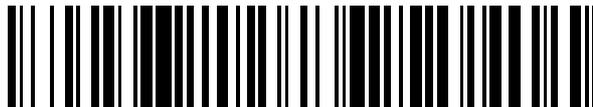


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 614**

51 Int. Cl.:

A61K 39/015 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2010 PCT/US2010/020564**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.07.2010 WO10083111**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2010 E 10731974 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2387416**

54 Título: **Plasmodium purificado y composiciones de vacuna**

30 Prioridad:

16.01.2009 US 202001 P

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

03.11.2017

73 Titular/es:

**SANARIA INC. (100.0%)
9800 Medical Center Drive - A209
Rockville, MD 20850, US**

72 Inventor/es:

**SIM, B., KIM LEE;
LI, MINGLIN;
STAFFORD, RICHARD, E. y
HOFFMAN, STEPHEN, L.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 640 614 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

Plasmodium purificado y composiciones de vacuna

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

5 Esta solicitud se refiere a la purificación de parásitos de estadios de esporozoítos de Plasmodium. Más particularmente, se refiere a parásitos sustancialmente puros y métodos para prepararlos y usarlos. Esta solicitud se refiere también a composiciones vacunales y farmacéuticas de parásitos de Plasmodium de estadios esporozoítos purificados, tanto atenuados como no atenuados, y métodos para usar las composiciones en vacunas y otras preparaciones para prevenir la malaria y otras enfermedades, tratar enfermedades y como medio de infectar a voluntarios en las pruebas de las vacunas y medicamentos contra la malaria.

Antecedentes de la técnica

15 La malaria es una enfermedad que se estima que afecta a 300-500 millones de personas y que mata a 1-3 millones de personas al año. También tiene un enorme impacto económico en las personas del mundo en desarrollo, especialmente en África subsahariana. El Plasmodium falciparum provoca la mayoría de las muertes por malaria en el mundo. La Organización Mundial del Turismo informó que de las cerca de 700 millones de llegadas de turistas internacionales registradas en todo el mundo en 2000, aproximadamente 9 millones correspondían a África occidental, central u oriental, 37 millones a Asia sudoriental, 6 millones a Asia meridional y 10 millones a Oceanía. Se calcula que más de 30.000 viajeros de América del Norte, Europa y Japón contraen la malaria por año. Durante más de 100 años durante todas las campañas militares llevadas a cabo donde la malaria era transmitida, las fuerzas estadounidenses han tenido más víctimas de la malaria que del fuego hostil. Se calcula que se perdieron 12.000.000 de persona días durante la Segunda Guerra Mundial y 1,2 millones durante el conflicto de Vietnam debido a la malaria.

25 La transmisión del parásito de Plasmodium ocurre a través de la mordedura y de la alimentación de los mosquitos femeninos infectados de Anopheles que son activos del crepúsculo al amanecer. El plasmodio, en el estadio de desarrollo de los esporozoítos, migra del sitio de la picadura al hígado, principalmente a través del torrente sanguíneo, donde se multiplican dentro de los hepatocitos, produciendo, en el caso de P. falciparum, aproximadamente 10.000-40.000 progenies por célula infectada. Estos parásitos de la etapa hepática expresan algunas proteínas que no se expresan en la etapa de los esporozoítos. En esta etapa, los parásitos vuelven a entrar en el torrente sanguíneo como merozoítos, expresando algunas proteínas que son diferentes de las expresadas durante las etapas de los esporozoítos y hepáticas tempranas, e invaden los eritrocitos, donde la multiplicación adicional aumenta el número de parásitos en aproximadamente 10 a 20 veces cada 48 horas. A diferencia de los cinco a diez días de desarrollo en el hígado, que no inducen ningún síntoma o signos de malaria, la infección no tratada de la fase sanguínea provoca hemólisis, escalofríos temblorosos, fiebres altas y postración. En el caso de P. falciparum, la más peligrosa de las cuatro especies principales de Plasmodium que causan la enfermedad humana (P. vivax, P. malariae y P. ovale [P. knowlesi también puede causar la enfermedad humana]), la enfermedad es complicada por la interrupción del flujo sanguíneo microcirculatorio y los cambios metabólicos en órganos vitales tales como el cerebro, los riñones y los pulmones, lo que frecuentemente conduce a la muerte si no se trata urgentemente.

40 Una vacuna eficaz contra la malaria por P. falciparum sigue siendo uno de los grandes retos de la medicina. A pesar de los más de cien años de esfuerzo, cientos de millones de dólares en investigación, sacrificios de toda la vida de médicos y científicos dedicados y muchas vacunas experimentales prometedoras, no hay ninguna vacuna comercializada para aliviar uno de los grandes flagelos infecciosos de la humanidad.

45 Hace una generación, las iniciativas de salud pública que empleaban cloroquina, DDT y programas de control de vectores parecieron estar a punto de consignar la malaria por falciparum a la insignificancia como una amenaza mundial. La falta de una vacuna efectiva complicó estos esfuerzos, pero un control sostenible parecía inminente.

50 La promesa del éxito inminente fue de corta duración y las razones del fracaso fueron multifactoriales. Los parásitos se hicieron cada vez más resistentes a los medicamentos antipalúdicos altamente efectivos y asequibles, las medidas de control de vectores decayeron y la transmigración, la guerra y las perturbaciones económicas se hicieron cada vez más comunes en las zonas endémicas del mundo en desarrollo. Como resultado, la malaria por P. falciparum resurgió, colocando anualmente a al menos 2.500 millones de seres humanos en riesgo, causando 300-900 millones de infecciones y matando a 1-3 millones de personas. De los muchos problemas sociales, económicos, ambientales y políticos que afligen al mundo en desarrollo, la malaria por P. falciparum es cada vez más vista como una causa fundamental y un resultado cruel de estas desigualdades, y es un impedimento singular para resolver estos problemas complejos. El control de la malaria por P. falciparum en el mundo en desarrollo puede no ser posible sin una vacuna eficaz. En la práctica, dadas las realidades sociales, políticas y económicas, los inventores creen que una vacuna puede ser un componente esencial de un programa de control sostenible y que será necesaria para una campaña mundial de erradicación.

