

Tinción intracelular de citocinas

Los esplenocitos tratados con ACK se incubaron durante 5 horas en presencia de 1 μ g/ml de Pb9 y 2 μ g/ml de Golgi-Plug (BD). La tinción intracelular de citocinas (ICS) se realizó con BD cytofix/cytoperm más el kit de acuerdo con las

instrucciones del fabricante. Los esplenocitos se tiñeron con una combinación adecuada de anticuerpos conjugados con fluorocromo, específicos de CD8 (clon 53-6.7, eBioscience), IFN γ (clon XMG1.2, eBioscience), CD27 (clon LG.7F9, eBioscience), CD43 (clon 1B11, BD/Pharmingen), CD127 (clon A7R34, eBioscience), IL-2 (clon JES6-5H4, eBioscience), controles del isotipo de ratón Gg2a (eBR2a, eBioscience), Receptor de CD16/CD32 Fc γ III/II (2,4G2, BD/Pharmingen), anti-Granzima B (clon GB12, Caltag), Control de isotipo IgG1 Caltag). Cuando se usó CD62L (clon MEL-14, eBioscience), las células estimuladas se incubaron con el péptido TAPI-2 (Peptides International, USA) a una concentración final de 250 μ M para prevenir que CD62L oculte la superficie celular. Para el mapeo de péptidos y la potencia en ratones C57BL/6, los esplenocitos se estimularon con grupos de péptidos que contenían 20 unidades superpuestas por 10, abarcando toda la secuencia de ME-TRAP. La concentración final fue de 20 μ g/ml. Las respuestas de CD4 y CD8 se rastrearon mediante citometría de flujo y se sintetizaron péptidos individuales después de un análisis en la base de datos SYFPEITHI para predecir los epítomos inmunodominantes. Tras la titulación, se usaron péptidos individuales a una concentración final de 5 μ g/ml.

Los análisis de citometría de flujo se realizaron utilizando un FACSCanto (BD Biosciences) y los datos se analizaron con FACSDiva (BD) o Flow Jo (Tree Star).

Evaluación de la respuesta de células T CD8⁺ específica de antígeno mediante citometría de flujo

La frecuencia de células T IFN γ ⁺ CD8⁺ se calculó restando los valores del control no estimulado, que nunca superó el 0,1 % en ninguno de los experimentos. El número total de células específicas de antígeno se calculó como se ha descrito previamente (53). Para los marcadores fenotípicos investigados, cada marcador se comparó con un control de isotipo.

ELISA

Los anticuerpos IgG contra la región TRAP se analizaron mediante ELISA como se ha descrito previamente (43). Para este experimento, se obtuvo suero de grupos de al menos 3 ratones BALB/c después de 2 semanas de inmunización con vectores individuales. Los resultados se informaron como un factor de dilución necesario para una muestra con el fin de alcanzar la D.O. de un suero de origen.

Exposición a parásito

Se aislaron esporozoítos (spz) de *Plasmodium berghei* (clon 234 de la cepa ANKA) de las glándulas salivales de mosquitos hembra *Anopheles stephensi*. Los parásitos se resuspendieron en medio RPMI-1640, recibiendo con cada ratón un total de 1.000 spz mediante vía i.v. Se tomaron muestras de sangre diariamente desde el día 5 hasta el 20; los frotis se tiñeron con Giemsa y se examinaron para detectar la presencia de esquizontes dentro de los glóbulos rojos. La supervivencia se definió como la ausencia completa de parásitos en la sangre.

2.2 Resultados

Amplitud de la respuesta inmunitaria.

Se analizó la amplitud de la respuesta inmunitaria a ME-TRAP en ratones BALB/c (Figura 9a) y C57BL/6 (Figura 10a) mediante ELISPOT IFN γ . En BALB/c, la respuesta predominante se dirigió hacia el epítipo de Pb9 restringido a H-2K^d, mientras que en C57BL/6, la respuesta estaba presente en tres subpoblaciones; la cadena ME, TRAP 1 y TRAP 2. Un análisis adicional con tinción intracelular de citocinas y el uso de la base de datos SYFPEITHI permitió la caracterización de un epítipo DE CD4 en TRAP 1 (IHLYVNVFSNNAKEI), un epítipo DE CD8 en TRAP 2 (NVAFNRFLV) y un epítipo DE CD8 en la cadena ME (DASKNKEKAL).

cinética de la respuesta de células T CD8⁺ específica de Pb9.

La respuesta de células T CD8⁺ a Pb9 de los seis vectores se investigó en términos de expansión, contracción y generación de células de memoria. El adenovirus de simio (SAdS) AdC7 (C7) AdC9 (C9) provocó las respuestas inmunes más fuertes, seguido de AdH5 (H5) (Figuras 9b, 9c, 9d). De los SAdS, AdC6 (C6) fue el menos potente en términos de producción de IFN- γ , pero todos los Ads indujeron una cinética de expansión de células T CD8⁺ similar, con una respuesta máxima aproximadamente 20 días después de la inmunización. Por otra parte, los poxvirus MVA y FP9 (que utilizan un promotor de poxvirus no CMV) indujeron una respuesta inmunitaria que alcanzó su máximo una semana después de la vacunación, con una disminución en la frecuencia de las células CD8⁺IFN- γ ⁺ observada ya a las 2 semanas de la vacunación. La frecuencia de las células T CD8⁺IFN- γ ⁺ el día 60 después de la vacunación fue más altas en los ratones que fueron vacunados con un adenovirus, esto fue más evidente en los ratones inmunizados con C9 o H5. Por tanto, todos los vectores adenovirales comparten características similares en términos de resistencia y cinética de la respuesta de células T CD8⁺, con profundas diferencias en la cinética de expansión y contracción observada entre los vectores adenovirales y poxvirales.

Respuesta de células T CD8⁺ efectoras

Debido al corto intervalo entre la infección y la progresión a la enfermedad, las células T CD8⁺ efectoras pueden desempeñar un papel importante en la protección contra el paludismo. Por lo tanto, se investigó la adquisición de funciones efectoras determinadas por la expresión de un número de marcadores fenotípicos, CD43 y Granzyme B. Se ha demostrado previamente que la expresión de CD43 está regulada por aumento durante la fase efectora de la respuesta de CD8 (51) mientras que la molécula efectora citolítica Granzyme B (GrB), está altamente expresada en células T CD8⁺ efectoras, con niveles más bajos observados en T_{EM} and T_{CM} (52), y es uno de los principales mecanismos que utilizan los CTL para matar las células infectadas. En general, los vectores adenovirales indujeron un porcentaje significativamente mayor de CD8⁺IFN-gamma⁺CD43^{hi} durante todo el curso de la respuesta inmunitaria en comparación con los vectores poxvirales. De forma interesante, los vectores poxvirales indujeron un bajo porcentaje de CD43^{hi} ya una semana después de la vacunación, lo que sugiere una transición más rápida hacia la fase de memoria, especialmente con MVA. El día 60 después de la sensibilización, los ratones inmunizados con los vectores adenovirales todavía conservaban un porcentaje significativamente mayor de CD43^{hi} cuando se compara con el homólogo poxviral (Figura 11a). Además, los niveles de GrB fueron significativamente menores en el grupo de MVA al día 20 ($p < 0,001$), y al día 60 ambos vectores poxvirales fueron significativamente más bajos que C6 ($p < 0,05$) (Fig. 11b, 11c). Estos resultados demuestran que en respuesta a los cuatro adenovirus hubo un desarrollo completo de una respuesta efectora con preservación de moléculas citolíticas durante largos períodos de tiempo, indicativo de la presencia de células T_{EM} (52).

Marcadores funcionales y de memoria fenotípicos de las células T CD8⁺ específicas de Pb9.

Uno de los objetivos principales de cualquier régimen de vacunación es la generación de células T CD8⁺ de memoria que son capaces de persistir *in vivo* y expandiéndose rápidamente al encontrarse con patógenos que proporcionan protección. Hasta la fecha se ha sugerido que un número de moléculas diferentes corresponden a diferentes subtipos de células de memoria (53, 54). En este estudio actual, los inventores eligieron investigar varias de estas moléculas para determinar si los vectores individuales indujeron diferentes poblaciones de células de memoria. Durante la fase temprana de la respuesta, las células CD8⁺ IFN- γ ⁺ generadas en respuesta a FP9 o MVA mostraron un CD62L^{hi}, CD127^{hi} y produjo IL-2, lo que confirma la rápida transición a un fenotipo T_{CM}. A la inversa, los vectores adenovirales no indujeron un fenotipo de células T CD8⁺ de memoria centrales, incluso al día 60, con la mayoría de células CD8⁺IFN- γ ⁺ que exhiben predominantemente un fenotipo de memoria efectora (CD62L^{lo}, CD127^{hi} y un porcentaje bajo de células productoras de IL-2) (Figura. 12a-d). De forma interesante, CD27 se mantuvo bajas en ratones vacunados con vectores adenovirales, mientras que el porcentaje de células CD27⁺ aumentó con el tiempo en respuesta a los vectores poxvirales. Dado que las células CD8⁺ CD27⁺ se mantienen en respuesta a la estimulación antigénica persistente (55), esto puede sugerir que se estaba produciendo una estimulación prolongada del antígeno en respuesta a los adenovirus. En resumen, estos resultados demuestran que la vacunación con vectores adenovirales induce predominantemente una respuesta T_{EM}, como lo demuestra un fenotipo CD62L^{lo}, CD127⁺, IL-2^{low} además del porcentaje alto relativo de células CD43^{hi}, así como niveles más altos de moléculas citolíticas 60 días después de la sensibilización.

Supervivencia tras una exposición a *P. berghei*.

Para evaluar el nivel de protección proporcionado por estos diferentes vectores, se expuso a los ratones a *P. berghei* como se muestra en la Tabla 1. Se inmunizó a los ratones BALB/c con vectores adenovirales (1×10^{10} vp) y poxvirales (1×10^7 ufp) y después se expusieron 14 días ($n=12$) y 60 días después ($n=6$) mediante administración i.v. de 1000 esporozoítos de *Plasmodium berghei*. La inmunidad preexistente a AdH5 se analizó después de inyectar a grupos de 6 ratones BALB/c 5×10^5 v.p. de AdH5 que codifica un transgén no relacionado (Ag85.A). 30 días después, se inmunizó a los mismos ratones con 1×10^{10} v.p. por ratón de AdH5, C6, C7 y C9 que codifican ME.TRAP. Se expuso a los ratones 14 días después de la última inmunización. Los números representan el porcentaje de animales que sobrevivieron a la exposición. Las diferencias estadísticas se indican como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, y muestran comparación de regímenes individuales con el control virgen.

Tabla 1

Vector	Día 14 (n=12) %	Día 60 (n=6) %	Inmunidad preexistente a H5 (día 14) (n=6) %
H5	83 ***	0	0
C6	67 **	0	17
C7	83 ***	50 *	33 **
C9	92 ***	17	50 *
MVA	0	0	n.t.
FP9	0	0	n.t.
No expuesto	0	0	0

En condiciones sin inmunidad previa a AdH5 (día 14), C9 proporcionó la mejor protección (92 %), seguido de C7, H5 (83 %) y, por último C6 (67 %), todas ellas significativamente más altas que el grupo control no expuesto (0 %, $p < 0,001$). No se confirió protección mediante MVA o FP9 en el mismo momento. El día 60 después de la sensibilización, se logró una protección significativa con C7 (50 %) y C9 (17 %), pero no se observó protección cuando se inmunizó a los ratones con H5 o C6. La capacidad de estos vectores para conferir protección en presencia de inmunidad preexistente a AdH5, que imitaría una situación humana donde se espera que al menos el 45 % de la población tenga NAB a AdH5, también se evaluó en este estudio. Se inmunizó a los ratones inicialmente con AdH5 que contenía un inserto no relacionado (antígeno 85A de *Mycobacterium tuberculosis*), que se siguió 4 semanas más tarde por los vectores Ads que codifican ME-TRAP. En presencia de inmunidad de AdH5 preexistente, la inmunización con H5 no proporcionó protección, mientras que C9 dio la mejor protección (50 %), seguida de C7 (33 %) y C6 (17 %). Ambos, C9 y C7 fueron significativamente más altos que IH5 y los controles no expuestos ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente).

RESPUESTAS DE CÉLULAS T A Pf TRAP

Para determinar que las respuestas inmunitarias son provocadas por el TRAP de *P. falciparum* dentro del transgén ME-TRAP, se analizó la inmunogenicidad mediante tinción intracelular de citocinas en esplenocitos de ratones C57BL/6 tras la vacunación con todos los vectores. La técnica ELISpot mostró una respuesta inmunitaria provocada por tres subconjuntos (Figura 10a). El análisis por citometría de flujo reveló la presencia de un epítipo de CD4 y un epítipo de CD8 en la secuencia TRAP y un epítipo de CD8 en la cadena ME. Un análisis adicional utilizando la base de datos SYFPEITHI permitió la identificación de las secuencias peptídicas óptimas con fines de síntesis (56). Se observó una tendencia similar en términos de potencia de las respuestas de células T CD4⁺ y CD8⁺ con respecto a las respuestas de Pb9. C9 provocó las respuestas de células T TRAP más potentes, seguido de C7, H5 y, finalmente, C6. Ambos vectores poxvirales indujeron una respuesta inmunitaria más modesta medida a la semana 3 después de la vacunación (Fig. 10b).

ANTICUERPOS FRENTE A TRAP

La inducción de una respuesta de células B específica de TRAP por los vectores se evaluó en sueros de ratones vacunados. Todos los vectores adenovirales fueron capaces de inducir altos niveles de anticuerpos IgG contra la región TRAP, mientras que los vectores poxvirales provocaron bajos niveles de anticuerpos. Las respuestas más fuertes se alcanzaron mediante AdH5 (D.O. $\bar{x}=3930\pm14$), seguido de dC7 ($\bar{x}=3358\pm256$), AdC9 ($\bar{x}=2862\pm979$), AdC6 ($\bar{x}=739\pm452$); mientras que MVA ($\bar{x}=178\pm98$) y FP9 ($\bar{x}=126\pm95$) indujeron niveles mínimos de anticuerpos (Fig 13). Valores para AdH5, AdC7 y AdC9 fueron significativamente mayores que el resto del grupo.

2.3 Discusión

Cada vez hay más pruebas de que las respuestas de las células T pueden ser un requisito fundamental para la protección contra enfermedades como el paludismo, SIDA, tuberculosis y cáncer. Las células T CD8⁺ Se ha demostrado que las células T desempeñan un papel central en la protección del estadio hepático de la infección por paludismo (57). Se ha demostrado que una serie de vacunas de subunidades, en forma de ADN desnudo y vectores virales, inducen fuertes respuestas de células T CD8⁺ en ratones (44), proporcionando protección contra el paludismo.

Los vectores adenovirales del serotipo humano 5 (AdH5) se han analizado en ratones como candidatos a vacunas para diversas enfermedades infecciosas (44, 58, 59). Estos vectores han mostrado una excelente inmunogenicidad de las células T CD8⁺ en un régimen de sensibilización-refuerzo en combinación con vectores poxvirales y han conferido una protección significativa. Sin embargo, en el único estudio previo de los vectores adenovirales en el modelo de *P. berghei*, la protección mediante inmunización con AdH5 homólogo fue mínima (58). Debido a la presencia omnipresente de AdH5, un alto porcentaje de seres humanos desarrollan anticuerpos que hacen que la vacuna sea ineficaz. Para evitar este problema, los vectores adenovirales se han diseñado a partir de serotipos de chimpancé que no circulan en seres humanos. En estudios previos se ha demostrado la capacidad del adenovirus del chimpancé para provocar potentes respuestas inmunitarias mediadas por células T CD8⁺ y células B en modelos de rabia (50), SARS (47) y VIH 49), como regímenes de sensibilización o sensibilización-refuerzo heterogéneos en ratones y primates.

El uso de tres vectores adenovirales de chimpancé, AdC6, AdC7 y AdC9 como una vacuna de paludismo pre-eritrocítica ha sido posible utilizando un intrón A que lleva un promotor largo. Los inventores han comparado estos vectores con AdH5 que también expresan un promotor largo y dos vectores poxvirales que se han usado ampliamente en ensayos clínicos en seres humanos MVA y FP9.

Los vectores adenovirales provocaron las respuestas de células T CD8⁺ más potentes. que alcanzaron su máximo en la semana 3, aunque mantuvieron una alta frecuencia de células específicas de Pb9 incluso 60 días después de la sensibilización. Por el contrario, los vectores poxvirales alcanzaron su máximo en la primera semana y luego se contrajeron rápidamente. Tras el análisis de un número de marcadores fenotípicos, tales como CD43 y GrB, se demostró que Ads inducían una potente población efectora de células que era significativamente menor cuando los

ratones se inmunizaban con cualquiera de los vectores poxvirales. Además, se demostró que MVA induce un nivel más bajo de GrB, lo que sugiere un nivel globalmente reducido de la actividad citolítica. Por tanto, los vectores adenovirales fueron capaces de inducir una respuesta sostenida de células T CD8⁺ efectoras que se mantuvo en altos niveles durante al menos 60 días después de la sensibilización. Los marcadores fenotípicos adicionales mostraron que los vectores poxvirales inducían la generación de, predominantemente, células T CD62L⁺, CD127⁺ CD8⁺, mientras que el fenotipo predominante de las células T CD8⁺ en respuesta a los vectores Ad fue CD62L^{duall/-}, CD127 durante un periodo de tiempo prolongado. Basándose en la expresión de estos marcadores, se pueden identificar tres subgrupos diferentes de células T CD8⁺ específicas de Ag: células T efectoras T_E (CD62L⁻CD127⁺); células T de memoria efectoras T_{EM} (CD62L⁺CD127⁺) y células T de memoria centrales T_{CM} (CD62L⁺CD127⁺) (60).

Los anticuerpos frente a la región TRAP también se evaluaron después de la vacunación de ratones BALB/c con cada vector. La potencia en términos de la respuesta de células B se correlacionó bien con la magnitud de las respuestas de células T CD8⁺. La protección contra *P. Berghei* en este sistema se basa en las respuestas de células T CD8⁺ dirigidas hacia un epítipo inmunodominante. Pb9. Los anticuerpos frente a TRAP no desempeñarían un papel en la protección debido al hecho de que la secuencia de TRAP deriva de *P. falciparum*. Sin embargo, la presencia de anticuerpos podría añadir un beneficio adicional para mejorar la protección en las infecciones humanas con *P. falciparum*.

Los inventores muestran que los vectores adenovirales de simio utilizando un promotor largo provocaron potentes respuestas de células T CD8⁺ que son importantes en la protección en un modelo de paludismo pre-eritrocítico de ratón. En contraste con los serotipos de adenovirus humanos raros, tales como AdHu35 (70), la inmunogenicidad y la eficacia de estos vectores de simio es tan grande o mayor que AdH5. La comparación de los vectores adenovirales con dos vectores poxvirales, FP9 y MVA, demostró que los Ads eran capaces de sostener un alto número de células T CD8⁺ durante un largo período de tiempo que posteriormente resultó en la generación de un alto número de células T_{EM}. A la inversa, la inmunización con cualquiera de los vectores poxvirales indujo una alta proporción de células T_{CM} muy temprano después de la inmunización. Además, todos los vectores adenovirales de simio indujeron niveles sobresalientes de protección durante la fase efectora de la respuesta en ausencia y presencia de inmunidad preexistente a AdH5, manteniéndose la protección durante un largo período de tiempo con un número de vectores. Estos datos demuestran por primera vez que una dosis única de una vacuna de subunidad es capaz de producir protección frente a *P. berghei* y destaca el potencial de los vectores adenovirales de simio para una futura aplicación como vacuna contra el paludismo en seres humanos.

Ejemplo 3 Vacunas de fase sanguínea contra paludismo por *P. Falciparum*

Basándose en los hallazgos del Ejemplo 1 que demuestran la sorprendente capacidad de un régimen de inmunización de sensibilización-refuerzo heterólogo con Ad-MVA para inducir una fuerte inmunidad protectora contra el paludismo en la fase sanguínea en un modelo de paludismo por *P. yoelii* murino, los inventores procedieron a generar vectores de adenovirus y MVA que codifican secuencias del gen MSP-1 del parásito del paludismo humano *P. falciparum*. Este gen es dimórfico con dos tipos de secuencia de prevalencia. Tiene una estructura de bloques bien estudiada que permite la identificación de bloques conservados y variables.

El inserto PfM117 (véase la SEQ ID NO. 1) se ha diseñado como un inserto útil para la inmunización. Comprende los bloques de secuencias conservados 1, 3, 5 y 12 en el extremo N de una proteína de fusión, seguido por ambas copias del fragmento 33kd importante y en el extremo C de la proteína el fragmento 19Kd relativamente conservado. El fragmento de 33 Kd es un componente inmunogénico bien estudiado del antígeno MSP1 que se sabe que contiene epítomos de células T. Sin embargo, es dimórfico con la divergencia sustancial de las secuencias entre los dos tipos principales, a menudo indicado por las etiquetas Wellcome y MAD20 en referencia a las cepas del parásito de las que derivaron las secuencias tempranas (Miller L.H. et al. Mol Biochem Parasitol. 1993, 59(1):1-14). En PfM117, la secuencia de la cepa Wellcome se encuentra en N-terminal a la secuencia de la cepa MAD20, e inmediatamente C-terminal a estos está la secuencia de 19Kd. Este último fragmento está altamente pero no completamente conservado entre cepas de parásitos de *P. falciparum* y se sabe que es el blanco de anticuerpos protectores. Sin embargo, algunos de estos anticuerpos protectores pueden ser inhibidos en su acción protectora por los llamados anticuerpos de bloqueo (Uthaipabul et al. J Mol Biol. 2001; 307 (5): 1381-94)]. Uthaipabul et al. (2001) describen los cambios de aminoácidos que pueden realizarse en la secuencia canónica del fragmento de 19Kd que permiten que los anticuerpos inhibidores actúen preferentemente sobre los anticuerpos bloqueantes, aumentando de este modo la probabilidad de que los anticuerpos inducidos a este fragmento sean protectores. Por lo tanto, dentro de este fragmento de 19 Kd se han alterado tres aminoácidos para evitar bloquear la unión del anticuerpo (Uthaipabul et al. 3(2001)).

El inserto PfM128 (véase la SEQ ID NO. 3), es idéntico a la secuencia de PfM117 con una copia adicional de un fragmento de 19Kd insertado entre los dos fragmentos de 33Kd. Este fragmento adicional de 19Kd permite que una secuencia alélica alternativa de ese fragmento sea expresada por esta construcción potencialmente ampliando el intervalo de anticuerpos protectores o células T que podrían ser inducidos por PfM128 en comparación con PfM117.

Los inventores también construyeron una inserción adicional "PfM115" que es muy similar a la secuencia PfM117 en que comprende bloques secuenciales conservados 1, 3, 5 y 12, en el extremo N de la proteína de fusión PfMSP1,

seguidos por ambas copias del fragmento 33kd importante y en el extremo C de la proteína el fragmento de 19Kd relativamente conservado. Sin embargo, hay algunas diferencias de secuencias menores al final de los fragmentos de 33Kd en comparación con la secuencia corregida de PfM117. La secuencia de PfM115 se usó para generar vectores recombinantes de los serotipos C6, C7, C9 y AdHu5 (notación de las cepas como en el ejemplo 2) utilizando de nuevo el promotor largo que contiene el intrón A. Se observó una buena estabilidad genética del vector. La potencia medida por inducción de anticuerpos (Figura 14) fue excelente. Además, se indujeron respuestas de células T CD4 y CD8 a grupos de péptidos que comprendían toda la secuencia de inserto de PfM115. El refuerzo con un vector MVA que codifica el mismo inserto condujo a respuestas mejoradas de anticuerpos y células T.

Un ensayo *in vitro* ampliamente utilizado para predecir la eficacia probable de las vacunas en fase contra *P. falciparum* es el ensayo de actividad inhibidora del crecimiento (GIA) (Bergmann-Leitner y col. Am J Trop Med Hyg. 2006, 75:437-42; Malkin et al. Infect Immun. 2005, 73:3677-85.) Este ensayo *in vitro* cuantifica el % de inhibición de crecimiento en % de parásitos del paludismo de *P. falciparum* en fase sanguínea cuando se cultivan en presencia de suero de ensayo y control. Se usa una reacción enzimática del parásito para cuantificar el crecimiento del parásito después del período de tiempo de 40 horas del ensayo. Se espera que los animales inmunizados con las vacunas candidatas contra el paludismo en fase sanguínea desarrollen respuestas protectoras de anticuerpos. Por lo tanto, el suero de estos animales puede cribarse usando este ensayo para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento del parásito. Se han realizado esfuerzos considerables para estandarizar este ensayo, particularmente por el laboratorio NIH de C. Long. Los ratones fueron inmunizados con el inserto AdHu5-PfM115 y reforzados con la construcción de MVA correspondiente. Los sueros tomados en una hemorragia terminal mostraron un GIA de 46-52 %, medido por el laboratorio C. un nivel que representa una inhibición sustancial del crecimiento de parásitos en el estadio sanguíneo (Bergmann-Leitner y col. Am J Trop Med Hyg. 2006, 75, 437-42). Este resultado sugiere que un régimen de inmunización correspondiente usado en seres humanos mostrará eficacia protectora.

Para intentar aumentar aún más la inmunogenicidad y la probable eficacia protectora de las vacunas vectorizadas adenovirales, las vacunas vectorizadas AdHu5-PfM115 se coadministraron como una mezcla con la secuencia CpG 1826 (Brunner et al. J Immunol. 2000, 165, 6278-86). Los CpG se han estudiado bien como adyuvantes para vacunas basadas en proteínas pero no para vacunas vectorizadas (Daubenberger CA, Current Opinion in Molecular Therapy 2007; 9:45-52). Un estudio previo de una secuencia de CpG coadministrada con una vacuna de adenovirus que codifica un antígeno de tumor PSA condujo a una menor inmunogenicidad de células T que cuando se administró sin el CpG (Lubaroff et al. Vaccine 2006, 24: 6155-62). Sin embargo, la coadministración del oligonucleótido CpG 1826 con la vacuna AdHu5-PfM115 condujo a un aumento de las respuestas de las células T CD4 y CD8 según se midió mediante citometría de flujo (Figura 15). Esto sugiere que la coadministración de oligonucleótidos de CpG con ciertos vectores víricos, incluyendo vectores adenovirales promotores largos heterólogos, puede conducir a una inmunogenicidad mejorada de células T para una variedad de inserciones antigénicas.

Referencias.

1. Fauquet, C. International Committee on Taxonomy of Viruses., and International Union of Microbiological Societies. Virology Division. 2005. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego; London:
2. Rowe, W. P., R. J. Huebner, L. K. Gilmore, R. H. Parrott, y T. G. Ward. 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. Proc Soc Exp Biol Med 84:570.
3. Tatsis, N., y H. C. Ertl. 2004. Adenoviruses as vaccine vectors. Mol Ther 10:616.
4. Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell, y R. W. Finberg. 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. Science 275:1320.
5. Wickham, T. J., P. Mathias, D. A. Cheresh, y G. R. Nemerow. 1993. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. Cell 73:309.
6. Gaggar, A., D. M. Shayakhmetov, y A. Lieber. 2003. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. Nat Med 9:1408.
7. Short, J. J., A. V. Pereboev, Y. Kawakami, C. Vasu, M. J. Holterman, y D. T. Curiel. 2004. Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors. Virology 322 349.
8. Pham, T. T., J. L. Burchette, Jr., y L. P. Hale. 2003. Fatal disseminated adenovirus infections in immunocompromised patients. Am J Clin Pathol 120:575.
9. Kim, Y. J., J. Y Hong, H. J. Lee, S. H. Shin, Y. K. Kim, T. Inada, M. Hashido, y P. A. Piedra. 2003. Genome type analysis of adenovirus types 3 and 7 isolated during successive outbreaks of lower respiratory tract infections in children. J Clin Microbiol 41:4594.
10. Xiang, Z. Q., Y. Yang, J. M. Wilson, y H. C. Ertl. 1996. A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. Virology 219:220.
11. Ghosh-Choudhury, G. Y. Haj-Ahmad, P. Brinkley, J. Rudy, y F. L. Graham. 1986. Human adenovirus cloning vectors based on infectious bacterial plasmids. Gene 50:161.
12. Graham, F. L., y L. Prevec. 1995. Methods for construction of adenovirus vectors. Mol Biotechnol 3:207.
13. Fallaux, F. J., A. Bout, I. van der Velde, D. J. van den Wollenberg, K. M. Hehir, J. Keegan, C. Auger, S. J.

- Cramer, H. van Ormondt, A. J. van der Eb, D. Valerio, y R. C. Hoeben. 1998. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* 9:1909.
14. Ophorst, O. J., K. Radosevic, M. J. Havenga, M. G. Pau, L. Holterman, B. Berkhout, J. Goudsmit, y M. Tsuji. 2006. Immunogenicity and protection of a recombinant human adenovirus serotype 35-based malaria vaccine against *Plasmodium yoelii* in mice. *Infect Immun* 74:313.
15. Rodrigues, E. G., F. Zavala, D. Eichinger, J. M. Wilson, y M. Tsuji. 1997. Single immunizing dose of recombinant adenovirus efficiently induces CD8+ T cell-mediated protective immunity against malaria. *J Immunol* 158:1268.
16. Shiver, J. J., T. M. Fu, L. Chen, D. R. Casimiro, M. E. (Eds.). R. K. Evans, Z. Q., A. J. Simon, W. L. Triona, S. A. Dubey, L. Huang, V. A. Harris, R. S. Long, X. Liang, L. Handt, W. A. Schleif, L. Zhu, D. C. Freed, N. V. Persaud, L. Guan, K. S. Punt, A. Tang, M. Chen, K. A. Wilson, K. B. Collins, G. J. Heidecker, V. R. Fernandez, H. C. Perry, J. G. Joyce, K. M. Hehir, J. C. Cook, P. M. Keller, D. S. Kresock, H. Mach, R. D. Troutman, L. A. Isopi, D. M. Williams, Z. Xu, K. E. Bohannon, D. B. Volkin, D. C. Montefiori, A. Miura, G. R. Krivulka, M. A. Lifton, M. J. Havenga, J. E. Schmitz, N. L. Letvin, M. J. Havenga, A. J. Bett, R. Youil, D. C. Kaslow, and E. A. Emini. 2002. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* 415:331.
17. Sullivan, N. J., T. W. Geisbert, J. B. Geisbert, L. Xu, Z. Y. Yang, M. Roederer, R. A. Koup, P. B. Jahrling, and G. J. Nabel. 2003. Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. *Nature* 424:681.
18. Nwanegbo, E., E. Vardas, W. Gao, H. Whittle, H. Sun, D. Rowe, P. D. Robbins, and A. Gambotto. 2004. Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of The Gambia, South Africa, and the United States. *Clin Diagn Lab Immunol* 11:351.
19. Farina, S. F., G. P. Gao, Z. Q. Xiang, J. J. Rux, R. M. Burnett, M. R. Alvira, J. Marsh, H. C. Ertl, and J. M. Wilson. 2001. Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. *J Virol* 75:11603.
20. Tatsis, N., L. Tesema, E. R. Robinson, W. Giles-Davis, K. McCoy, G. P. Gao, J. M. Wilson, and H. C. Ertl. 2006. Chimpanzee-origin adenovirus vectors as vaccine carriers. *Gene Ther* 13:421.
21. Saito, I., Y. Oya, K. Yamamoto, T. Yuasa, and H. Shimojo. 1985. Construction of nondefective adenovirus type 5 bearing a 2.8-kilobase hepatitis B virus DNA near the right end of its genome. *J Virol* 54:711.
22. Thomsen, D. R., R. M. Stenberg, W. F. Goins, and M. F. Stinski. 1984. Promoter-regulatory region of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:659.
23. Galvin, T. A., J. Muller, and A. S. Khan. 2000. Effect of different promoters on immune responses elicited by HIV-1 gag/env multigenic DNA vaccine in *Macaca mulatta* and *Macaca nemestrina*. *Vaccine* 18:2566.
24. Chapman, B. S., R. M. Thayer, K. A. Vincent, and N. L. Haigwood. 1991. Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 19:3979.
25. Xu, Z. L., H. Mizuguchi, A. Ishii-Watabe, E. Uchida, T. Mayumi, and T. Hayakawa. 2001. Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene* 272:149.
26. Xu, Z. L., H. Mizuguchi, A. Ishii-Watabe, E. Uchida, T. Mayumi, and T. Hayakawa. 2002. Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector. *J Control Release* 81:155.
27. Huang, M. T., and C. M. Gorman. 1990. Intervening sequences increase efficiency of RNA 3' processing and accumulation of cytoplasmic RNA. *Nucleic Acids Res* 18:937.
28. Goonetilleke, N. P., H. McShane, C. M. Hannan, R. J. Anderson, R. H. Brookes, and A. V. Hill. 2003. Enhanced immunogenicity and protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* of bacille Calmette-Guerin vaccine using mucosal administration and boosting with a recombinant modified vaccinia virus Ankara. *J Immunol* 171:1602.
29. McShane, H., A. A. Pathan, C. R. Sander, S. M. Keating, S. C. Gilbert, K. Huygen, H. A. Fletcher, and A. V. Hill. 2004. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med* 10:1240.
30. Lewis, A. P. 1989. Cloning and analysis of the gene encoding the 230-kilodalton merozoite surface antigen of *Plasmodium yoelii*. *Mol Biochem Parasitol* 36:271.
31. Gilbert, S. C., M. Plebanski, S. J. Harris, C. E. Allsopp, R. Thomas, G. T. Layton, and A. V. Hill. 1997. A protein particle vaccine containing multiple malaria epitopes. *Nat Biotechnol* 15:1280.
32. McConkey, S. J., W. H. Reece, V. S. Moorthy, D. Webster, S. Dunachie, G. Butcher, J. M. Vuola, T. J. Blanchard, P. Gothard, K. Watkins, C. M. Hannan, S. Everaere, K. Brown, K. E. Kester, J. Cummings, J. Williams, D. G. Heppner, A. Pathan, K. Flanagan, N. Arulanantham, M. T. Roberts, M. Roy, G. L. Smith, J. Schneider, T. Peto, R. E. Sinden, S. C. Gilbert, and A. V. Hill. 2003. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. *Nat Med* 9:729.
33. Gilbert, S. C., J. Schneider, C. M. Hannan, J. T. Hu, M. Plebanski, R. Sinden, and A. V. Hill. 2002. Enhanced CD8 T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunisation regimes. *Vaccine* 20:1039.
34. Romero, P., J. L. Maryanski, G. Corradin, R. S. Nussenzweig, V. Nussenzweig, and F. Zavala. 1989. Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. *Nature* 341:323.
35. Snow, R.W., C.A. Guerra, A.M. Noor, H.Y. Myint, and S.I. Hay. 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 434:214-217.