Durante los últimos 25 años, la mayor parte de los esfuerzos de investigación se han dedicado a identificar las subunidades antigénicas del parásito que confieren inmunidad - lamentablemente, con resultados poco satisfactorios. Este esfuerzo y las dificultades concomitantes en el desarrollo de una vacuna adecuada se han descrito (Nussenzweig V., F. y R. S. Nussenzweig, *Adv. Immunol.*, (1989) 45: 283 - 334; Hoffman S.L. et al. En: Hoffman S.L., ed. "Malaria Vaccine Development: A Multi-Immune Response Approach" (1996) Washington, D. C: ASM Press, pp. 35-75; Hoffman S.L. y L.H. Miller, En: Hoffman S. L., ed. "Malaria Vaccine Development: A Multi-Immune Response Approach". (1996) Washington, D. C: ASM Press, pp. 1-13; Epstein, J.E. et al., *Curr. Opin. Mol. Ther.* (2007) 9: 12-24; Richie, T.L. & A. Saul, *Nature*, (2002) 415: 694 - 701).

Hay esfuerzos continuos para producir vacunas de malaria subunitarias. Típico de tales intentos se encuentra en Paoletti et al. (documento de EE.UU. 5.766.597, publicado el 16/6/98), que describe un poxvirus recombinante que contiene ADN de Plasmodium que codifica una o más proteínas circumsporozoítas, incluyendo una realización denominada NYVAC - Pf7, posiblemente útil como vacuna potencial contra la malaria. Los ensayos subsecuentes de esta construcción resultaron ser decepcionantes (Ockenhouse, C.F. et al., *J. Infect. Dis.* (1998)177: 1664 - 73).

De forma similar, se propuso otra vacuna de circumsporozoito subunitaria candidata y se identificó como RTS, S/AS02A (Stoute J.A. et al., *J. Infect. Dis.* (1998) 178: 1139 - 44). Los resultados del primer ensayo de campo de la Fase 2b de esta vacuna en niños de un año a cuatro años en Mozambique fueron publicados (Alonso, P.L. et al. *Lancet* (2004) 364:1411-1420; Alonso, P.L. et al., *Lancet* (2005) 366: 2012-2018, Epstein, JE et al., *Supra*, Richie, T.L., F. y A. Saul, *Supra*), así como los resultados de otros ensayos de campo de fase 2b en infantes (Aponte, J.J. et al. 2007) *The Lancet* 370: 1543 - 1551; Bejon, P. et al. (2008) *NEJM* 359: 2521 - 32; Abdullah, S et al (2008) *NEJM* 359: 2533-44. La vacuna ha demostrado una eficacia protectora modesta.

Por otro lado, la demostración de la efectividad de todo el parásito, esporozoítos atenuados por radiación (suministrados a huéspedes humanos por la exposición a mosquitos y a animales hospedantes por inoculación intravenosa (iv)) que confieren altos niveles de inmunidad protectora cuando los receptores son posteriormente desafiados con parásitos patógenos (los más importantes Plasmodium falciparum atenuados a los huéspedes humanos) fue un hito temprano en la búsqueda de una vacuna adecuada (Hoffman SL et al, *J. Infect. Dis.* (2002)185: 1155 - 64). Con el tiempo, esto llevó a esfuerzos para explorar los obstáculos técnicos que se presentan en la transformación de estas observaciones anteriores en un enfoque práctico de la vacuna que comprende los esporozoítos asépticos atenuados (Luke, T.C. y S.L. Hoffman, *J. Ex. Biol.*, (2003) 206: 3803- 3808, Hoffman, S.L., y T.C. Luke, *Patente de Estados Unidos Nº 7.229.627* y *publicación de Estados Unidos 2005/0208078*). También ha conducido a un mayor interés general en la utilidad de vacunas que utilizan esporozoítos atenuados (Menard, R., *Nature* 2005) 433: 113-114; Waters, A.P. et al. *Science* (2005) 307: 528 - 530; Wykes, M.F. & M.F. Good, *Int. J. Parasitol.* (2007) 37: 705 - 712; Renia, L. et al, *Expert Rev. Vaccines*, (2006) 5: 473 - 481; Epstein, J.E. et al., *Supra*).

También se han demostrado otros modos de atenuación. Por ejemplo, se demostró que los esporozoítos atenuados resultantes de la alteración génica de Plasmodium berghei protegen los ratones contra la malaria de P. berghei (Kappe et al., *Patente de los Estados Unidos 7.122.179*, Mueller et al., *Nature* (2005), Mueller et al., *PNAS* (2005); Van Dijk et al., *PNAS* (2005) 102: 12194 - 12199); Waters, *Patente de Estados Unidos 7.550.138*; Labaied et al. *Infect. And Immun.* (2007). Recientemente se ha descrito la atenuación genética de los esporozoítos de P. falciparum (van Schaijk et al., *PLoS ONE* (2008) 3: e3549); VanBuskirk et al. *PNAS*.

De forma similar, se ha descrito la atenuación química de Plasmodium (Purcell et al. *Infect. Immun.* (2008) 76: 1193 - 99; Purcell et al *Vaccine* (2008) 26: 4880 - 84).

Otros han descrito también métodos para cultivar preparaciones no purificadas de esporozoítos e inducir la diferenciación de parásitos a estadios hepáticos axénicos (Kappe et al., *Pub. de EE.UU.* 2005/ 0233435).