36. Rowe, A.K., S.Y. Rowe, R.W. Snow, E.L. Korenromp, J.R. Armstrong Schellenberg, C. Stein, B.L. Nahlen, J. Bryce, R.E. Black, and R.W. Steketee. 2006. The burden of malaria mortality among African children in the year 2000. *Int J Epidemiol*
37. Hill, A.V. 2006. Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. *Nat Rev Immunol* 6:21-32.
- 5 38. Tsuji, M., and F. Zavala. 2003. T cells as mediators of protective immunity against liver stages of *Plasmodium*. *Trends Parasitol* 19:88-93.
39. Khusmith, S., Y. Charoenvit, S. Kumar, M. Sedegah, R.L. Beaudoin, and S.L. Hoffman. 1991. Protection against malaria by vaccination with sporozoite surface protein 2 plus CS protein. *Science* 252:715-718.
40. Gilbert, S.C., M. Plebanski, S.J. Harris, C.E. Allsopp, R. Thomas, G.T. Layton, and A.V. Hill. 1997. A protein particle vaccine containing multiple malaria epitopes. *Nat Biotechnol* 15:1280-1284.
- 10 41. Moorthy, V.S., S. McConkey, M. Roberts, P. Gothard, N. Arulanantham, P. Degano, J. Schneider, C. Hannan, M. Roy, S.C. Gilbert, T.E. Peto, and A.V. Hill. 2003. Safety of DNA and modified vaccinia virus Ankara vaccines against liver-stage *P. falciparum* malaria in non-immune volunteers. *Vaccine* 21:1995-2002.
42. Vuola, J.M., S. Keating, D.P. Webster, T. Berthoud, S. Dunachie, S.C. Gilbert, and A.V. Hill. 2005. Differential immunogenicity of various heterologous prime-boost vaccine regimens using DNA and viral vectors in healthy volunteers. *J Immunol* 174:449-455.
- 15 43. Webster, D.P., S. Dunachie, J.M. Vuola, T. Berthoud, S. Keating, S.M. Laidlaw, S.J. McConkey, I. Poulton, L. Andrews, R.F. Andersen, P. Bejon, G. Butcher, R. Sinden, M.A. Skinner, S.C. Gilbert, and A.V. Hill. 2005. Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4836-4841.
- 20 44. Rodrigues, E.G., F. Zavala, D. Eichinger, J.M. Wilson, and M. Tsuji. 1997. Single immunizing dose of recombinant adenovirus efficiently induces CD8⁺ T cell-mediated protective immunity against malaria. *J Immunol* 158:1268-1274.
45. Chirmule, N., K. Propert, S. Magosin, Y. Qian, R. Qian, and J. Wilson. 1999. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* 6:1574-1583.
- 25 46. Tatsis, N., and H.C. Ertl. 2004. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther* 10:616-629.
47. Zhi, Y., J. Figueredo, G.P. Kobinger, H. Hagan, R. Calcedo, J.R. Miller, G. Gao, and J.M. Wilson. 2006. Efficacy of Severe Acute Respiratory Syndrome Vaccine Based on a Nonhuman Primate Adenovirus in the Presence of Immunity Against Human Adenovirus. *Hum Gene Ther*
- 30 48. Fitzgerald, J.C., G.P. Gao, A. Reyes-Sandoval, G.N. Pavlakis, Z.Q. Xiang, A.P. Wlazlo, W. Giles-Davis, J.M. Wilson, and H.C. Ertl. 2003. A simian replication-defective adenoviral recombinant vaccine to HIV-1 gag. *J Immunol* 170:1416-1422.
49. Reyes-Sandoval, A., J.C. Fitzgerald, R. Grant, S. Roy, Z.Q. Xiang, Y. Li, G.P. Gao, J.M. Wilson, and H.C. Ertl. 2004. Human immunodeficiency virus type 1-specific immune responses in primates upon sequential immunization with adenoviral vaccine carriers of human and simian serotypes. *J Virol* 78:7392-7399.
- 35 50. Xiang, Z., G. Gao, A. Reyes-Sandoval, C.J. Cohen, Y. Li, J.M. Bergelson, J.M. Wilson, and H.C. Ertl. 2002. Novel, chimpanzee serotype 68-based adenoviral vaccine carrier for induction of antibodies to a transgene product. *J Virol* 76:2667-2675.
51. Harrington, L.E., M. Galvan, L.G. Baum, J.D. Altman, and R. Ahmed. 2000. Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans. *J Exp Med* 191:1241-1246.
- 40 52. Wolint, P., M.R. Betts, R.A. Koup, and A. Oxenius. 2004. Immediate cytotoxicity but not degranulation distinguishes effector and memory subsets of CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 199:925-936.
53. Badovinac, V.P., K.A. Messingham, A. Jabbari, J.S. Haring, and J.T. Harty. 2005. Accelerated CD8⁺ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat Med* 11:748-756.
- 45 54. Jabbari, A., and J.T. Harty. 2006. Secondary memory CD8⁺ T cells are more protective but slower to acquire a central-memory phenotype. *J Exp Med* 203:919-932.
55. Baars, P.A., S. Siervo, R. Arens, K. Tesselaar, B. Hooibrink, P. Klenerman, and R.A. van Lier. 2005. Properties of murine (CD8⁺)CD27⁻ T cells. *Eur J Immunol* 35:3131-3141.
56. Rammensee, H., J. Bachmann, N.P. Emmerich, O.A. Bacher, and S. Stevanovic. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50:213-219.
- 50 57. Romero, P., J.L. Maryanski, G. Corradin, R.S. Nussenzweig, V. Nussenzweig, and F. Zavala. 1989. Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. *Nature* 341:323-326.
58. Gilbert, S.C., J. Schneider, C.M. Hannan, J.T. Hu, M. Plebanski, R. Sinden, and A.V. Hill. 2002. Enhanced CD8 T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunisation regimens. *Vaccine* 20:1039-1045.
59. Shiver, J.W., T.M. Fu, L. Chen, D.R. Casimiro, M.E. Davies, R.K. Evans, Z.Q. Zhang, A.J. Simon, W.L. Trigona, S.A. Dubey, L. Huang, V.A. Harris, R.S. Long, X. Liang, L. Handt, W.A. Schleif, L. Zhu, D.C. Freed, N.V. Persaud, L. Guan, K.S. Punt, A. Tang, M. Chen, K.A. Wilson, K.B. Collins, G.J. Heidecker, V.R. Fernandez, H.C. Perry, J.G. Joyce, K.M. Grimm, J.C. Cook, P.M. Keller, D.S. Kresock, H. Mach, R.D. Troutman, L.A. Isopi, D.M. Williams, Z. Xu, K.E. Bohannon, D.B. Volkin, D.C. Montefiori, A. Miura, G.R. Krivulka, M.A. Lifton, M.J. Kuroda, J.E. Schmitz, N.L. Letvin, M.J. Caulfield, A.J. Bett, R. Youil, D.C. Kaslow, and E.A. Emini. 2002. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* 415:331-335.
- 60 60. Bachmann, M.F., P. Wolint, K. Schwarz, P. Jager, and A. Oxenius. 2005. Functional properties and lineage relationship of CD8⁺ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L. *J Immunol*

175:4686-4696.

61. Appay, V., P.R. Dunbar, M. Callan, P. Klenerman, G.M. Gillespie, L. Papagno, G.S. Ogg, A. King, F. Lechner, C.A. Spina, S. Little, D.V. Havlir, D.D. Richman, N. Gruener, G. Pape, A. Waters, P. Easterbrook, M. Salio, V. Cerundolo, A.J. McMichael, and S.L. Rowland-Jones. 2002. Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 8:379-385.

62. Croft, M. 2003. Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:265-273.

63. Gamadia, L.E., E.M. van Leeuwen, E.B. Remmerswaal, S.L. Yong, S. Surachno, P.M. Wertheim-van Dillen, I.J. Ten Berge, and R.A. Van Lier. 2004. The size and phenotype of virus-specific T cell populations is determined by repetitive antigenic stimulation and environmental cytokines. *J Immunol* 172:6107-6114.

64. Mahr, J.A., and L.R. Gooding. 1999. Immune evasion by adenoviruses. *Immunol Rev* 168:121-130.

65. Robinson, H.L., and R.R. Amara. 2005. T cell vaccines for microbial infections. *Nat Med* 11 :S25-32.

66. Wherry, E.J., V. Teichgraber, T.C. Becker, D. Masopust, S.M. Kaech, R. Antia, U.H. von Andrian, and R. Ahmed. 2003. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* 4:225-234.

67. Keating, S.M., P. Bejon, T. Berthoud, J.M. Vuola, S. Todryk, D.P. Webster, S.J. Dunachie, V.S. Moorthy, S.J. McConkey, S.C. Gilbert, and A.V. Hill. 2005. Durable human memory T cells quantifiable by cultured enzyme-linked immunospot assays are induced by heterologous prime boost immunization and correlate with protection against malaria. *J Immunol* 175:5675-5680.

68. Bruna-Romero, O., G. Gonzalez-Aseguinolaza, J.C. Hafalla, M. Tsuji, and R.S. Nussenzweig. 2001. Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11491-11496.

69. Casimiro, D.R., L. Chen, T.M. Fu, R.K. Evans, M.J. Caulfield, M.E. Davies, A. Tang, M. Chen, L. Huang, V. Harris, D.C. Freed, K.A. Wilson, S. Dubey, D.M. Zhu, D. Nawrocki, H. Mach, R. Troutman, L. Isopi, D. Williams, W. Humi, Z. Xu, J.G. Smith, S. Wang, X. Liu, L. Guan, R. Long, W. Trigona, G.J. Heidecker, H.C. Perry, N. Persaud, T.J. Toner, Q. Su, X. Liang, R. Youil, M. Chastain, A.J. Bett, D.B. Volkin, E.A. Emini, and J.W. Shiver. 2003. Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J Virol* 77:6305-6313.

70. Lemckert, A.A., S.M. Sumida, L. Holterman, R. Vogels, D.M. Truitt, D.M. Lynch, A. Nanda, B.A. Ewald, D.A. Gorgone, M.A. Lifton, J. Goudsmit, M.J. Havenga, and D.H. Barouch. 2005. Immunogenicity of heterologous prime-boost regimens involving recombinant adenovirus serotype 11 (Ad11) and Ad35 vaccine vectors in the presence of anti-ad5 immunity. *J Virol* 79:9694-9701.

71. McConkey, S.J., W.H. Reece, V.S. Moorthy, D. Webster, S. Dunachie, G. Butcher, J.M. Vuola, T.J. Blanchard, P. Gothard, K. Watkins, C.M. Hannan, S. Everaere, K. Brown, K.E. Kester, J. Cummings, J. Williams, D.G. Heppner, A. Pathan, K. Flanagan, N. Arulanantham, M.T. Roberts, M. Roy, G.L. Smith, J. Schneider, T. Peto, R.E. Sinden, S.C. Gilbert, and A.V. Hill. 2003. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. *Nat Med* 9:729-735.

72. Schneider, J., S.C. Gilbert, T.J. Blanchard, T. Hanke, K.J. Robson, C.M. Hannan, M. Becker, R. Sinden, G.L. Smith, and A.V. Hill. 1998. Enhanced immunogenicity for CD8⁺ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat Med* 4:397-402.

73. Roy, S., G. Gao, Y. Lu, X. Zhou, M. Lock, R. Calcedo, and J.M. Wilson. 2004. Characterization of a family of chimpanzee adenoviruses and development of molecular clones for gene transfer vectors. *Hum Gene Ther* 15:519-530.

74. Moore, A.C., A. Gallimore, S.J. Draper, K.R. Watkins, S.C. Gilbert, and A.V. Hill. 2005. Anti-CD25 antibody enhancement of vaccine-induced immunogenicity: increased durable cellular immunity with reduced immunodominance. *J Immunol* 175:7264-7273.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ISIS INNOVATION LTD

<120> Novel Adenovirus Vectors

<130> P91849wo00

<150> GB0706914.9

<151> 2007-04-10

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 3039

<212> ADN

<213> Plasmodium falciparum

<400> 1

atgaagatca tcttcttcct gtgctctttc ctgttcttca tcatcaacac ccagtgcgtg	60
acccacgaga gctaccagga gctggtgaag aagctggagg ccctggagga cgccgtgctg	120
accggctaca gcctgttcca gaaagagaag atggtgctga acgagctgtt cgacctgacc	180
aaccacatgc tgacctgtg cgacaacatc cacggcttca agtacctgat cgacggctac	240
gaggagatca acgagctgct gtacaagctg aacttctact tcgacctgct gcgcgccaaag	300
ctgaacgacg tgtgcgccaa cgactactgc cagatcccct tcaacctgaa gatccgcgcc	360
aacgagctgg acgtgctgaa gaaactggtg ttcggctacc ggaagcccct ggacaacatc	420
aaggacaacg tgggcaagat ggaggactac atcaagaaga acaagaccac catcgccaac	480
attaacgagc tgatcgaggg cagcaagaaa accatcgacc agaacaagaa cgccgacaac	540
gaggagggca agaagaagct gtaccaggcc cagtacgacc tgagcatcta caacaagcag	600
ctggaggagg ccacaaacct gatcagcgtg ctggagaagc ggatcgacac cctgaagaag	660
aacgagaaca tcaagatcaa ggagatcgcc aagaccatca agttcaacat cgactccctg	720
ttcaccgacc ccctggagct ggagtactac ctgcgcgaga agaataagaa gatgcagatc	780
aagaagctga ccctgctgaa ggagcagctg gaaagcaagc tgaacagcct gaacaacccc	840
cacaacgtgc tgcagaactt cagcgtgttc ttcaacaaga agaaggaggc cgagatcgcc	900
gaaaccgaga acaccctgga gaataccaag atcctgctga agcactacaa gggcctggtg	960
aagtactaca acggcgagag cagccccctg aaaaccctga gcgaagtgag catccagacc	1020
gaggacaact acgccaacct ggagggccaa gtggtcaccg gcgaggccgt gacccccagc	1080
gtgatcgaca acatcctgag caagatcgag aacgagtacg aggtgctgta cctgaagccc	1140
ctggccggcg tgtacagaag cctgaagaag cagctggaaa acaacgtgat gaccttcaac	1200
gtgaacgtga aggacatcct gaacagccgg ttcaacaagc gggagaactt caagaacgtg	1260
ctggaaagcg acctgatccc ctacaaggac ctgaccagca gcaactacgt ggtgaaggac	1320
ccctacaagt tcctgaacaa agagaagcgg gataagttcc tgagcagcta caactacatc	1380
aaggacagca tcgacaccga catcaacttc gccaacgacg tgctgggcta ctacaagatc	1440

ctgagcgaga agtacaagag cgacctggac agcatcaaga agtacatcaa cgacaagcag 1500
ggcgagaacg agaagtacct gcccttcctg aataacatcg agaccctgta caagaccgtg 1560
aacgacaaga tcgacctgtt cgtgatccac ctggaagcca aggtgctgaa ctacacctac 1620
gagaagagca acgtggaggt gaagatcaaa gagctgaact acctgaaaac catccaggac 1680
aagctggccg acttcaagaa gaacaacaac ttcgtcggca tcgccgacct gagcaccgac 1740
tacaaccaca acaacctgct gaccaagttc ctgtccaccg gcatggtgtt cgagaacctg 1800
gccaagacag tgctgtccaa cctgctggac ggcaacctgc agggcgaggagg gggacccggg 1860
ggaggggacc aagtcgtgac cggcgaagcc atcagcgtga ccatggataa catcctgagc 1920
ggcttcgaaa acgaatacga cgtgatctat ctgaaacccc tggccggcgt gtatcggctt 1980
ctgaagaagc agatcgagaa gaacatcttc accttcaatc tgaacctgaa cgatatcctg 2040
aatagccgcc tgaagaagcg caagtacttc ctggacgtgc tggagagcga cctgatgcag 2100
ttcaagcaca tcagcagcaa cgagtacatc atcgaggaca gcttcaagct gctgaacagc 2160
gagcagaaga acacactgct gaagtcttac aagtatatca aggagagcgt ggagaacgat 2220
atcaagttcg cccaggaggg catcagctac tacgagaaaag tgctggccaa gtacaaggac 2280
gatctggagt ccatcaagaa agtgatcaag gaggagaagg agaagttccc cagcagcccc 2340
cccaccaccc cccccagccc cgccaagacc gacgagcaga agaaggagag caagttcctg 2400
ccttttctga ccaatatcga gacactgtat aacaacctgg tgaataagat cgacgactac 2460
ctgatcaatc tgaaggccaa gatcaacgat tgcaacgtgg agaaggacga ggccccacgtg 2520
aagatcacca agctgagcga tctgaaagcc atcgacgata agatcgatct gttcaagaac 2580
ccctacgact tcgaggccat taagaagctg atcaacgacg acaccaagaa ggacatgctg 2640
ggcaagctgc tgtctaccgg cctggtgcag aatttcccca acaccatcat cagcaagctg 2700
atcgaaggga agttccagga tatgctgaac atcgcccagc accagtgcgt gaagaagcag 2760
atccccgaga acagcggctg cttccggcac ctggacgagc gcgaggagtg gaagtgcctg 2820
ctgaattaca agcaggaggg cgacaagtgc gtggagaatc ccaaccacac ctgcaacgag 2880
aacaacggcg gctgcgacgc cgacgccacc tgcaccgagg aggacagcgg cagcagccgg 2940
aagaagatca cctgcgagtg caccaagccc gacagctacc ccctgttcga cggcatcttc 3000
tgcagcagct ccaacttaat attatattcc tttatctga 3039

<210> 2
<211> 1012
<212> PRT
<213> Plasmodium falciparum
<400> 2

Met Lys Ile Ile Phe Phe Leu Cys Ser Phe Leu Phe Phe Ile Ile Asn
1 5 10 15

Thr Gln Cys val Thr His Glu Ser Tyr Gln Glu Leu val Lys Lys Leu

ES 2 638 577 T3

	20		25		30										
Glu	Ala	Leu	Glu	Asp	Ala	Val	Leu	Thr	Gly	Tyr	Ser	Leu	Phe	Gln	Lys
		35					40					45			
Glu	Lys	Met	Val	Leu	Asn	Glu	Leu	Phe	Asp	Leu	Thr	Asn	His	Met	Leu
	50					55					60				
Thr	Leu	Cys	Asp	Asn	Ile	His	Gly	Phe	Lys	Tyr	Leu	Ile	Asp	Gly	Tyr
65					70					75					80
Glu	Glu	Ile	Asn	Glu	Leu	Leu	Tyr	Lys	Leu	Asn	Phe	Tyr	Phe	Asp	Leu
				85					90					95	
Leu	Arg	Ala	Lys	Leu	Asn	Asp	Val	Cys	Ala	Asn	Asp	Tyr	Cys	Gln	Ile
			100					105					110		
Pro	Phe	Asn	Leu	Lys	Ile	Arg	Ala	Asn	Glu	Leu	Asp	Val	Leu	Lys	Lys
		115					120					125			
Leu	Val	Phe	Gly	Tyr	Arg	Lys	Pro	Leu	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Asn	Val
	130					135					140				
Gly	Lys	Met	Glu	Asp	Tyr	Ile	Lys	Lys	Asn	Lys	Thr	Thr	Ile	Ala	Asn
145					150					155					160
Ile	Asn	Glu	Leu	Ile	Glu	Gly	Ser	Lys	Lys	Thr	Ile	Asp	Gln	Asn	Lys
				165					170					175	
Asn	Ala	Asp	Asn	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Lys	Leu	Tyr	Gln	Ala	Gln	Tyr
			180					185					190		
Asp	Leu	Ser	Ile	Tyr	Asn	Lys	Gln	Leu	Glu	Glu	Ala	His	Asn	Leu	Ile
		195					200					205			
Ser	Val	Leu	Glu	Lys	Arg	Ile	Asp	Thr	Leu	Lys	Lys	Asn	Glu	Asn	Ile
	210					215					220				
Lys	Ile	Lys	Glu	Ile	Ala	Lys	Thr	Ile	Lys	Phe	Asn	Ile	Asp	Ser	Leu
225					230					235					240
Phe	Thr	Asp	Pro	Leu	Glu	Leu	Glu	Tyr	Tyr	Leu	Arg	Glu	Lys	Asn	Lys
				245					250					255	
Lys	Met	Gln	Ile	Lys	Lys	Leu	Thr	Leu	Leu	Lys	Glu	Gln	Leu	Glu	Ser
			260					265					270		
Lys	Leu	Asn	Ser	Leu	Asn	Asn	Pro	His	Asn	Val	Leu	Gln	Asn	Phe	Ser
		275					280					285			
Val	Phe	Phe	Asn	Lys	Lys	Lys	Glu	Ala	Glu	Ile	Ala	Glu	Thr	Glu	Asn

ES 2 638 577 T3

290		295		300
Thr 305	Leu	Glu	Asn	Thr 310
	Lys	Ile	Leu	Leu 315
	Lys	His	Tyr	Lys 320
	Gly	Leu	Val	
Lys	Tyr	Tyr	Asn	Gly 325
	Glu	Ser	Ser	Pro 330
	Leu	Lys	Thr	Leu 335
	Ser	Glu	Val	
Ser	Ile	Gln	Thr	Glu 340
	Asp	Asn	Tyr	Ala 345
	Asn	Leu	Glu	Gly 350
	Gln	Val	Val	
Thr	Gly	Glu	Ala	Val 355
	Thr	Pro	Ser	Val 360
	Ile	Asp	Asn	Ile 365
	Leu	Ser	Lys	
Ile	Glu	Asn	Glu	Tyr 370
	Glu	Val	Leu	Tyr 375
	Leu	Lys	Pro	Leu 380
	Ala	Gly	Val	
Tyr	Arg	Ser	Leu	Lys 385
	Lys	Gln	Leu	Glu 390
	Asn	Asn	Val	Met 395
	Thr	Phe	Asn	400
Val	Asn	Val	Lys	Asp 405
	Ile	Leu	Asn	Ser 410
	Arg	Phe	Asn	Lys 415
	Arg	Glu	Asn	
Phe	Lys	Asn	Val	Leu 420
	Glu	Ser	Asp	Leu 425
	Ile	Pro	Tyr	Lys 430
	Asp	Leu	Thr	
Ser	Ser	Asn	Tyr	Val 435
	Val	Lys	Asp	Pro 440
	Tyr	Lys	Phe	Leu 445
	Asn	Lys	Glu	
Lys	Arg	Asp	Lys	Phe 450
	Leu	Ser	Ser	Tyr 455
	Asn	Tyr	Ile	Lys 460
	Asp	Ser	Ile	
Asp	Thr	Asp	Ile	Asn 465
	Phe	Ala	Asn	Asp 470
	Val	Leu	Gly	Tyr 475
	Tyr	Lys	Ile	
Leu	Ser	Glu	Lys	Tyr 485
	Lys	Ser	Asp	Leu 490
	Ser	Ile	Lys	Lys 495
	Tyr	Ile		
Asn	Asp	Lys	Gln	Gly 500
	Glu	Asn	Glu	Lys 505
	Tyr	Leu	Pro	Phe 510
	Leu	Asn	Asn	
Ile	Glu	Thr	Leu	Tyr 515
	Lys	Thr	Val	Asn 520
	Asp	Lys	Ile	Asp 525
	Leu	Phe	Val	
Ile	His	Leu	Glu	Ala 530
	Lys	Val	Leu	Asn 535
	Tyr	Thr	Tyr	Glu 540
	Lys	Ser	Asn	
Val	Glu	Val	Lys	Ile 545
	Lys	Glu	Leu	Asn 550
	Tyr	Leu	Lys	Thr 555
	Ile	Gln	Asp	560
Lys	Leu	Ala	Asp	Phe
	Lys	Lys	Asn	Asn
	Asn	Asn	Phe	Val
	Gly	Ile	Ala	Asp

ES 2 638 577 T3

565 570 575
 Leu Ser Thr Asp Tyr Asn His Asn Asn Leu Leu Thr Lys Phe Leu Ser
 580 585 590
 Thr Gly Met Val Phe Glu Asn Leu Ala Lys Thr Val Leu Ser Asn Leu
 595 600 605
 Leu Asp Gly Asn Leu Gln Gly Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly Asp Gln
 610 615 620
 Val Val Thr Gly Glu Ala Ile Ser Val Thr Met Asp Asn Ile Leu Ser
 625 630 635 640
 Gly Phe Glu Asn Glu Tyr Asp Val Ile Tyr Leu Lys Pro Leu Ala Gly
 645 650 655
 Val Tyr Arg Ser Leu Lys Lys Gln Ile Glu Lys Asn Ile Phe Thr Phe
 660 665 670
 Asn Leu Asn Leu Asn Asp Ile Leu Asn Ser Arg Leu Lys Lys Arg Lys
 675 680 685
 Tyr Phe Leu Asp Val Leu Glu Ser Asp Leu Met Gln Phe Lys His Ile
 690 695 700
 Ser Ser Asn Glu Tyr Ile Ile Glu Asp Ser Phe Lys Leu Leu Asn Ser
 705 710 715 720
 Glu Gln Lys Asn Thr Leu Leu Lys Ser Tyr Lys Tyr Ile Lys Glu Ser
 725 730 735
 Val Glu Asn Asp Ile Lys Phe Ala Gln Glu Gly Ile Ser Tyr Tyr Glu
 740 745 750
 Lys Val Leu Ala Lys Tyr Lys Asp Asp Leu Glu Ser Ile Lys Lys Val
 755 760 765
 Ile Lys Glu Glu Lys Glu Lys Phe Pro Ser Ser Pro Pro Thr Thr Pro
 770 775 780
 Pro Ser Pro Ala Lys Thr Asp Glu Gln Lys Lys Glu Ser Lys Phe Leu
 785 790 795 800
 Pro Phe Leu Thr Asn Ile Glu Thr Leu Tyr Asn Asn Leu Val Asn Lys
 805 810 815
 Ile Asp Asp Tyr Leu Ile Asn Leu Lys Ala Lys Ile Asn Asp Cys Asn
 820 825 830
 Val Glu Lys Asp Glu Ala His Val Lys Ile Thr Lys Leu Ser Asp Leu

ES 2 638 577 T3

835 840 845
 Lys Ala Ile Asp Asp Lys Ile Asp Leu Phe Lys Asn Pro Tyr Asp Phe
 850 855 860
 Glu Ala Ile Lys Lys Leu Ile Asn Asp Asp Thr Lys Lys Asp Met Leu
 865 870 875 880
 Gly Lys Leu Leu Ser Thr Gly Leu Val Gln Asn Phe Pro Asn Thr Ile
 885 890 895
 Ile Ser Lys Leu Ile Glu Gly Lys Phe Gln Asp Met Leu Asn Ile Ala
 900 905 910
 Gln His Gln Cys Val Lys Lys Gln Ile Pro Glu Asn Ser Gly Cys Phe
 915 920 925
 Arg His Leu Asp Glu Arg Glu Glu Trp Lys Cys Leu Leu Asn Tyr Lys
 930 935 940
 Gln Glu Gly Asp Lys Cys Val Glu Asn Pro Asn Pro Thr Cys Asn Glu
 945 950 955 960
 Asn Asn Gly Gly Cys Asp Ala Asp Ala Thr Cys Thr Glu Glu Asp Ser
 965 970 975
 Gly Ser Ser Arg Lys Lys Ile Thr Cys Glu Cys Thr Lys Pro Asp Ser
 980 985 990
 Tyr Pro Leu Phe Asp Gly Ile Phe Cys Ser Ser Ser Asn Leu Ile Leu
 995 1000 1005
 Tyr Ser Phe Ile
 1010

<210> 3
 <211> 3333
 <212> ADN
 <213> Plasmodium falciparum

<400> 3

atgaagatca tcttcttcct gtgctctttc ctgttcttca tcatcaacac ccagtgcgtg 60
 acccacgaga gctaccagga gctggtgaag aagctggagg ccctggagga cgccgtgctg 120
 accggctaca gcctgttcca gaaagagaag atggtgctga acgagctggt cgacctgacc 180
 aaccacatgc tgaccctgtg cgacaacatc cacggcttca agtacctgat cgacggctac 240
 gaggagatca acgagctgct gtacaagctg aacttctact tcgacctgct gcgcgccaag 300
 ctgaacgacg tgtgcgccaa cgactactgc cagatcccct tcaacctgaa gatccgcgcc 360
 aacgagctgg acgtgctgaa gaaactggtg ttcggctacc ggaagcccct ggacaacatc 420
 aaggacaacg tgggcaagat ggaggactac atcaagaaga acaagaccac catcgccaac 480

attaacgagc	tgatcgaggg	cagcaagaaa	accatcgacc	agaacaagaa	cgccgacaac	540
gaggagggca	agaagaagct	gtaccaggcc	cagtacgacc	tgagcatcta	caacaagcag	600
ctggaggagg	cccacaacct	gatcagcgtg	ctggagaagc	ggatcgacac	cctgaagaag	660
aacgagaaca	tcaagatcaa	ggagatcgcc	aagaccatca	agttcaacat	cgactccctg	720
ttcaccgacc	ccctggagct	ggagtactac	ctgcgcgaga	agaataagaa	gatgcagatc	780
aagaagctga	ccctgctgaa	ggagcagctg	gaaagcaagc	tgaacagcct	gaacaacccc	840
cacaacgtgc	tgcagaactt	cagcgtgttc	ttcaacaaga	agaaggaggc	cgagatcgcc	900
gaaaccgaga	acaccctgga	gaataccaag	atcctgctga	agcactacaa	gggcctgggtg	960
aagtactaca	acggcgagag	cagccccctg	aaaaccctga	gcgaagtgag	catccagacc	1020
gaggacaact	acgccaacct	ggagggccaa	gtggtcaccg	gcgaggccgt	gacccccagc	1080
gtgatcgaca	acatcctgag	caagatcgag	aacgagtacg	aggtgctgta	cctgaagccc	1140
ctggccggcg	tgtacagaag	cctgaagaag	cagctggaaa	acaacgtgat	gaccttcaac	1200
gtgaacgtga	aggacatcct	gaacagccgg	ttcaacaagc	gggagaactt	caagaacgtg	1260
ctggaaagcg	acctgatccc	ctacaaggac	ctgaccagca	gcaactacgt	ggtgaaggac	1320
ccctacaagt	tcctgaacaa	agagaagcgg	gataagttcc	tgagcagcta	caactacatc	1380
aaggacagca	tcgacaccga	catcaacttc	gccaacgacg	tgctgggcta	ctacaagatc	1440
ctgagcgaga	agtacaagag	cgacctggac	agcatcaaga	agtacatcaa	cgacaagcag	1500
ggcgagaacg	agaagtacct	gcccttcctg	aataacatcg	agaccctgta	caagaccgtg	1560
aacgacaaga	tcgacctgtt	cgtgatccac	ctggaagcca	aggtgctgaa	ctacacctac	1620
gagaagagca	acgtggaggt	gaagatcaaa	gagctgaact	acctgaaaac	catccaggac	1680
aagctggccg	acttcaagaa	gaacaacaac	ttcgtcggca	tcgccgacct	gagcaccgac	1740
tacaaccaca	acaacctgct	gaccaagttc	ctgtccaccg	gcatggtggt	cgagaacctg	1800
gccaaagacag	tgctgtccaa	cctgctggac	ggcaacctgc	agggcatgct	caatatcgca	1860
cagcatcagt	gtgtcaaaaa	acagattcct	cagaactccg	gctgctttag	acacctggat	1920
gaacgggaag	aatggaagtg	tctgctcaac	tataaacagg	aaggtgataa	gtgtgtcgag	1980
aaccctaacc	ctacctgtaa	tgagaataat	gggggctgtg	atgccgatgc	caaattgtacc	2040
gaagaagatt	ccggctccaa	tggcaagaaa	atcacatgtg	aatgtaccaa	acccgactcc	2100
taccctctct	tcgatgggat	cttttgacgc	tccagtaatg	gcggcgacc	cgggggagg	2160
gaccaagtgc	tgaccggcga	agccatcagc	gtgaccatgg	ataacatcct	gagcggcttc	2220
gaaaacgaat	acgacgtgat	ctatctgaaa	cccctggccg	gcgtgtatcg	gtctctgaag	2280
aagcagatcg	agaagaacat	cttcaccttc	aatctgaacc	tgaacgatat	cctgaatagc	2340
cgcctgaaga	agcgcaagta	cttcctggac	gtgctggaga	gcgacctgat	gcagttcaag	2400
cacatcagca	gcaacgagta	catcatcgag	gacagcttca	agctgctgaa	cagcgagcag	2460
aagaacacac	tgctgaagtc	ttacaagtat	atcaaggaga	gcgtggagaa	cgatatcaag	2520

ttcgcccagg agggcatcag ctactacgag aaagtgctgg ccaagtacaa ggacgatctg 2580
gagtccatca agaaagtgat caaggaggag aaggagaagt tccccagcag cccccccacc 2640
acccccccca gccccgcaa gaccgacgag cagaagaagg agagcaagtt cctgcctttt 2700
ctgaccaata tcgagacact gtataacaac ctggtgaata agatcgacga ctacctgatc 2760
aatctgaagg ccaagatcaa cgattgcaac gtggagaagg acgaggccca cgtgaagatc 2820
accaagctga gcgatctgaa agccatcgac gataagatcg atctgttcaa gaaccctac 2880
gacttcgagg ccattaagaa gctgatcaac gacgacacca agaaggacat gctgggcaag 2940
ctgctgtcta ccggcctggt gcagaatttc cccaacacca tcatcagcaa gctgatcgaa 3000
gggaagttcc aggatatgct gaacatcgcc cagcaccagt gcgtgaagaa gcagatcccc 3060
gagaacagcg gctgcttcg gcacctggac gagcgcgagg agtggaagtg cctgctgaat 3120
tacaagcagg agggcgacaa gtgcgtggag aatcccaacc ccacctgcaa cgagaacaac 3180
ggcggctgcg acgccgacgc cacctgcacc gaggaggaca gcggcagcag ccggaagaag 3240
atcacctgcg agtgcaccaa gcccgacagc taccctctgt tcgacggcat cttctgcagc 3300
agctccaact taatattata ttcctttatc tga 3333

<210> 4
<211> 1110
<212> PRT
<213> Plasmodium falciparum

<400> 4

Met Lys Ile Ile Phe Phe Leu Cys Ser Phe Leu Phe Phe Ile Ile Asn
1 5 10 15
Thr Gln Cys Val Thr His Glu Ser Tyr Gln Glu Leu Val Lys Lys Leu
20 25 30
Glu Ala Leu Glu Asp Ala Val Leu Thr Gly Tyr Ser Leu Phe Gln Lys
35 40 45
Glu Lys Met Val Leu Asn Glu Leu Phe Asp Leu Thr Asn His Met Leu
50 55 60
Thr Leu Cys Asp Asn Ile His Gly Phe Lys Tyr Leu Ile Asp Gly Tyr
65 70 75 80
Glu Glu Ile Asn Glu Leu Leu Tyr Lys Leu Asn Phe Tyr Phe Asp Leu
85 90 95
Leu Arg Ala Lys Leu Asn Asp Val Cys Ala Asn Asp Tyr Cys Gln Ile
100 105 110
Pro Phe Asn Leu Lys Ile Arg Ala Asn Glu Leu Asp Val Leu Lys Lys
115 120 125

ES 2 638 577 T3

Leu Val Phe Gly Tyr Arg Lys Pro Leu Asp Asn Ile Lys Asp Asn Val
 130 135 140
 Gly Lys Met Glu Asp Tyr Ile Lys Lys Asn Lys Thr Thr Ile Ala Asn
 145 150 155 160
 Ile Asn Glu Leu Ile Glu Gly Ser Lys Lys Thr Ile Asp Gln Asn Lys
 165 170 175
 Asn Ala Asp Asn Glu Glu Gly Lys Lys Lys Leu Tyr Gln Ala Gln Tyr
 180 185 190
 Asp Leu Ser Ile Tyr Asn Lys Gln Leu Glu Glu Ala His Asn Leu Ile
 195 200 205
 Ser Val Leu Glu Lys Arg Ile Asp Thr Leu Lys Lys Asn Glu Asn Ile
 210 215 220
 Lys Ile Lys Glu Ile Ala Lys Thr Ile Lys Phe Asn Ile Asp Ser Leu
 225 230 235 240
 Phe Thr Asp Pro Leu Glu Leu Glu Tyr Tyr Leu Arg Glu Lys Asn Lys
 245 250 255
 Lys Met Gln Ile Lys Lys Leu Thr Leu Leu Lys Glu Gln Leu Glu Ser
 260 265 270
 Lys Leu Asn Ser Leu Asn Asn Pro His Asn Val Leu Gln Asn Phe Ser
 275 280 285
 Val Phe Phe Asn Lys Lys Lys Glu Ala Glu Ile Ala Glu Thr Glu Asn
 290 295 300
 Thr Leu Glu Asn Thr Lys Ile Leu Leu Lys His Tyr Lys Gly Leu Val
 305 310 315 320
 Lys Tyr Tyr Asn Gly Glu Ser Ser Pro Leu Lys Thr Leu Ser Glu Val
 325 330 335
 Ser Ile Gln Thr Glu Asp Asn Tyr Ala Asn Leu Glu Gly Gln Val Val
 340 345 350
 Thr Gly Glu Ala Val Thr Pro Ser Val Ile Asp Asn Ile Leu Ser Lys
 355 360 365
 Ile Glu Asn Glu Tyr Glu Val Leu Tyr Leu Lys Pro Leu Ala Gly Val
 370 375 380
 Tyr Arg Ser Leu Lys Lys Gln Leu Glu Asn Asn Val Met Thr Phe Asn
 385 390 395 400