Los estudios discutidos anteriormente establecen ciertas limitaciones. Por ejemplo, mientras que los esporozoítos administrados a huéspedes humanos por la picadura de un mosquito generan una respuesta inmune eficaz contra la malaria, tal método de administración no es claramente un método práctico para vacunar a una población que necesita protección contra la malaria. Estudios adicionales en ratones, mencionados anteriormente, han sugerido que el suministro de esporozoítos atenuados a ratones por vía intravenosa también es eficaz, mientras que otros medios de administración (por ejemplo, intramuscular) en comparación, no lo son. Un método de administración intravenosa, sin embargo, tampoco es práctico si se va a administrar una vacuna antipalúdica a numerosas personas (incluidos niños y ancianos). La administración intravenosa ha aumentado los riesgos, aumentado los costes, y los pacientes son mucho menos propensos a aceptar ser vacunados con este método. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de proporcionar una vacuna eficaz contra el paludismo que proporcione inmunidad protectora, donde la vacuna puede administrarse mediante una variedad de métodos.

Con respecto a las consideraciones para las vacunas humanas, la pureza del inmunógeno y la presencia o ausencia de material no específico auxiliar que puede ser inmunogénico o tóxico son cuestiones esenciales adicionales que no han sido resueltas previamente. Las preparaciones de esporozoítos atenuados aislados, tal como se usan en los estudios discutidos anteriormente, contienen material contaminante y otros materiales auxiliares. Se necesitaba en la técnica desarrollar vacunas basadas en esporozoítos, particularmente en seres humanos, que empleen preparaciones preparadas asépticamente, estériles y purificadas de esporozoítos para uso en composiciones de

vacunas. Tales preparaciones de esporozoítos, preparadas y purificadas de forma aséptica pueden ser también más eficaces que las preparaciones no purificadas cuando tales preparaciones se administran por métodos de administración no intravenosos (por ejemplo, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, epidérmica, mucosal, submucosa, cutánea o subcutánea).

- 5 El documento de EE.UU. 2005/220822 A1 describe composiciones de esporozoítos de Plasmodium preparadas por disección manual de glándulas homólogas de Anopheles o por centrifugación con gradiente de densidad.

Wood et al. describen en "The use of membrane screen filters in the isolation of Plasmodium Berghei sporozoites from mosquitos", Bulletin of the World Health Organization, vol. 57, No. 1, 1979, páginas 69-74, composiciones de esporozoítos de Plasmodium preparadas por filtración de homogenados de Anopheles a través de una serie de membranas Nuclepore.

Breve resumen de la invención

Una preparación purificada de acuerdo con la presente invención se define en la reivindicación 1. Las características preferidas de la preparación se definen en las reivindicaciones dependientes 2 a 12. Un método de purificación de esporozoítos de Plasmodium metabólicamente activos se define en la reivindicación 13. Otras características preferidas del método se definen en las reivindicaciones dependientes 14 a 21.

Se describen composiciones de esporozoítos vivos, infecciosos, sustancialmente purificados, particularmente esporozoítos de Plasmodium - esporozoítos atenuados, así como esporozoítos patógenos. También se describen métodos para producir parásitos vivos, infecciosos, sustancialmente purificados y métodos para usar composiciones de esporozoítos atenuados, sustancialmente purificados, como vacunas para prevenir la malaria. También se describen métodos de utilización de parásitos patógenos purificados útiles para evaluar la eficacia de fármacos y vacunas antimaláricos, y en conjunción con agentes antipalúdicos tales como cloroquina, útiles para conferir inmunidad protectora.

En una realización útil para comprender la invención, se proporcionan métodos de utilización de esporozoítos de Plasmodium atenuados, producidos asépticamente, esterilizados, infecciosos, sustancialmente purificados, para conferir inmunidad protectora frente a la malaria en huéspedes humanos y otros mamíferos. Tales métodos y composiciones pueden usarse para conferir inmunidad protectora contra la malaria causada por *P. falciparum* y otras especies de Plasmodium, sin complicaciones que puedan resultar del uso de preparaciones no purificadas.

En una realización útil para comprender la invención, se proporcionan composiciones de esporozoítos patogénicos de Plasmodium sustancialmente purificados y métodos para usarlos como herramientas de investigación, en ensayos clínicos y en regímenes de vacunación profiláctica.

Se proporcionan composiciones de esporozoítos vivos, infecciosos, atenuados, sustancialmente purificados, así como dosificaciones, regímenes y vías de administración a seres humanos y otros sujetos mamíferos.

En una realización útil para comprender la invención, se proporcionan parásitos de Plasmodium purificados en un excipiente, particularmente parásitos en la etapa de desarrollo de esporozoítos, siendo dichos parásitos metabólicamente activos, infecciosos y estando sustancialmente libres de material contaminante. En otra realización, los esporozoítos se preparan asépticamente. En otra realización, los esporozoítos están suficientemente atenuados para evitar el desarrollo más allá del estadio hepático (etapa de esquizonte maduro) del ciclo de vida del parásito.

En otra realización útil para comprender la invención, se proporcionan métodos para conferir inmunidad protectora en huéspedes mamíferos y humanos contra la malaria causada por una especie de Plasmodium, que comprende proporcionar esporozoítos vivos, metabólicamente activos, infecciosos, atenuados de una especie de Plasmodium en un excipiente y estando sustancialmente libres de material asistente y administrar al menos una dosis de dicha preparación de esporozoítos a dicho huésped; en el que se evitan las manifestaciones patológicas de la malaria y se protege al huésped contra el desarrollo de la malaria después de una exposición consecuente a esporozoítos de Plasmodium patógenos de dicha especie.