ES 2 638 577 T3

Val Asn Val Lys Asp Ile Leu Asn Ser Arg Phe Asn Lys Arg Glu Asn
405 410 415

Phe Lys Asn Val Leu Glu Ser Asp Leu Ile Pro Tyr Lys Asp Leu Thr
420 425 430

Ser Ser Asn Tyr Val Val Lys Asp Pro Tyr Lys Phe Leu Asn Lys Glu
435 440 445

Lys Arg Asp Lys Phe Leu Ser Ser Tyr Asn Tyr Ile Lys Asp Ser Ile
450 455 460

Asp Thr Asp Ile Asn Phe Ala Asn Asp Val Leu Gly Tyr Tyr Lys Ile
465 470 475 480

Leu Ser Glu Lys Tyr Lys Ser Asp Leu Asp Ser Ile Lys Lys Tyr Ile
485 490 495

Asn Asp Lys Gln Gly Glu Asn Glu Lys Tyr Leu Pro Phe Leu Asn Asn
500 505 510

Ile Glu Thr Leu Tyr Lys Thr Val Asn Asp Lys Ile Asp Leu Phe Val
515 520 525

Ile His Leu Glu Ala Lys Val Leu Asn Tyr Thr Tyr Glu Lys Ser Asn
530 535 540

Val Glu Val Lys Ile Lys Glu Leu Asn Tyr Leu Lys Thr Ile Gln Asp
545 550 555 560

Lys Leu Ala Asp Phe Lys Lys Asn Asn Asn Phe Val Gly Ile Ala Asp
565 570 575

Leu Ser Thr Asp Tyr Asn His Asn Asn Leu Leu Thr Lys Phe Leu Ser
580 585 590

Thr Gly Met Val Phe Glu Asn Leu Ala Lys Thr Val Leu Ser Asn Leu
595 600 605

Leu Asp Gly Asn Leu Gln Gly Met Leu Asn Ile Ala Gln His Gln Cys
610 615 620

Val Lys Lys Gln Ile Pro Gln Asn Ser Gly Cys Phe Arg His Leu Asp
625 630 635 640

Glu Arg Glu Glu Trp Lys Cys Leu Leu Asn Tyr Lys Gln Glu Gly Asp
645 650 655

Lys Cys Val Glu Asn Pro Asn Pro Thr Cys Asn Glu Asn Asn Gly Gly
660 665 670

ES 2 638 577 T3

Cys Asp Ala Asp Ala Lys Cys Thr Glu Glu Asp Ser Gly Ser Asn Gly
 675 680 685
 Lys Lys Ile Thr Cys Glu Cys Thr Lys Pro Asp Ser Tyr Pro Leu Phe
 690 695 700
 Asp Gly Ile Phe Cys Ser Ser Ser Asn Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly
 705 710 715 720
 Asp Gln Val Val Thr Gly Glu Ala Ile Ser Val Thr Met Asp Asn Ile
 725 730 735
 Leu Ser Gly Phe Glu Asn Glu Tyr Asp Val Ile Tyr Leu Lys Pro Leu
 740 745 750
 Ala Gly Val Tyr Arg Ser Leu Lys Lys Gln Ile Glu Lys Asn Ile Phe
 755 760 765
 Thr Phe Asn Leu Asn Leu Asn Asp Ile Leu Asn Ser Arg Leu Lys Lys
 770 775 780
 Arg Lys Tyr Phe Leu Asp Val Leu Glu Ser Asp Leu Met Gln Phe Lys
 785 790 795 800
 His Ile Ser Ser Asn Glu Tyr Ile Ile Glu Asp Ser Phe Lys Leu Leu
 805 810 815
 Asn Ser Glu Gln Lys Asn Thr Leu Leu Lys Ser Tyr Lys Tyr Ile Lys
 820 825 830
 Glu Ser Val Glu Asn Asp Ile Lys Phe Ala Gln Glu Gly Ile Ser Tyr
 835 840 845
 Tyr Glu Lys Val Leu Ala Lys Tyr Lys Asp Asp Leu Glu Ser Ile Lys
 850 855 860
 Lys Val Ile Lys Glu Glu Lys Glu Lys Phe Pro Ser Ser Pro Pro Thr
 865 870 875 880
 Thr Pro Pro Ser Pro Ala Lys Thr Asp Glu Gln Lys Lys Glu Ser Lys
 885 890 895
 Phe Leu Pro Phe Leu Thr Asn Ile Glu Thr Leu Tyr Asn Asn Leu Val
 900 905 910
 Asn Lys Ile Asp Asp Tyr Leu Ile Asn Leu Lys Ala Lys Ile Asn Asp
 915 920 925
 Cys Asn Val Glu Lys Asp Glu Ala His Val Lys Ile Thr Lys Leu Ser
 930 935 940

Asp Leu Lys Ala Ile Asp Asp Lys Ile Asp Leu Phe Lys Asn Pro Tyr
 945 950 955 960
 Asp Phe Glu Ala Ile Lys Lys Leu Ile Asn Asp Asp Thr Lys Lys Asp
 965 970 975
 Met Leu Gly Lys Leu Leu Ser Thr Gly Leu Val Gln Asn Phe Pro Asn
 980 985 990
 Thr Ile Ile Ser Lys Leu Ile Glu Gly Lys Phe Gln Asp Met Leu Asn
 995 1000 1005
 Ile Ala Gln His Gln Cys Val Lys Lys Gln Ile Pro Glu Asn Ser
 1010 1015 1020
 Gly Cys Phe Arg His Leu Asp Glu Arg Glu Glu Trp Lys Cys Leu
 1025 1030 1035
 Leu Asn Tyr Lys Gln Glu Gly Asp Lys Cys Val Glu Asn Pro Asn
 1040 1045 1050
 Pro Thr Cys Asn Glu Asn Asn Gly Gly Cys Asp Ala Asp Ala Thr
 1055 1060 1065
 Cys Thr Glu Glu Asp Ser Gly Ser Ser Arg Lys Lys Ile Thr Cys
 1070 1075 1080
 Glu Cys Thr Lys Pro Asp Ser Tyr Pro Leu Phe Asp Gly Ile Phe
 1085 1090 1095
 Cys Ser Ser Ser Asn Leu Ile Leu Tyr Ser Phe Ile
 1100 1105 1110

<210> 5
 <211> 3093
 <212> ADN
 <213> Plasmodium falciparum

<400> 5

atgaagatca tcttcttcct gtgctctttc ctgttcttca tcatcaacac ccagtgcgtg 60
 acccacgaga gctaccagga gctggtgaag aagctggagg ccctggagga cgccgtgctg 120
 accggctaca gcctgttcca gaaagagaag atggtgctga acgagctggt cgacctgacc 180
 aaccacatgc tgaccctgtg cgacaacatc cacggcttca agtacctgat cgacggctac 240
 gaggagatca acgagctgct gtacaagctg aacttctact tcgacctgct gcgcgccaag 300
 ctgaacgacg tgtgcgcca cgactactgc cagatcccct tcaacctgaa gatccgcgcc 360
 aacgagctgg acgtgctgaa gaaactggtg ttcggctacc ggaagcccct ggacaacatc 420
 aaggacaacg tgggcaagat ggaggactac atcaagaaga acaagaccac catcgccaac 480
 attaacgagc tgatcgaggg cagcaagaaa accatcgacc agaacaagaa cgccgacaac 540

gaggagggca	agaagaagct	gtaccaggcc	cagtacgacc	tgagcatcta	caacaagcag	600
ctggaggagg	cccacaacct	gatcagcgtg	ctggagaagc	ggatcgacac	cctgaagaag	660
aacgagaaca	tcaagatcaa	ggagatcgcc	aagaccatca	agttcaacat	cgactccctg	720
ttcaccgacc	ccctggagct	ggagtactac	ctgcgcgaga	agaataagaa	gatgcagatc	780
aagaagctga	ccctgctgaa	ggagcagctg	gaaagcaagc	tgaacagcct	gaacaacccc	840
cacaacgtgc	tgcagaactt	cagcgtgttc	ttcaacaaga	agaaggaggc	cgagatcgcc	900
gaaaccgaga	acaccctgga	gaataccaag	atcctgctga	agcactacaa	gggcctgggtg	960
aagtactaca	acggcgagag	cagccccctg	aaaaccctga	gcgaagtga	catccagacc	1020
gaggacaact	acgccaacct	ggagggccaa	gtggtcaccg	gcgaggccgt	gaccacaagc	1080
gtgatcgaca	atatcctgag	caagatcgag	aacgagtagc	aagtgtctga	cctgaagcct	1140
ctggccggcg	tgtaccggag	cctgaagaaa	cagctggaga	acaacgtgat	gaccttcaac	1200
gtgaacgtga	aggacatcct	gaacagccgg	ttcaacaagc	gcgagaactt	caagaacgtg	1260
ctggagtccg	acctgatccc	ctacaaggac	ctgaccagca	gcaactacgt	ggtgaaggac	1320
ccctacaagt	tcctgaacaa	ggagaagcgc	gacaagtttc	tgtccagcta	caactacatt	1380
aaggacagca	tcgacaccga	catcaacttc	gccaacgacg	tgctgggcta	ctacaagatc	1440
ctgagcgaga	agtacaagag	cgacctggat	agcatcaaga	agtacatcaa	cgacaagcag	1500
ggcgagaacg	agaagtacct	gcccttcctg	aataacatcg	agacctgta	caagaccgtg	1560
aacgacaaga	tcgacctgtt	cgtgatccac	ctggaggcca	aagtgtctgaa	ctacacctac	1620
gagaagagca	acgtggaagt	gaagattaag	gagctgaact	acctgaaaac	catccaggac	1680
aagctggccg	acttcaagaa	gaataacaac	ttcgtgggca	tcgccgatct	gagcaccgac	1740
tacaaccaca	acaacctgct	gaccaagttc	ctgtccaccg	gcatgggtgtt	cgagaacctg	1800
ctgaagagcg	tgctgagcaa	cctgctggac	tggaagctgg	cccgtacgt	gaagcacttc	1860
accaccccc	tgcggaaaaa	gaccatgatc	cagcagagcg	gagggggacc	cgggggaggg	1920
gaccaagtgc	tgaccggcga	agccatcagc	gtgaccatgg	ataacatcct	gagcggcttc	1980
gaaaacgaat	acgacgtgat	ctatctgaaa	cccctggccg	gcgtgtatcg	gtctctgaag	2040
aagcagatcg	agaagaacat	cttcaccttc	aatctgaacc	tgaacgatat	cctgaatagc	2100
cgcctgaaga	agcgcaagta	cttcctggac	gtgctggaga	gcgacctgat	gcagttcaag	2160
cacatcagca	gcaacgagta	catcatcgag	gacagcttca	agctgtctgaa	cagcgagcag	2220
aagaacacac	tgctgaagtc	ttacaagtat	atcaaggaga	gcgtggagaa	cgatatcaag	2280
ttcgcccagg	agggcacatc	ctactacgag	aaagtgtctg	ccaagtacaa	ggacgatctg	2340
gagtccatca	agaaagtgat	caaggaggag	aaggagaagt	tccccagcag	cccccccacc	2400
acccccccca	gccccgcca	gaccgacgag	cagaagaagg	agagcaagtt	cctgcctttt	2460
ctgaccaata	tcgagacact	gtataacaac	ctggtgaata	agatcgacga	ctacctgatc	2520
aatctgaagg	ccaagatcaa	cgattgcaac	gtggagaagg	acgaggccca	cgtgaagatc	2580

accaagctga gcgatctgaa agccatcgac gataagatcg atctgttcaa gaacccttac 2640
 gacttcgagg ccattaagaa gctgatcaac gacgacacca agaaggacat gctgggcaag 2700
 ctgctgtcta ccggcctggt gcagaatttc cccaacacca tcatcagcaa gctgatcgaa 2760
 gggaagtcc aggatatgct gaacatcgcc cagcaccagt gcgtgaagaa gcagatcccc 2820
 gagaacagcg gctgcttccg gcacctggac gagcgcgagg agtggaagtg cctgctgaat 2880
 tacaagcagg agggcgacaa gtgcgtggag aatcccaacc ccacctgcaa cgagaacaac 2940
 ggcggtgctg acgccgacgc cacctgcacc gaggaggaca gcggcagcag ccggaagaag 3000
 atcacctgcg agtgcaccaa gcccgcagc taccctctgt tcgacggcat cttctgcagc 3060
 agctccaact taatattata ttcctttatc tga 3093

<210> 6
 <211> 1030
 <212> PRT
 <213> Plasmodium falciparum

<400> 6

Met Lys Ile Ile Phe Phe Leu Cys Ser Phe Leu Phe Phe Ile Ile Asn
 1 5 10 15
 Thr Gln Cys Val Thr His Glu Ser Tyr Gln Glu Leu Val Lys Lys Leu
 20 25 30
 Glu Ala Leu Glu Asp Ala Val Leu Thr Gly Tyr Ser Leu Phe Gln Lys
 35 40 45
 Glu Lys Met Val Leu Asn Glu Leu Phe Asp Leu Thr Asn His Met Leu
 50 55 60
 Thr Leu Cys Asp Asn Ile His Gly Phe Lys Tyr Leu Ile Asp Gly Tyr
 65 70 75 80
 Glu Glu Ile Asn Glu Leu Leu Tyr Lys Leu Asn Phe Tyr Phe Asp Leu
 85 90 95
 Leu Arg Ala Lys Leu Asn Asp Val Cys Ala Asn Asp Tyr Cys Gln Ile
 100 105 110
 Pro Phe Asn Leu Lys Ile Arg Ala Asn Glu Leu Asp Val Leu Lys Lys
 115 120 125
 Leu Val Phe Gly Tyr Arg Lys Pro Leu Asp Asn Ile Lys Asp Asn Val
 130 135 140
 Gly Lys Met Glu Asp Tyr Ile Lys Lys Asn Lys Thr Thr Ile Ala Asn
 145 150 155 160
 Ile Asn Glu Leu Ile Glu Gly Ser Lys Lys Thr Ile Asp Gln Asn Lys

ES 2 638 577 T3

165170175

Asn Ala Asp Asn Glu Glu Gly Lys Lys Lys Leu Tyr Gln Ala Gln Tyr
 180 185 190

Asp Leu Ser Ile Tyr Asn Lys Gln Leu Glu Glu Ala His Asn Leu Ile
 195 200 205

Ser Val Leu Glu Lys Arg Ile Asp Thr Leu Lys Lys Asn Glu Asn Ile
 210 215 220

Lys Ile Lys Glu Ile Ala Lys Thr Ile Lys Phe Asn Ile Asp Ser Leu
 225 230 235 240

Phe Thr Asp Pro Leu Glu Leu Glu Tyr Tyr Leu Arg Glu Lys Asn Lys
 245 250

Lys Met Gln Ile Lys Lys Leu Thr Leu Leu Lys Glu Gln Leu Glu Ser
 260 265 270

Lys Leu Asn Ser Leu Asn Asn Pro His Asn Val Leu Gln Asn Phe Ser
 275 280 285

Val Phe Phe Asn Lys Lys Lys Glu Ala Glu Ile Ala Glu Thr Glu Asn
 290 295 300

Thr Leu Glu Asn Thr Lys Ile Leu Leu Lys His Tyr Lys Gly Leu Val
 305 310 315 320

Lys Tyr Tyr Asn Gly Glu Ser Ser Pro Leu Lys Thr Leu Ser Glu Val
 325 330 335

Ser Ile Gln Thr Glu Asp Asn Tyr Ala Asn Leu Glu Gly Gln Val Val
 340 345 350

Thr Gly Glu Ala Val Thr Thr Ser Val Ile Asp Asn Ile Leu Ser Lys
 355 360 365

Ile Glu Asn Glu Tyr Glu Val Leu Tyr Leu Lys Pro Leu Ala Gly Val
 370 375 380

Tyr Arg Ser Leu Lys Lys Gln Leu Glu Asn Asn Val Met Thr Phe Asn
 385 390 395 400

Val Asn Val Lys Asp Ile Leu Asn Ser Arg Phe Asn Lys Arg Glu Asn
 405 410 415

Phe Lys Asn Val Leu Glu Ser Asp Leu Ile Pro Tyr Lys Asp Leu Thr
 420 425 430

Ser Ser Asn Tyr Val Val Lys Asp Pro Tyr Lys Phe Leu Asn Lys Glu

ES 2 638 577 T3

435 440 445
 Lys Arg Asp Lys Phe Leu Ser Ser Tyr Asn Tyr Ile Lys Asp Ser Ile
 450 455 460
 Asp Thr Asp Ile Asn Phe Ala Asn Asp Val Leu Gly Tyr Tyr Lys Ile
 465 470 475 480
 Leu Ser Glu Lys Tyr Lys Ser Asp Leu Asp Ser Ile Lys Lys Tyr Ile
 485 490 495
 Asn Asp Lys Gln Gly Glu Asn Glu Lys Tyr Leu Pro Phe Leu Asn Asn
 500 505 510
 Ile Glu Thr Leu Tyr Lys Thr Val Asn Asp Lys Ile Asp Leu Phe Val
 515 520 525
 Ile His Leu Glu Ala Lys Val Leu Asn Tyr Thr Tyr Glu Lys Ser Asn
 530 535 540
 Val Glu Val Lys Ile Lys Glu Leu Asn Tyr Leu Lys Thr Ile Gln Asp
 545 550 555 560
 Lys Leu Ala Asp Phe Lys Lys Asn Asn Asn Phe Val Gly Ile Ala Asp
 565 570 575
 Leu Ser Thr Asp Tyr Asn His Asn Asn Leu Leu Thr Lys Phe Leu Ser
 580 585 590
 Thr Gly Met Val Phe Glu Asn Leu Leu Lys Ser Val Leu Ser Asn Leu
 595 600 605
 Leu Asp Trp Lys Leu Ala Arg Tyr Val Lys His Phe Thr Thr Pro Met
 610 615 620
 Arg Lys Lys Thr Met Ile Gln Gln Ser Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gly
 625 630 635 640
 Asp Gln Val Val Thr Gly Glu Ala Ile Ser Val Thr Met Asp Asn Ile
 645 650 655
 Leu Ser Gly Phe Glu Asn Glu Tyr Asp Val Ile Tyr Leu Lys Pro Leu
 660 665 670
 Ala Gly Val Tyr Arg Ser Leu Lys Lys Gln Ile Glu Lys Asn Ile Phe
 675 680 685
 Thr Phe Asn Leu Asn Leu Asn Asp Ile Leu Asn Ser Arg Leu Lys Lys
 690 695 700
 Arg Lys Tyr Phe Leu Asp Val Leu Glu Ser Asp Leu Met Gln Phe Lys