En otra realización útil para comprender la invención, se proporcionan métodos para purificar parásitos infecciosos metabólicamente activos, particularmente esporozoítos de Plasmodium, proporcionando una preparación acuosa de pre-purificación que comprende esporozoítos y material no esporozoíto auxiliar, pasando secuencialmente la preparación a través de un conjunto de filtros de exclusión por tamaño que comprende: a) un primer filtro de exclusión con un tamaño de poro nominal capaz de retener el material auxiliar mayor de 10 micrómetros y permitir el paso de los esporozoítos; b) un segundo filtro de exclusión con un tamaño de poro nominal capaz de retener el material auxiliar mayor de aproximadamente 0,6 micrómetros y permitir el paso de los esporozoítos; y c) un tercer filtro de membrana de exclusión por tamaños con un tamaño de poro preciso capaz de retener sustancialmente todo el material auxiliar que sea mayor de 1,2 micrómetros y permitir el paso de los esporozoítos. Los esporozoítos sustancialmente purificados se recogen entonces sobre un filtro colector con un tamaño de poro capaz de retener los esporozoítos, y la preparación de esporozoíto purificado se eluye después del filtro colector y se resuspenden a la concentración deseada.

En otra realización útil para comprender la invención, se proporcionan composiciones útiles para determinar la eficacia de fármacos, vacunas y similares relacionados con el paludismo. Las composiciones comprenden parásitos de Plasmodium patógenos vivos y sustancialmente purificados.

Breve descripción de los dibujos/figuras

- 5 Figura 1 - Observación foto-micrográfica de preparaciones crudas y purificadas de PfSPZ (Campaña 3). Fotomicrografías tomadas con un aumento de 200X.
- Figura 1a - Antes de la purificación SGM = 837 ng / 25.000 PfSPZ (Las muestras se ajustaron a 15×10^6 PfSPZ/ml)
- Figura 1b - Después de la purificación SGM = 0,23 ng/25.000 PfSPZ (Las muestras se ajustaron a 18×10^6 PfSPZ/ml)
- 10 Figura 2 - Observación foto-micrográfica de preparaciones crudas y purificadas de PfSPZ (Campaña 6). Fotomicrografías tomadas con un aumento de 200X.
- Figura 2a - Antes de la purificación - SGM = 781 ng/25.000 PfSPZ (Las muestras se ajustaron a $17,78 \times 10^6$ PfSPZ/ml)
- Figura 2b - Después de la purificación - SGM = 0,65 ng/25.000 PfSPZ (Las muestras se ajustaron a $16,71 \times 10^6$ PfSPZ/ml)
- 15 Figura 3 - Expresión específica en la etapa de PflSA-1 (Esporozoítos de P. falciparum versus parásitos de la etapa hepática de 3 días).
- Figura 3a - PfSPZ incubado con un anticuerpo monoclonal anti-PfCSP.
- Figura 3b - PfSPZ incubado con anticuerpos policlonales anti-PflSA-1.
- 20 Figura 3c - Parásitos de la etapa hepática de 3 días incubados con anticuerpos policlonales anti-PflSA-1.

Descripción detallada de la invención

- En la actualidad no existe ninguna vacuna aprobada por la FDA para la malaria. Sin embargo, los resultados publicados en los últimos 30 años han demostrado que la administración de esporozoítos de P. falciparum atenuados por radiación, por la mordedura de más de 1000 mosquitos infectados por P. falciparum, proporciona
- 25 inmunidad protectora estéril en más del 90% de los individuos expuestos durante al menos 42 semanas, y fue eficaz contra múltiples aislamientos de P. falciparum de todo el mundo. Aunque pueden ser muy provocativas estas observaciones, no ha surgido una vacuna, o un enfoque obvio para desarrollar una vacuna contra la malaria, debido a varios obstáculos técnicos, incluyendo aislar y purificar los esporozoítos y hacerlo bajo condiciones asépticas. Por otra parte, el trabajo de un número de científicos indicó que sólo podría lograrse una protección excelente en el sistema del modelo de ratón mediante la administración intravenosa de esporozoítos atenuados. Debido a que las
- 30 vías de administración parenteral no intravenosas utilizadas convencionalmente en la inmunización humana, p. ej., subcutánea e intramuscular, no condujeron a una inmunidad protectora adecuada en este sistema modelo de ratón, no se consideró posible desarrollar una vacuna atenuada de esporozoítos para humanos. Utilizando un sistema modelo de ratón que se considera más análogo a la malaria humana causada por P. falciparum, se ha encontrado que la administración parenteral no intravenosa de esporozoítos conduce a una protección de alto nivel (Publicación de EE.UU. No. 2005/0208078). También se han superado muchos otros obstáculos técnicos de desarrollo para una vacuna antipalúdica viva atenuada farmacéuticamente aceptable, entre ellos, la producción aséptica de cantidades suficientes de esporozoítos aislados del material auxiliar (véase particularmente Hoffman, SL y TC Luke, documento de EE.UU. 7.229.627 B2).
- 35 Sin embargo, una vacuna adecuada para uso rutinario en sujetos humanos requiere un inóculo sustancialmente puro y un inóculo de esporozoítos requiere esporozoítos que se han purificado sustancialmente de la fuente desde la cual se produjeron. Las composiciones de vacuna proporcionadas en este documento comprenden esporozoítos de Plasmodium en una forma sustancialmente purificada, sustancialmente libre de material (fuente) auxiliar, que no es específico para los mismos esporozoítos. Adicionalmente, en algunas realizaciones de composiciones de vacunas proporcionadas en la presente invención, las composiciones de vacunas están sustancialmente exentas de material contaminante, microorganismos y patógenos exógenos. Se proporcionan esporozoítos sustancialmente purificados y métodos de purificación de esporozoítos, y composiciones de esporozoítos y excipientes purificados.
- 40
- 45

Definiciones

El término "aproximadamente" significa dentro de una desviación estándar según la práctica en la técnica.