ES 2 638 577 T3

705		710		715		720
His Ile Ser Ser	Asn Glu Tyr Ile Ile	Glu Asp Ser Phe Lys	Leu Leu			
	725			730		735
Asn Ser Glu Gln	Lys Asn Thr Leu	Leu Lys Ser Tyr Lys	Tyr Ile Lys			
	740		745		750	
Glu Ser Val	Glu Asn Asp Ile	Lys Phe Ala Gln Glu	Gly Ile Ser Tyr			
	755		760		765	
Tyr Glu Lys Val	Leu Ala Lys Tyr Lys Asp Asp	Leu Glu Ser Ile Lys				
	770		775		780	
Lys Val Ile Lys Glu	Glu Lys Glu Lys Phe	Pro Ser Ser Pro Pro	Thr			
	785		790		795	800
Thr Pro Pro Ser	Pro Ala Lys Thr Asp	Glu Gln Lys Lys Glu	Ser Lys			
	805		810		815	
Phe Leu Pro	Phe Leu Thr Asn Ile	Glu Thr Leu Tyr Asn	Asn Leu Val			
	820		825		830	
Asn Lys Ile Asp Asp Tyr	Leu Ile Asn Leu Lys Ala	Lys Ile Asn Asp				
	835		840		845	
Cys Asn Val Glu Lys Asp	Glu Ala His Val Lys	Ile Thr Lys Leu Ser				
	850		855		860	
Asp Leu Lys Ala Ile Asp Asp Lys Ile Asp	Leu Phe Lys Asn Pro Tyr					
	865		870		875	880
Asp Phe Glu Ala Ile Lys Lys Leu Ile	Asn Asp Asp Thr Lys	Lys Asp				
	885		890		895	
Met Leu Gly Lys Leu Leu Ser Thr	Gly Leu Val Gln Asn	Phe Pro Asn				
	900		905		910	
Thr Ile Ile Ser Lys Leu Ile	Glu Gly Lys Phe Gln Asp	Met Leu Asn				
	915		920		925	
Ile Ala Gln His Gln Cys Val Lys Lys Gln Ile	Pro Glu Asn Ser Gly					
	930		935		940	
Cys Phe Arg His Leu Asp Glu Arg Glu Glu	Trp Lys Cys Leu Leu Asn					
	945		950		955	960
Tyr Lys Gln Glu Gly Asp Lys Cys Val	Glu Asn Pro Asn Pro	Thr Cys				
	965		970		975	
Asn Glu Asn Asn Gly Gly Cys Asp Ala Asp Ala Thr Cys Thr Glu Glu						

ES 2 638 577 T3

980

985

990

Asp Ser Gly Ser Ser Arg Lys Lys Ile Thr Cys Glu Cys Thr Lys Pro
995 1000 1005

Asp Ser Tyr Pro Leu Phe Asp Gly Ile Phe Cys Ser Ser Ser Asn
1010 1015 1020

Leu Ile Leu Tyr Ser Phe Ile
1025 1030

<210> 7

<211> 1947

5 <212> ADN

<213> CMV

<400> 7

tgtgagtttc tgtgtaactg atatcgccat ttttccaaaa gtgatttttg ggcatacgcg	60
atatctggcg atagcgctta tatcgtttac gggggatggc gatagacgac tttggtgact	120
tgggcgattc tgtgtgtcgc aaatatcgca gtttcgatat aggtgacaga cgatatgagg	180
ctatatcgcc gatagaggcg acatcaagct ggcacatggc caatgcatat cgatctatac	240
attgaatcaa tattggccat tagccatatt attcattggg tatatagcat aaatcaatat	300
tggctattgg ccattgcata cgttgatatcc atatcataat atgtacattt atattggctc	360
atgtccaaca ttaccgccat gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat	420
tacggggta ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa	480
tggcccgctt ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt	540
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta	600
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgt tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt	660
caatgacggg aaatggccc cctggcatta tgeccagtac atgaccttat gggactttcc	720
tacttggcag tacatctacg tatttagtcat cgctattacc atgggtgatgc ggttttggca	780
gtacatcaat gggcggtgat agcggtttga ctacgggga tttccaagtc tccaccccat	840
tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa	900
caactccgcc ccattgacgc aaatgggagg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag	960
cagagctcgt ttagtgaacc gtcagatcgc ctggagacgc catccacgct gttttgacct	1020
ccatagaaga caccgggacc gatccagcct ccgcgccgg gaacgggtgca ttggaacgcg	1080
gattccccgt gccaaagagt acgtaagtac cgcctataga gtctataggc ccacccccct	1140
ggcttcttat gcatgctata ctgttttttg cttgggggtct atacaccccc gcttctcat	1200
gttatagggt atggtatagc ttagcctata ggtgtgggtt attgaccatt attgaccact	1260
ccccatttgg tgacgatact ttccattact aatccataac atggctcttt gccacaactc	1320
tctttatttg ctatatgcca atacactgtc cttcagagac tgacacggac tctgtatttt	1380
tacaggatgg ggtctcattt attatttaca aattcacata tacaacacca ccgtccccag	1440
tgcccgcagt ttttattaaa cataacgtgg gatctccacg cgaatctcgg gtacgtgttc	1500
cggacatggg ctcttctccg gtagcggcgg agcttctaca tccgagccct gctcccatgc	1560
ctccagcgac tcatggtcgc tcggcagctc cttgctccta acagtggagg ccagacttag	1620
gcacagcacg atgcccacca ccaccagtgt gccgcacaag gccgtggcgg tagggatatgt	1680
gtctgaaaat gagctcgggg agcgggcttg caccgtgac gcatttgga gacttaaggc	1740
agcggcagaa gaagatgcag gcagctgagt tgttgtgttc tgataagagt cagaggtaac	1800
tcccgttgcg gtgctgttaa cgggtggagg cagtgtagtc tgagcagtac tcgttgctgc	1860
cgcgcgcc accagacata atagctgaca gactaacaga ctgttccttt ccatgggtct	1920
tttctgcagt caccgtcctt gacacga	1947

REIVINDICACIONES

1. Un vector adenoviral que comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica un patógeno o antígeno tumoral bajo el control de dicho promotor, donde dicho promotor comprende un elemento regulador del promotor IE1 del CMV y el potenciador del promotor IE1 de CMV y un fragmento de la región 5' no traducida del gen IE1 del CMV que incluye el intrón A y excluye el exón B y el intrón B, donde el elemento regulador, el potenciador y el fragmento de la región no traducida del gen IE1 del CMV del promotor tienen una longitud total de 1,9 kb y donde dicho antígeno no es un antígeno del parásito del paludismo murino.
2. El vector adenoviral de acuerdo con la reivindicación 1, donde el vector adenoviral es un vector adenoviral de simio, preferentemente un vector AdC6 (C6), AdC7 (C7), o AdC9 (C9) (también conocido como SAdV-23, SAdV-24 y SAdV-25, respectivamente).
3. El vector adenoviral de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el promotor tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 7.
4. El vector adenoviral de acuerdo con la cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el antígeno proviene de un patógeno que causa paludismo, preferentemente un antígeno del paludismo pre-eritrocítico o de fase sanguínea, más preferentemente la proteína de adhesión relacionada con trombospondina de cadena múltiple-epítipo (ME-TRAP), proteína del circumsporozoíto (CSP), proteína 1 de la superficie del merozoíto (MSP-1) o fragmentos de las mismas o antígeno 1 de la membrana apical (AMA1).
5. El vector adenoviral de acuerdo con la reivindicación 4, donde el antígeno del paludismo es una proteína 1 de la superficie del merozoíto que tiene la secuencia de PfM117 (SEQ ID NO. 1) o PfM128 (SEQ ID NO. 3).
6. El vector adenoviral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el antígeno es un antígeno de micobacterias, preferentemente un antígeno de *M. tuberculosis*, más preferentemente el antígeno 85A de *M. tuberculosis*.
7. Una composición inmunogénica que comprende el vector adenoviral de una cualquiera de una de las reivindicaciones 1 a 6 mezclado con uno o más vehículos, transportadores, diluyentes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.
8. Un vector adenoviral que comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica un patógeno o antígeno tumoral bajo el control de dicho promotor, donde dicho promotor comprende un elemento regulador del promotor IE1 del CMV y el potenciador del promotor IE1 de CMV y un fragmento de la región 5' no traducida del gen IE1 del CMV que incluye el intrón A y excluye el exón B y el intrón B, donde el elemento regulador, el potenciador y el fragmento de la región no traducida del gen IE1 del CMV del promotor tienen una longitud total de 1,9 kb para su uso como medicamento o vacuna.
9. Uso de un vector adenoviral que comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno de paludismo bajo el control de dicho promotor, donde dicho promotor comprende un elemento regulador y el potenciador del promotor IE1 del CMV y un fragmento de la región 5' no traducida del gen IE1 del CMV que incluye el intrón A y excluye el exón B y el intrón B, donde el elemento regulador, el potenciador y el fragmento de la región no traducida del gen IE1 del CMV del promotor tienen una longitud total de 1,9 kb en la fabricación de una vacuna o inmunoterapéutico para la prevención o el tratamiento del paludismo.
10. Uso de un vector adenoviral que comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno de *M. tuberculosis* bajo el control de dicho promotor, donde dicho promotor comprende un elemento regulador del promotor IE1 del CMV y el potenciador del promotor IE1 de CMV y un fragmento de la región 5' no traducida del gen IE1 del CMV que incluye el intrón A y excluye el exón B y el intrón B, donde el elemento regulador, el potenciador y el fragmento de la región no traducida del gen IE1 del CMV del promotor tienen una longitud total de 1,9 kb en la fabricación de una vacuna o inmunoterapéutico para la prevención o el tratamiento de la tuberculosis.
11. Un vector adenoviral que comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno de paludismo bajo el control de dicho promotor, donde dicho promotor comprende un elemento regulador del promotor IE1 del CMV y el potenciador del promotor IE1 de CMV y un fragmento de la región 5' no traducida del gen IE1 del CMV que incluye el intrón A y excluye el exón B y el intrón B, donde el elemento regulador, el potenciador y el fragmento de la región no traducida del gen IE1 del CMV del promotor tienen una longitud total de 1,9 kb para su uso en la prevención o tratamiento del paludismo.
12. Un vector adenoviral que comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno de *M. tuberculosis* bajo el control de dicho promotor, donde dicho promotor comprende un elemento regulador del promotor IE1 del CMV y el potenciador del promotor IE1 de CMV y un fragmento de la región 5' no traducida del gen IE1 del CMV que incluye el intrón A y excluye el exón B y el intrón B, donde el elemento regulador, el potenciador y el fragmento de la región no traducida del gen IE1 del CMV del promotor tienen una longitud total de 1,9 kb para su

uso en la prevención o tratamiento de la tuberculosis.

13. Un producto, combinación o kit que comprende:

- 5 a) una composición de sensibilización que comprende un vector adenoviral que comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica un patógeno o antígeno tumoral bajo el control de dicho promotor, donde dicho promotor comprende un elemento regulador del promotor IE1 del CMV y el potenciador del promotor IE1 de CMV y un fragmento de la región 5' no traducida del gen IE1 del CMV que incluye el intrón A y excluye el exón B y el intrón B, donde el elemento regulador, el potenciador y el fragmento de la región no traducida del gen
- 10 IE1 del CMV del promotor tienen una longitud total de 1,9 kb; y
- b) una composición de refuerzo que comprende un vector de virus de la viruela recombinante, comprendiendo dicho vector de viruela que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un patógeno o antígeno tumoral que es el mismo que al menos un antígeno de la composición de sensibilización.

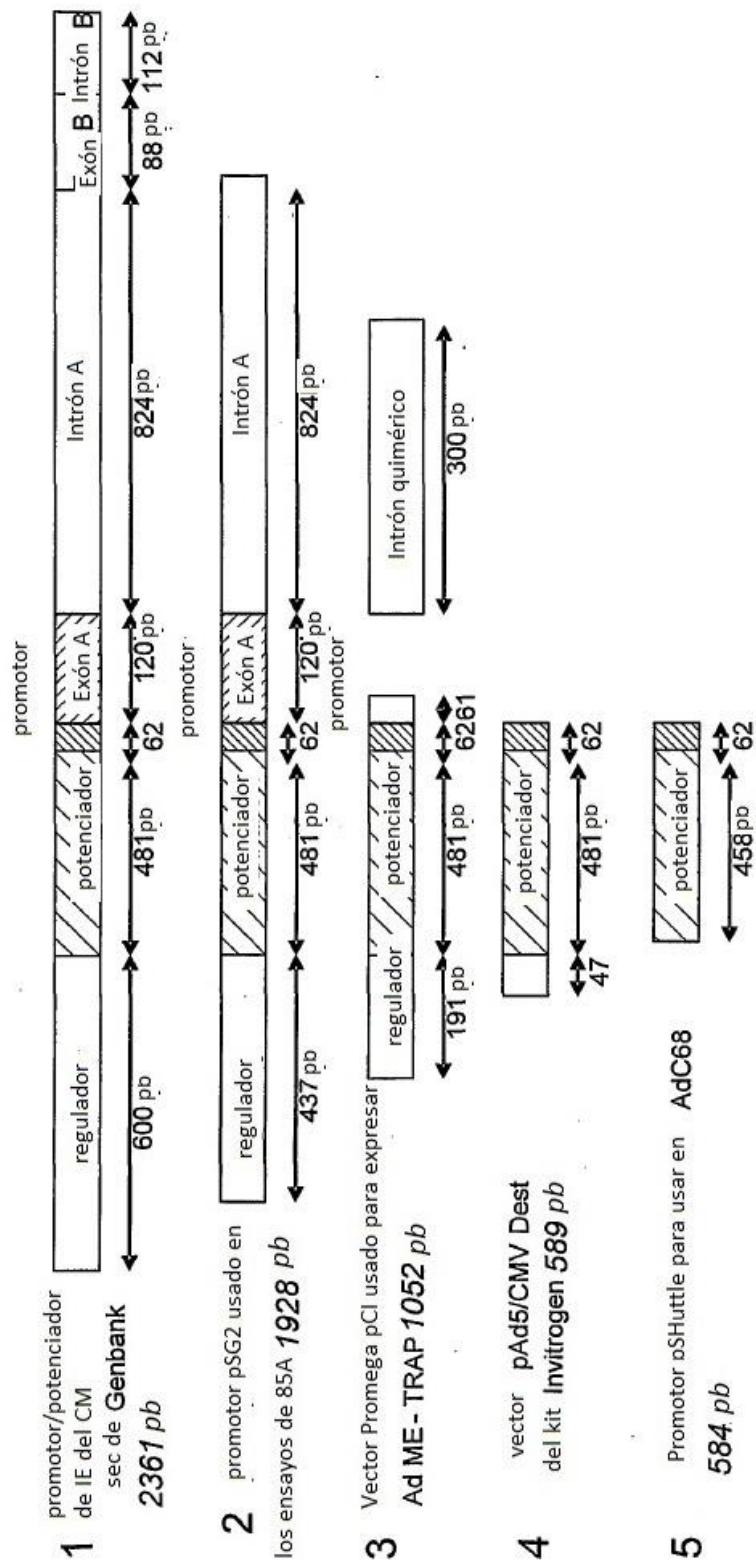


FIG. 1

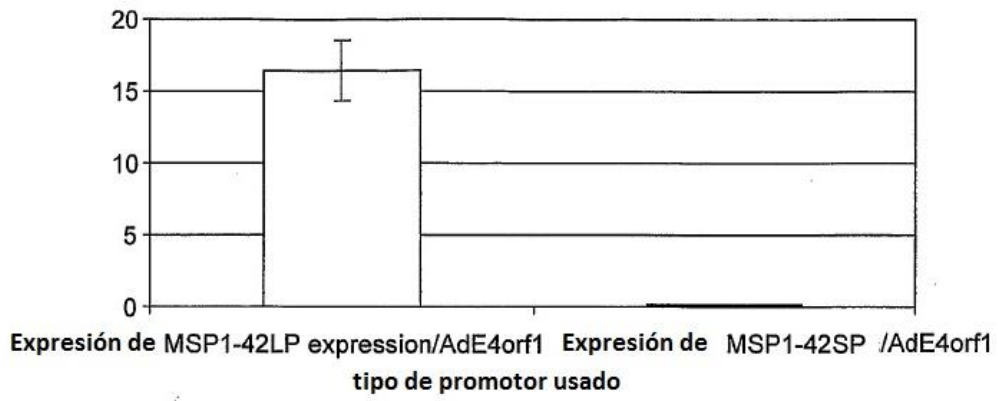


FIG. 2a

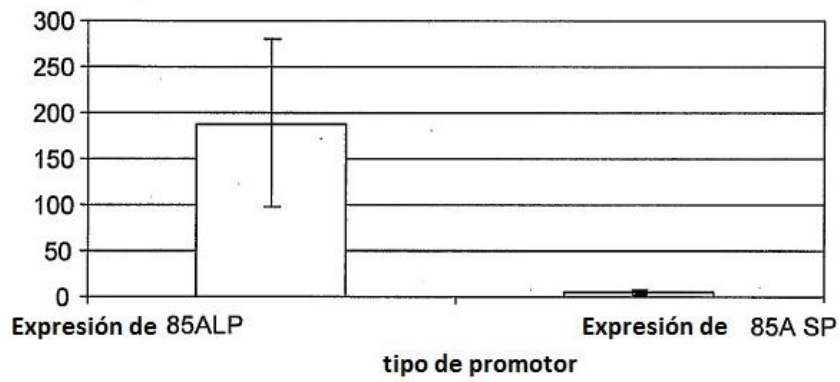


FIG. 2b

FIG. 3



Control no infectado

Ad.H5.MSP1-42 SP

Ad.H5.MSP1-42 LP

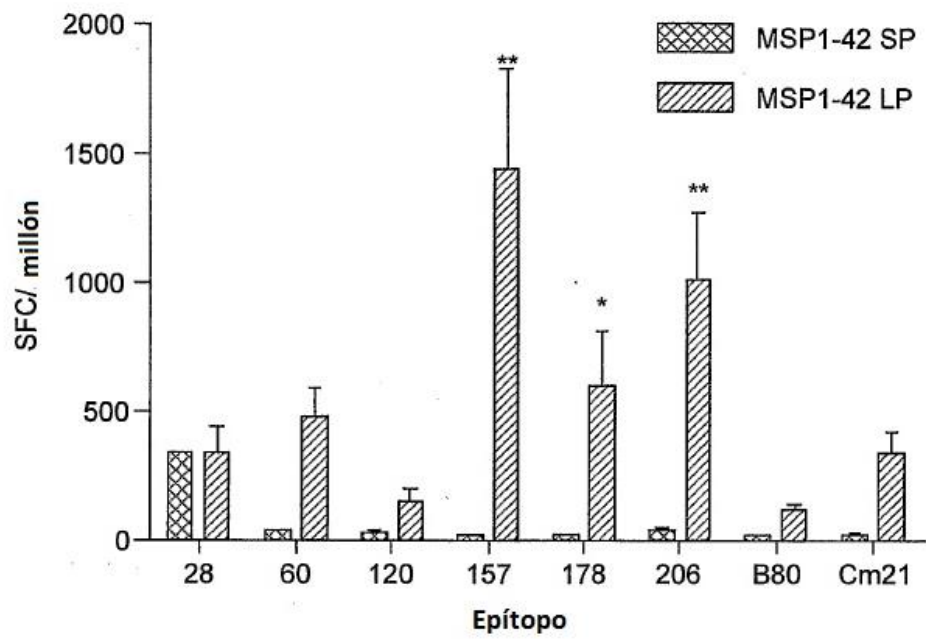


FIG. 4a

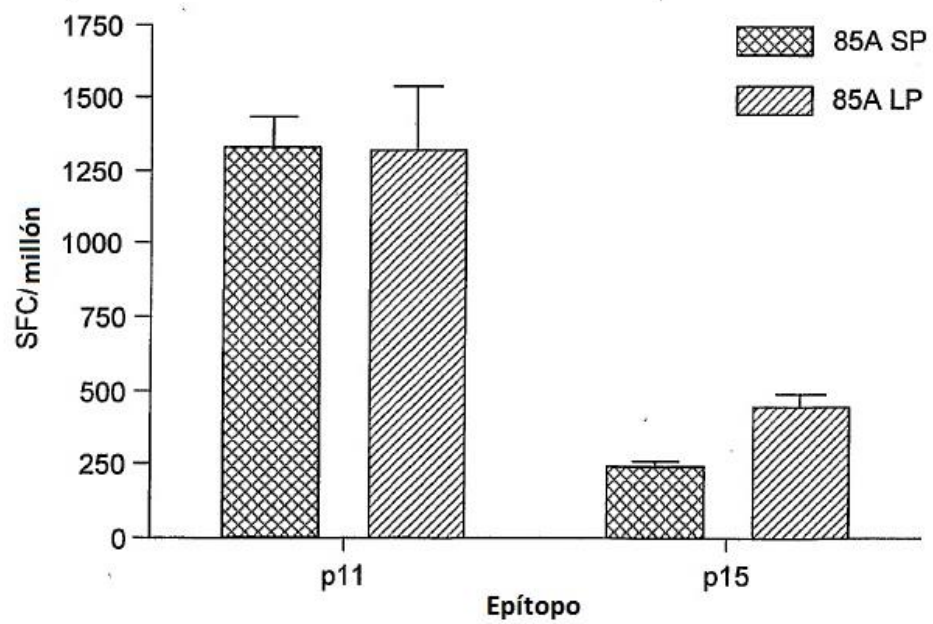
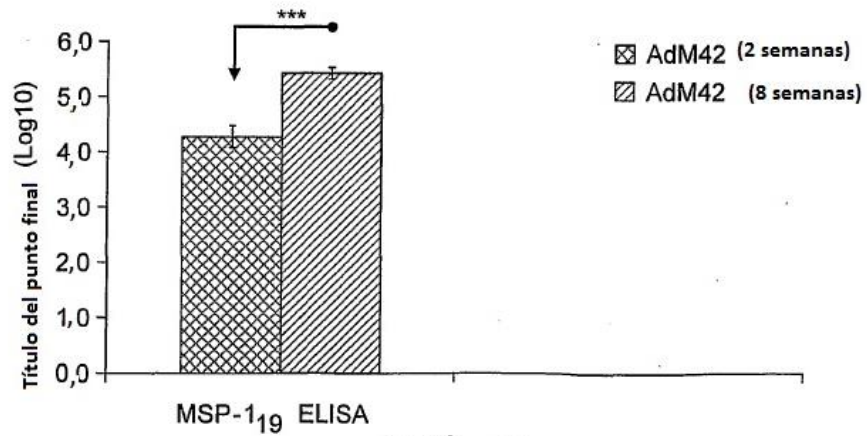
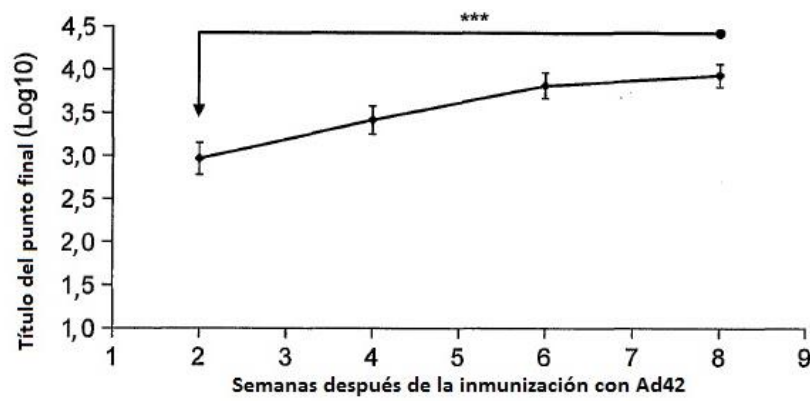
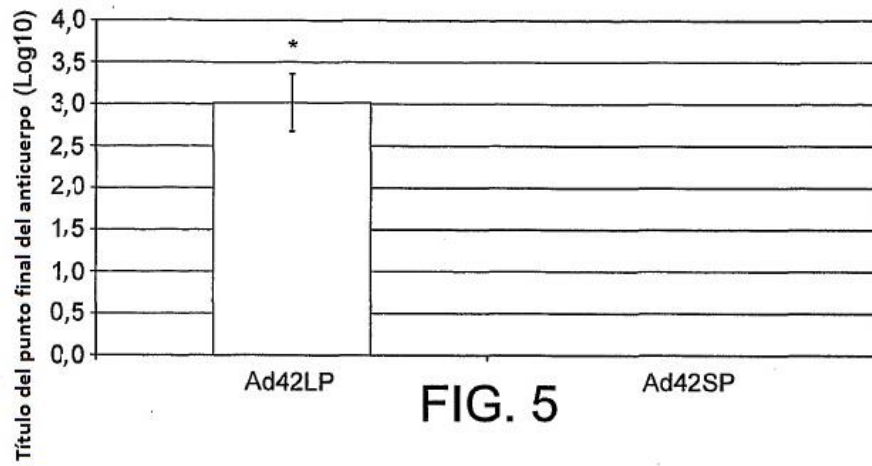