- 50 "Aditivo", tal como se utiliza en este documento como sustantivo, es un compuesto o composición añadido a una preparación de esporozoíto para facilitar la conservación de la preparación. Los aditivos pueden incluir crioprotectores, tales como DMSO y glicerol, antioxidantes, y similares.

"Aséptico", tal como se usa en la presente memoria, significa ausencia de la introducción de contaminación detectable de otros microorganismos tales como bacterias, hongos, virus patológicos y similares. Un método aséptico de preparación de esporozoítos da como resultado una preparación estéril de esporozoítos, libres de cualquier otro tipo de microorganismo o agente infeccioso. Los ensayos microbiológicos utilizados para monitorear una metodología aséptica evalúan la presencia o ausencia de contaminación. Estos incluyen, pero no se limitan a, la Prueba de Límites Microbianos, la actual USP <61>.

Material "auxiliar", tal como se usa en la presente memoria, significa el material en una preparación cruda de parásitos que no es específica de los parásitos per se. Por ejemplo, en una preparación de esporozoítos, el material auxiliar es el que no es específico del esporozoíto per se. El material auxiliar incluye el material específico para la fuente a partir de la cual se cultivaron o produjeron los esporozoítos, particularmente restos biológicos, más particularmente proteínas, aislando dicho material junto con los esporozoítos en una preparación cruda. Lo que hace una preparación "cruda" es el material auxiliar en la preparación, y con respecto a los esporozoítos, incluye material específico para el sustrato del que se han desarrollado los esporozoítos o de los cuales se han aislado los esporozoítos. Con respecto a los esporozoítos disecados y aislados de las glándulas salivales de los mosquitos huésped, el material auxiliar es el material huésped, la proteína huésped, el material de las glándulas salivales, la saliva y similares. El material auxiliar no incluye componentes que se han añadido intencionalmente a una preparación, por ejemplo, excipientes, diluyentes, aditivos y similares. En algunas realizaciones, se puede volver a añadir a la preparación purificada un componente de material auxiliar que se ha retirado de una preparación en bruto para optimizar la inmunogenicidad del esporozoíto de la infecciosidad de esporozoítos o la presentación de esporozoítos al huésped. Dicho material añadido posteriormente no se considera auxiliar como se define en este documento.

"Atenuar", tal como se utiliza en la presente memoria, significa hacer que un organismo vivo no pueda completar su ciclo de vida sin matarlo. El organismo puede tener una capacidad limitada para replicarse, expresar proteínas y desarrollarse a través de algunas etapas del ciclo de vida, pero detiene el desarrollo en una etapa del ciclo de vida particular y es incapaz de progresar en el desarrollo más allá de esa etapa. Con respecto a los parásitos de Plasmodium atenuados descritos en la presente memoria, es decir, parásitos que han estado expuestos a la radiación en la etapa de esporozoítos, retienen la capacidad de infectar hepatocitos del huésped y expresar proteínas específicas del estadio, pero son incapaces de desarrollarse más allá de la etapa hepática, son incapaces de volver a entrar al flujo sanguíneo de huéspedes infectados después de la fase hepática (etapa de merozoíto), son incapaces de causar la patología de la enfermedad de la malaria. Otros parásitos de especies de Plasmodium atenuados pueden retener la capacidad de infectar hepatocitos del huésped, desarrollarse más allá del estadio hepático, volver a entrar en el flujo sanguíneo de huéspedes infectados después del estadio hepático (etapa de merozoíto) e incluso infectar eritrocitos, pero detienen posteriormente el desarrollo antes del estadio en el que se manifiesta la patología de la enfermedad de la malaria.

La expresión "conferir inmunidad protectora", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a proporcionar a una población o a un huésped (es decir, a un individuo) la capacidad de generar una respuesta inmune para proteger contra una enfermedad (por ejemplo, paludismo) causada por un patógeno (por ejemplo, Plasmodium falciparum), de tal manera que las manifestaciones clínicas, la patología o los síntomas de la enfermedad en un huésped se reducen en comparación con un huésped no tratado, o tal que la velocidad a la cual la infección, las manifestaciones clínicas, la patología o los síntomas de la enfermedad aparecen dentro de una población se reducen, en comparación con una población no tratada.

"Contaminante" y contaminación, como se usan en la presente memoria, significan contaminación microbiana o viral adventicia o contaminación patógena, incluyendo, pero sin limitarse a, bacterias, virus, micoplasma, hongos y similares. Se diseña un proceso aséptico para prevenir la introducción de contaminación y una preparación estéril que está ausente de la presencia de contaminación. Los contaminantes también pueden ser tóxicos no biológicos o inorgánicos. Los contaminantes pueden ser introducidos accidental o inadvertidamente en cualquier etapa durante el proceso.

"Diluyente", tal como se usa en la presente memoria, es un medio en el que se preparan composiciones de esporozoítos y esporozoítos para conseguir una concentración deseada. El diluyente puede ser, por ejemplo, una solución salina normal o solución salina tamponada con fosfato, o medios tales como medio 199 o medio E199 (medio 199 con sales balanceadas de Earle).

"Excipiente" significa una sustancia inactiva utilizada como vehículo, portador o diluyente para el ingrediente activo de una preparación farmacéutica, tal como una vacuna. Como se usa en la presente memoria, un excipiente es un ingrediente añadido a la preparación durante el proceso de aislamiento y purificación para ayudar en el proceso, minimizar las interacciones no específicas o adsorciones, y/o proporcionar volumen. Ejemplos de excipientes incluyen proteínas inactivas, tales como albúminas de suero, particularmente albúmina de suero humano, de cualquier fuente, incluyendo, pero no limitándose a, purificado de sangre, producido como una proteína recombinante o producido sintéticamente. Los esporozoítos disecados de las glándulas salivales del mosquito pueden colocarse en un excipiente para su posterior procesamiento. El excipiente puede añadirse a preparaciones farmacéuticas por varias razones, incluyendo el mantenimiento de la actividad, el aumento de la estabilidad o la prevención de la pérdida inadvertida de esporozoítos aislados durante todo el proceso de purificación.