FIG. 4b



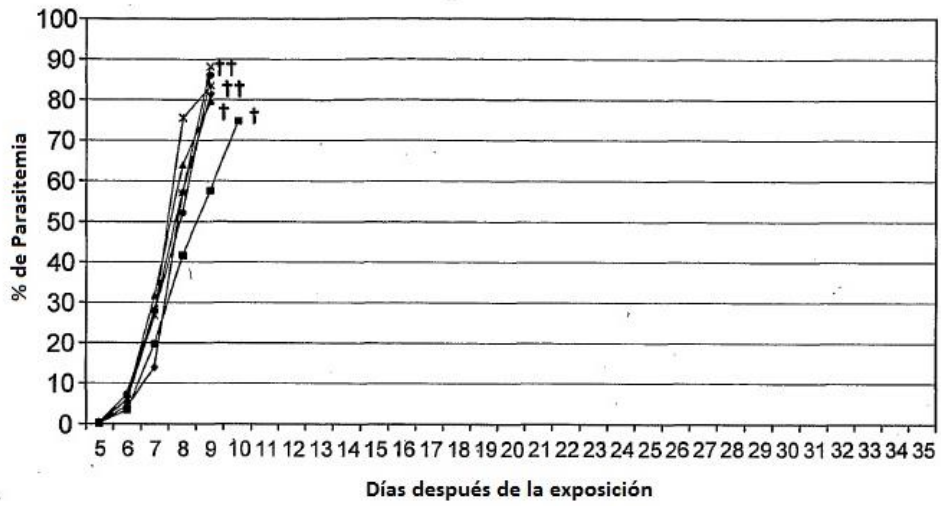


FIG. 8a

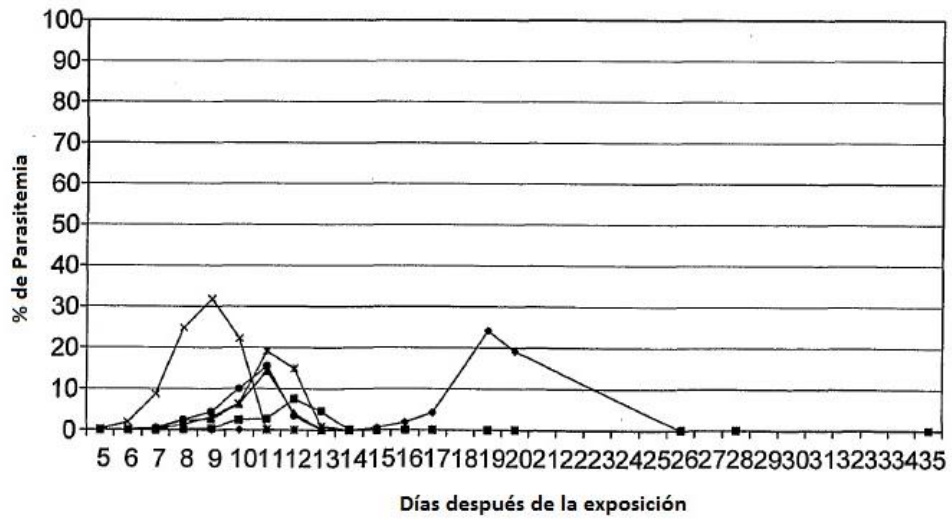


FIG. 8b

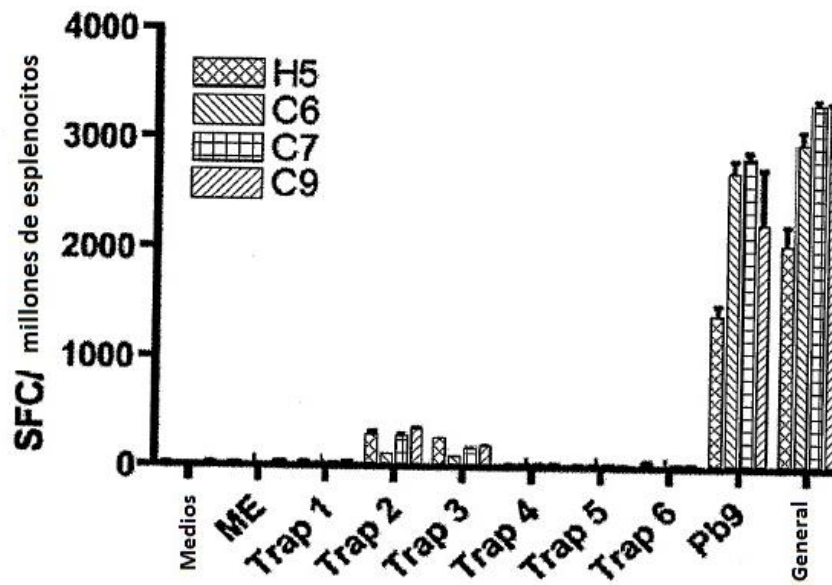


FIG. 9a

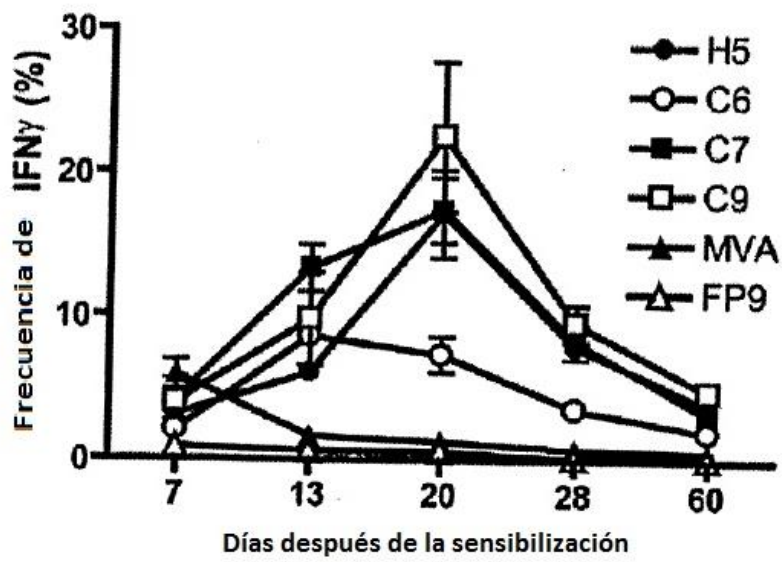


FIG. 9b

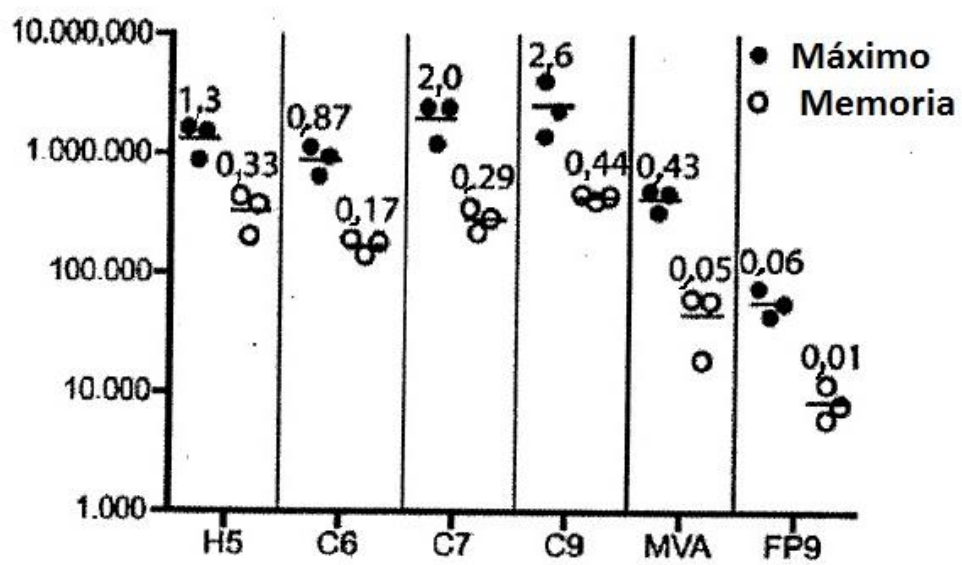


FIG. 9c

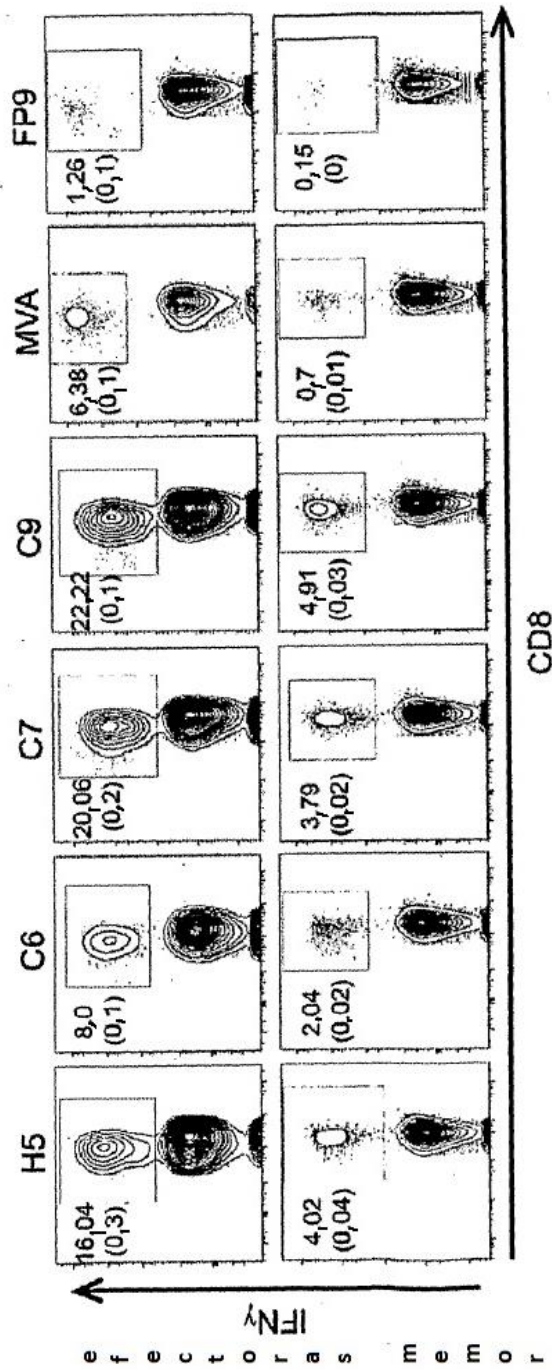


FIG. 9d

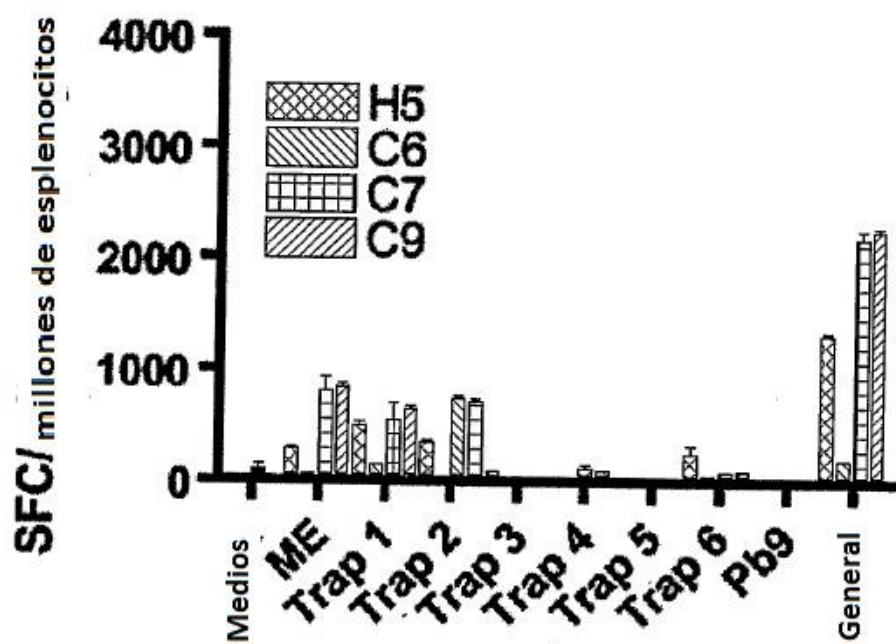


FIG. 10a

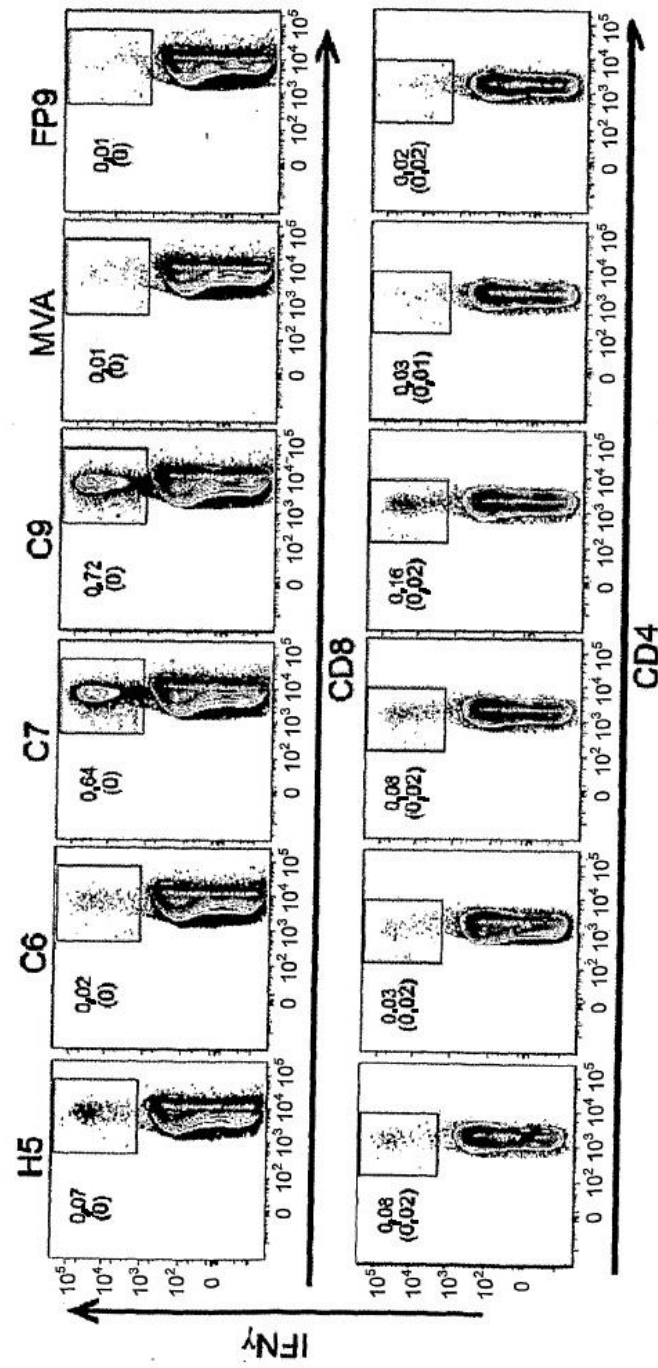


FIG. 10b

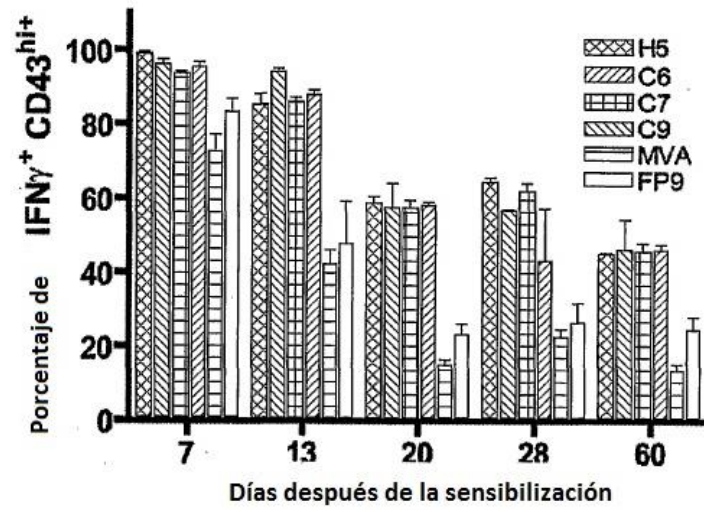


FIG. 11a

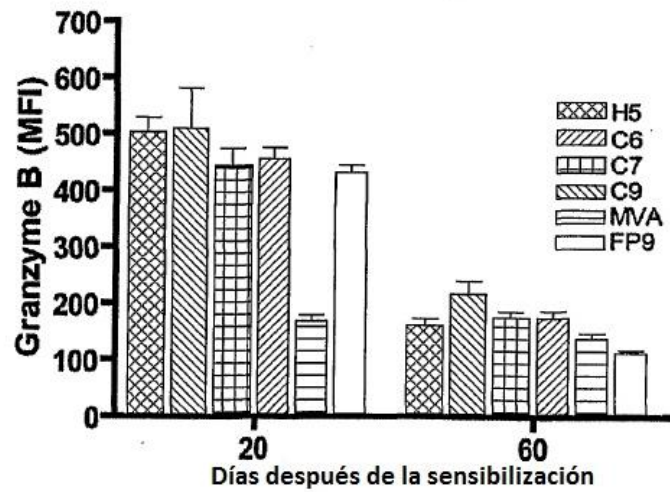


FIG. 11b

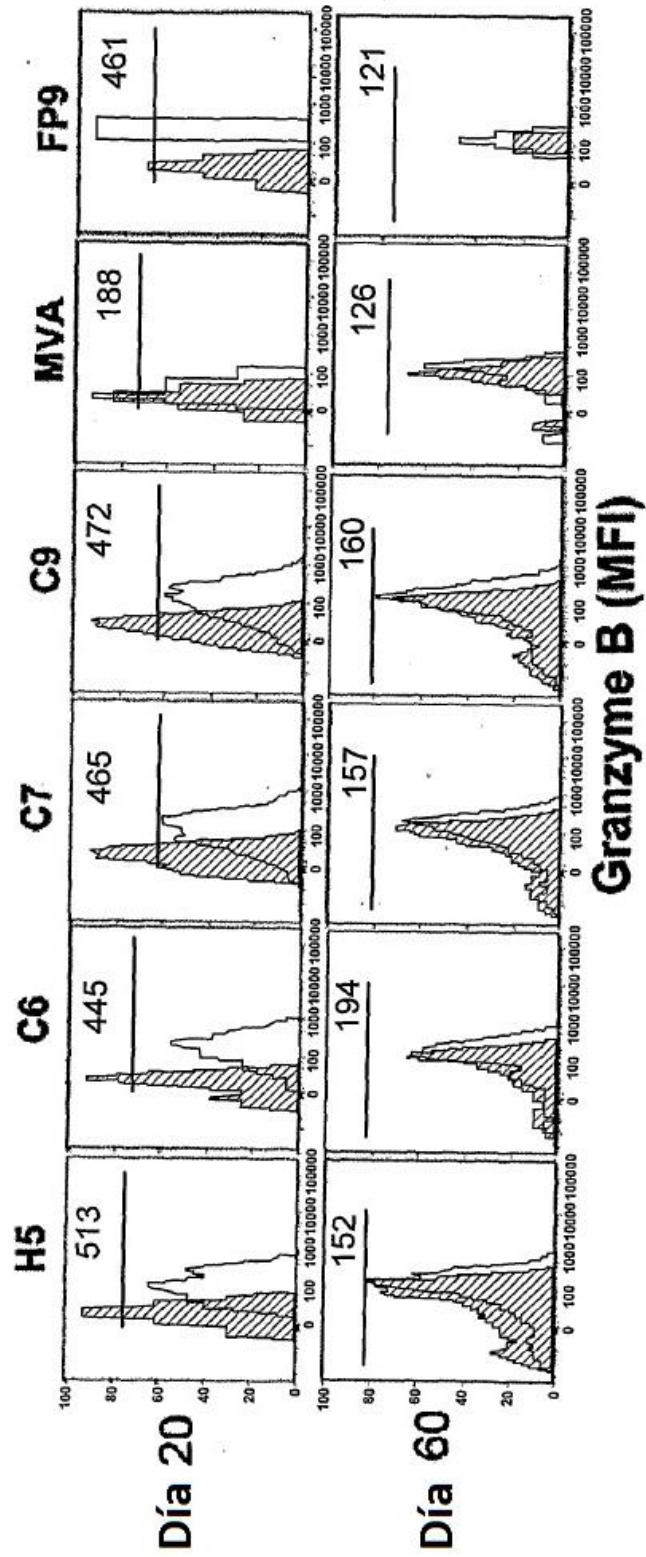


FIG. 11c

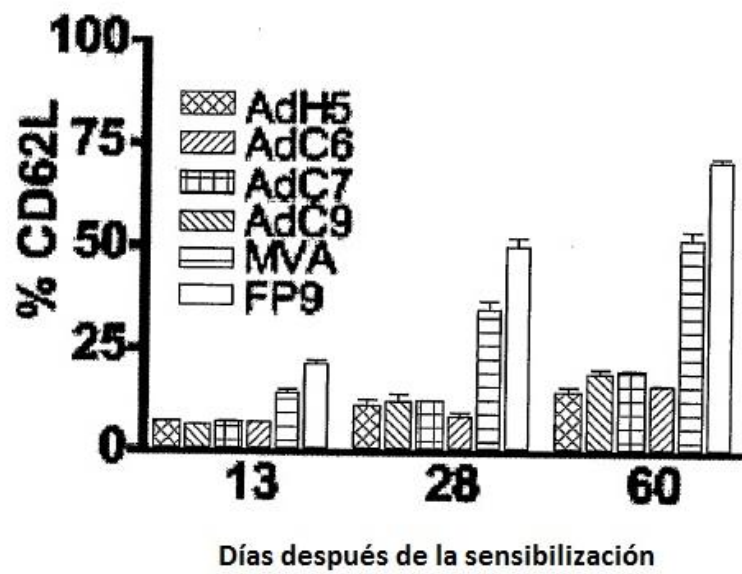


FIG. 12a

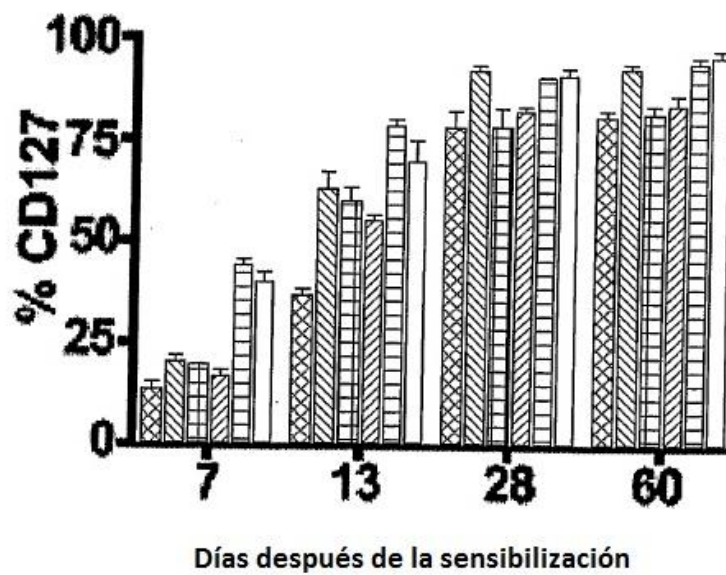


FIG. 12b

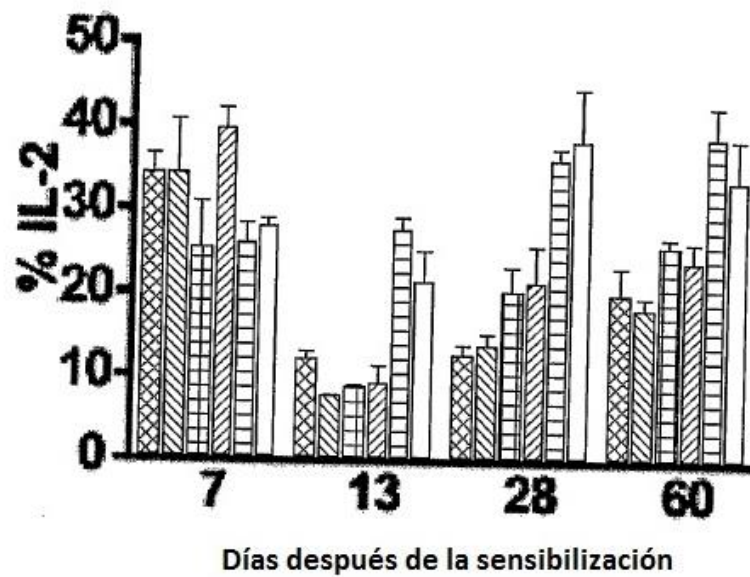


FIG. 12c

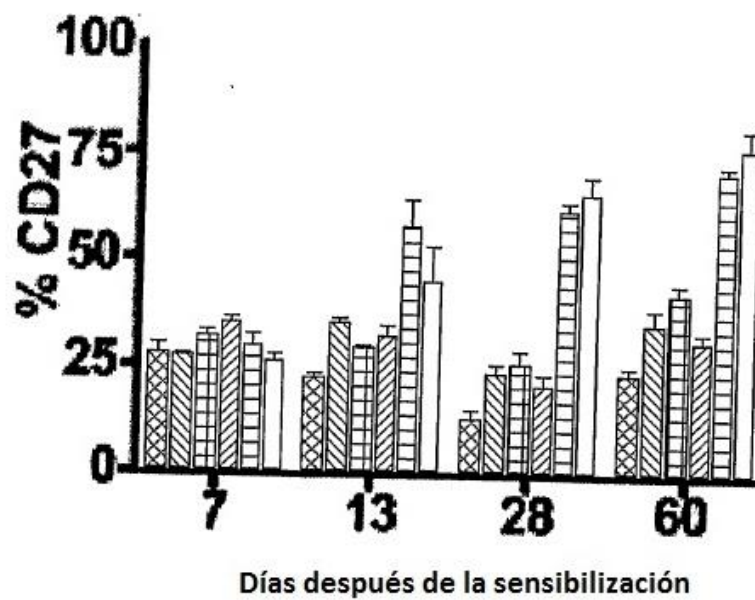


FIG. 12d

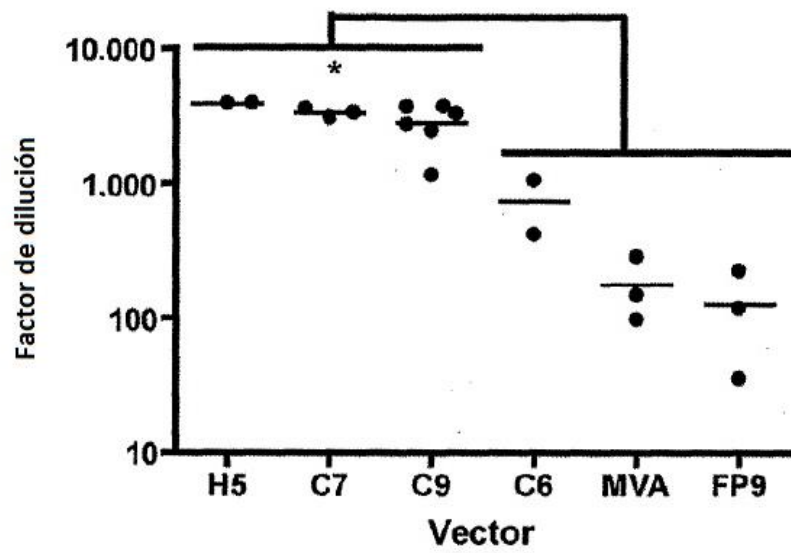


FIG. 13

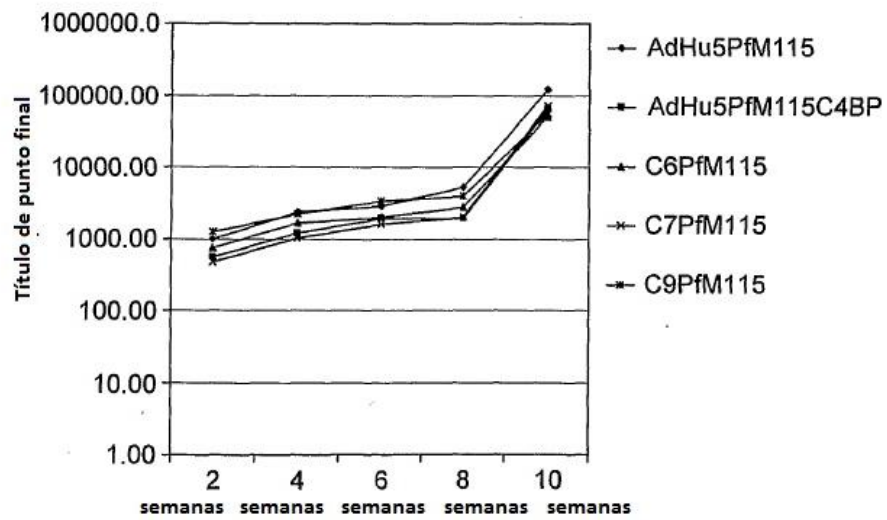


FIG. 14

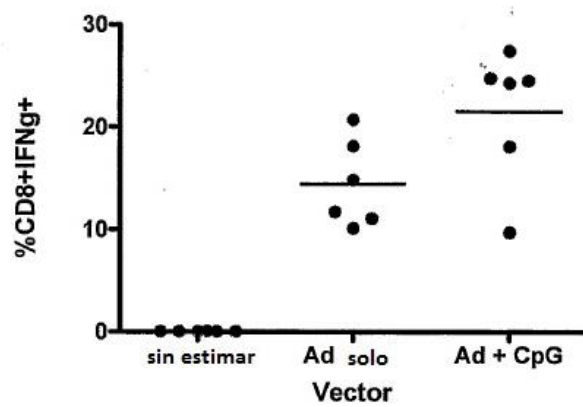


FIG. 15a

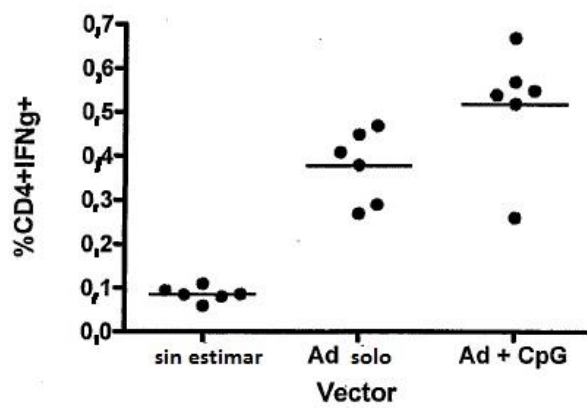


FIG. 15b