- 5 "Respuesta inmunitaria", tal como se usa en la presente memoria, significa una respuesta en el receptor a la introducción de esporozoítos atenuados caracterizados generalmente, pero sin limitación, por la producción de anticuerpos y/o células T. Generalmente, una respuesta inmune puede ser una respuesta celular, tal como la inducción o activación de células T CD4 + o células T CD8 + específicas para epítomos de especies de Plasmodium, una respuesta humoral de producción aumentada de anticuerpos específicos de Plasmodium o respuestas tanto celulares como humorales. Con respecto a una vacuna contra el paludismo, la respuesta inmune establecida por una vacuna que comprende esporozoítos incluye, pero no se limita a, respuestas frente a proteínas expresadas por esporozoítos extracelulares u otras etapas del parásito después de que los parásitos han entrado en las células huésped, especialmente hepatocitos y células mononucleares, tales como células dendríticas y/o componentes de dichos parásitos. En la presente invención, tras la subsiguiente exposición de organismos infecciosos, la respuesta inmune impide el desarrollo de parásitos patógenos a la fase eritrocítica asexual que causa la enfermedad.
- 10 "Intravenosa", como se define en este documento, significa la introducción intencional, directamente en el lumen de un vaso sanguíneo grande identificado, tal como una vena.
- 15 "Metabólicamente activo", tal como se utiliza en la presente memoria, significa vivo, y capaz de realizar funciones sustentativas y algunos procesos de ciclo de vida. Con respecto a los esporozoítos atenuados, esto incluye, pero no se limita a, esporozoítos capaces de invadir hepatocitos en cultivo e in vivo, potencialmente con una capacidad limitada para dividir y progresar a través de algunas etapas de desarrollo, y expresar de novo proteínas específicas del estadio.
- 20 "Mitigar", según se define en el presente documento, significa reducir sustancialmente, o moderar en intensidad, los síntomas y/o la patología del paludismo que de otro modo podría manifestarse después de la vacunación.
- "Nominal", como se define en este documento y con respecto al tamaño de poro de un filtro, significa el tamaño de poro efectivo y se refiere al tamaño de poro aparente para el paso de partículas globulares a través del filtro de manera que el 90% de las partículas de dicho tamaño sean excluidas por el filtro.
- 25 "Parenteral", como se define en la presente memoria, no significa a través del canal alimentario, sino más bien por introducción a través de alguna otra vía, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraorbitaria, intracapsular, intraespinal, intraesternal, intravenosa, transcutánea y similares.
- "Prevenir", tal como se define en el presente documento y es utilizado en el contexto de la prevención de la malaria, significa evitar que se manifiesten una mayoría, y hasta todas, las manifestaciones patológicas y clínicas de la malaria.
- 30 "Purificar", como se define en la presente memoria y con respecto a las preparaciones de esporozoítos, significa separar del material auxiliar o separar del material considerado que es indeseable.
- 35 "Estéril", como se define en este documento y con respecto a esporozoítos, significa ausencia de cualquier microorganismo contaminante. Se obtiene una preparación estéril de esporozoítos mediante una metodología de preparación aséptica. La esterilidad de una preparación se determina mediante ensayos específicos, incluyendo, pero sin limitarse a, la actual prueba de esterilidad USP <71>.
- "Sustancialmente purificado", con respecto a una preparación de esporozoítos, significa la reducción en la cantidad de contaminante auxiliar a menos de 85 ng/25.000 esporozoítos o al menos una reducción de 18 veces en la contaminación auxiliar. La satisfacción de cualquiera de los criterios antes mencionados es suficiente para hacer una preparación de esporozoítos "sustancialmente purificada".
- 40 "Terapéutico", como se define en la presente memoria, se refiere a la reducción de manifestaciones clínicas o de la patología que ya se ha manifestado. Una "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se usa en la presente memoria, significa una cantidad suficiente para reducir las manifestaciones clínicas, la patología o los síntomas de la enfermedad en un individuo, o una cantidad suficiente para disminuir la velocidad a la que aparecen las manifestaciones clínicas, la patología o los síntomas de la enfermedad una población.
- 45 "Vacuna", tal como se utiliza en la presente invención, es una preparación que comprende un agente inmunogénico y un diluyente farmacéuticamente aceptable potencialmente en combinación con excipientes, adyuvantes y/o aditivos o protectores. El inmunógeno puede estar constituido por un agente infeccioso completo o un subconjunto molecular del agente infeccioso (producido por el agente infeccioso, de forma sintética o recombinante). Cuando la vacuna se administra a un sujeto, el inmunógeno estimula una respuesta inmunitaria que, después de una exposición posterior con un agente infeccioso, protege al sujeto de una enfermedad o mitiga la patología, los síntomas o las manifestaciones clínicas causadas por ese agente. Una vacuna terapéutica (tratamiento) se administra después de la infección y está destinada a reducir o detener la progresión de la enfermedad. Una vacuna preventiva (profiláctica) está destinada a prevenir la infección inicial o reducir la tasa o la carga de la infección. Los agentes utilizados en las vacunas contra una enfermedad parasitaria, tal como la malaria, pueden ser parásitos muertos por completo (inactivos), parásitos atenuados vivos (incapaces de progresar completamente a lo largo de su ciclo de vida), o moléculas purificadas o artificialmente fabricadas asociadas con el parásito - p. ej. proteínas recombinantes, péptidos sintéticos, plásmidos de ADN, y virus recombinantes o bacterias que expresan proteínas de
- 55

Plasmodium. Una vacuna puede comprender esporozoítos junto con otros componentes tales como excipientes, diluyentes, vehículos, conservantes, adyuvantes u otros potenciadores inmunes, o combinaciones de los mismos, tal como serían fácilmente comprendidos por los expertos en la técnica.

Purificación de esporozoítos

- 5 Los parásitos de especies de Plasmodium se cultivan asépticamente en cultivos, así como in vivo en hospedadores de mosquitos de especies Anopheles, más típicamente huéspedes de Anopheles stephensi. Métodos de cultivo axénico de parásitos del estadio hepático de especies de Plasmodium (Kappe et al., Pub. de EE.UU. 2005/0233435) y métodos para producir esporozoítos de especies de Plasmodium atenuados y no atenuados, en particular métodos de cultivo y atenuación de parásitos en mosquitos y de recolección atenuada y esporozoítos no atenuados son conocidos en la técnica y han sido descritos (véase, Hoffman & Luke, Patente de Estados Unidos N° 7.229.627; Pub. de EE.UU. No. 2005/0220822.

- 15 El aspecto de purificación de la invención separa los esporozoítos del material auxiliar, tal como el material de la glándula salival del mosquito huésped (en lo sucesivo, "SGM"), los materiales específicos del mosquito y cualquier otro material o componente no esporozoítico, logrando así una preparación sustancialmente purificada que contiene esporozoítos. Como un aspecto de la purificación, los esporozoítos se concentran con respecto al material contaminante auxiliar, tal como SGM. En este caso, la pureza de una preparación se mide utilizando un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) para cuantificar el SGM antigénico auxiliar presente en preparaciones crudas y purificadas de esporozoítos (en lo sucesivo en este documento, "SGM - ELISA"). Otros métodos, tales como, pero no limitados a, electroforesis capilar, espectrometría de masas, cromatografía de fase inversa, inmunotransferencia, dispersión de luz y espectrometría UV, pueden adaptarse de manera similar para medir el material auxiliar. Con respecto a la purificación de esporozoítos de fuentes distintas de los mosquitos, se adaptarán de manera similar ensayos similares, tales como ELISA, relevantes para el material auxiliar en la preparación cruda a partir de la cual se purificarán los esporozoítos. El desarrollo de tales ensayos ELISA adaptados a antígenos del material auxiliar a partir de fuentes distintas de las glándulas salivales de mosquito usaría un protocolo similar, comúnmente conocido por los expertos en la técnica. Para ilustrar, se proporciona un protocolo para un ensayo de impurezas del SGM auxiliar. Se debe entender que este protocolo se proporciona para ilustración y puede ser modificado, p. ej., por ampliación o modificación, y no pretende limitar el alcance de la invención como se reivindica.

Métodos de purificación

- 30 Se describen en este documento métodos de purificación de especies de Plasmodium vivo, p. ej., Falciparum, vivax, malariae u ovale.

- 35 Los métodos descritos utilizan una serie de filtros de exclusión de tamaños de diferentes tipos y con tamaños de poro diferentes, ensamblados de una manera novedosa y no obvia. La metodología elimina el material auxiliar de las preparaciones de parásitos vivos y móviles. Un aspecto de este método es que el tamaño de poro de un filtro de exclusión de tamaños en secuencia no siempre es menor que el tamaño de poro del filtro de exclusión de tamaños que lo precede. Otro aspecto es que algunos filtros proporcionan una matriz con un tamaño de poro nominal y al menos un filtro proporciona un filtro grabado en pista con un diámetro de poro preciso. Al menos un filtro tiene un tamaño de poro cercano o ligeramente menor que el diámetro del parásito.

- 40 A modo de ejemplo, se describe la purificación de esporozoítos de especies de Plasmodium; sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que, basándose en el tamaño físico del organismo, el ajuste del tamaño del poro del filtro dará una purificación similar. La presente invención se dirige a la purificación de esporozoítos de especies de Plasmodium. Por ejemplo, el esporozoíto de Plasmodium falciparum tiene forma de varilla, y aproximadamente $0,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$ de diámetro y $8,5 \pm 1,5 \mu\text{m}$ de longitud. Hoffman, SL et al en Tropical Infectious Disease 2ª Ed. 2006, Elsevier, Philadelphia, PA pág. 1027; Xu, L.H. et al., 1985 Zoo. Res. 6: 33-6.

- 45 Típicamente en una preparación para la purificación, las glándulas salivales de 150 a 400 mosquitos se secan. Los esporozoítos son liberados de las glándulas salivales por el paso de ida y vuelta en una aguja y jeringa (trituración), y los esporozoítos de estas glándulas son colectivamente purificados. Sin embargo, se pueden diseccionar varios mosquitos veces más en preparaciones escaladas, en una realización hasta 1.000 mosquitos, en otra realización hasta 5.000 mosquitos, en otra realización hasta 10.000 mosquitos. Los esporozoítos son liberados de las glándulas salivales por trituración y las preparaciones de glándulas salivales trituradas (preparaciones de purificación previa) se purifican mediante el proceso de filtración por exclusión de tamaños descrito en la presente memoria. Los esporozoítos se mantienen durante todo el proceso de purificación en un excipiente, típicamente un por ciento de albúmina de suero humano (HSA) en Medio 199 con sales de Earle (E-199).

A - Preparación del material para la purificación

- 55 El producto de disección triturado (preparación de pre-purificación) se recibe en conjunto en un solo tubo a la vez. Esta es la preparación de pre-purificación SGM. Representa aproximadamente de 100.000 a 1.000 millones de esporozoítos, preferiblemente al menos 1 millón de esporozoítos y más preferiblemente al menos 25 millones de esporozoítos. La cantidad medida de SGM en la preparación de pre-purificación está usualmente entre 300 ng y 12.000 ng por 25.000 esporozoítos, más típicamente, entre 400 ng y 1.100 ng por cada 25.000 esporozoítos. La

preparación de pre-purificación se diluye entonces hasta 10 ml con excipiente. Las soluciones y muestras se mantienen entre 15-30°C durante la duración de la purificación.

B - Procedimiento de purificación

5 Usando una bomba peristáltica, se bombea la preparación de pre-purificación diluida a través de una serie de filtros
 de exclusión de tamaños a un caudal de al menos 1 ml/min pero no más de 1000 ml/min, preferiblemente al menos 2
 ml/min, pero no más de 500 ml/min, y más preferiblemente con un caudal de al menos 3 ml/min y no más de 200
 ml/min. El flujo correspondiente a través de cada filtro es al menos de 1 L/h/m² pero no más de 2000 L/h/m²,
 10 preferiblemente de 3 L/h/m² a 1500 L/h/m², y lo más preferiblemente de al menos 125 L/h/m² pero no más de 250
 L/h/m². Los filtros están conectados en serie, usualmente con tubos de silicona de grado médico. Preferiblemente, el
 filtro inicial (Filtro N°. 1) o los dos filtros iniciales (Filtros N°. 1 y N°. 2) son filtros de matriz y están hechos de
 polipropileno, sin embargo, puede ser utilizado nylon, éster de celulosa mezclado y vidrio de borosilicato u otros
 15 materiales conocidos por los expertos en la técnica. Preferiblemente, el penúltimo filtro (Filtro N°. 3) es un filtro de
 membrana, lo más preferiblemente un filtro de policarbonato grabado en pista, aunque pueden usarse otros filtros
 con propiedades similares conocidas por los expertos en la técnica. Para procedimientos asépticos, los filtros son
 estériles. En una realización, tres filtros (Filtro N°. 1, Filtro N°. 2 y Filtro N°. 3) están conectados en serie y los
 esporozoítos son capturados por filtración final sin fin en el Filtro N°. 4. Pueden utilizarse filtros adicionales.
 Alternativamente, sólo se pueden usar uno o dos filtros (como se describe más adelante en el Párrafo 59), sin
 20 embargo el uso de tres filtros es óptimo. En una realización útil para comprender la invención, el filtro N° 1 es una
 matriz de membrana con un tamaño de poro nominal de al menos aproximadamente 2,5 micras, pero no más de
 aproximadamente 30 micras, preferiblemente de al menos aproximadamente 5 micras, pero no más de 20 micras.
 En una realización, el filtro usado tiene un tamaño de poro nominal de aproximadamente 10 micrómetros con un
 área de filtración de 17,5 cm². (Polygard®-CN Optiscale - Millipore Cat. N° SN1HA47HH3). En una realización
 25 escalada, el área de filtración es de 1800 cm². El tamaño de poro nominal del filtro N° 2 (también una matriz de
 membrana) es de al menos aproximadamente 0,3 micrómetros pero no mayor de aproximadamente 1,2
 micrómetros. En una realización, el tamaño de poro es de aproximadamente 0,6 micrómetros con un área de
 filtración de 17,5 cm². (Filtro Polygard®-CN Optiscale - Millipore Cat. No. SN06A47HH3) - menor que el diámetro de
 Plasmodium. En una realización escalada, el área de filtración es de 1800 cm². En una realización, el filtro N° 3 es
 un filtro de membrana grabado en pista con un diámetro de poro preciso y un tamaño de poro constante, y tiene un
 30 tamaño de poro de al menos 1,2 micrómetros pero no mayor de 3 micras, mayor que el tamaño de poro nominal del
 filtro precedente. En una realización útil para comprender la invención, el filtro utilizado tiene un tamaño de poro de
 1,2 micrómetros con un área de filtración de 11,3 cm². (Membrana Isopore, 47 mm de diámetro - Millipore Cat. No.
 RTTP04700) mantenido en un soporte de filtro Swin-Loc (Whatman Cat. No. 420400). En una realización escalada,
 el área de filtración es de 127 cm². El material filtrado se captura en el filtro N° 4 en una celda de ultrafiltración
 35 agitada (Millipore, modelo 8200) provista de una membrana Isopore, de 90 mm de diámetro con un área de filtración
 de 28,7 cm² y un tamaño de poro grabado en pista de no más de 0,8 micras, preferiblemente no más de 0,6
 micrómetros, y preferiblemente no más de 0,2 micrómetros. En una realización, el tamaño de poro es de 0,4
 micrómetros (Millipore Cat. N° HTTP09030). En una realización escalada, el área de filtración es de 162 cm². En
 otra realización escalada, el área de filtración es de 63 cm². El sistema se lava varias veces con medios. Cuando el
 40 volumen de retenido alcanza aproximadamente 40 ml en la célula agitada, se abre la salida del recipiente celular
 agitado y se drena por gravedad dejando aproximadamente 5-10 ml de retenido residual, aunque el volumen de
 retenido puede ser reducido por otros métodos tales como aplicar presión a partir de gas comprimido, tal como
 nitrógeno o un dispositivo mecánico tal como un pistón, la gravedad es el método preferido. Este retenido residual
 se recoge y se transfiere, junto con tres lavados usando medios de purificación hasta un total de aproximadamente
 45 35 ml, típicamente en un tubo de Oak Ridge de 35 ml estéril o un tubo de centrifuga similar (el tamaño del tubo
 variará dependiendo del volumen de la preparación). Los esporozoítos purificados en medios en el tubo de Oak
 Ridge de 35 ml se centrifugan de 5.000 g hasta 25.000 g, preferiblemente a 16.300 g, durante 2 minutos a 12
 minutos, preferiblemente cinco minutos, para sedimentar los esporozoítos. El medio sobrenadante se decanta. Este
 paso purifica adicionalmente la preparación de esporozoítos mediante la eliminación de materiales más flotantes
 más pequeños y materiales solubles que permanecen en el sobrenadante.

50 Usando la metodología de filtro de exclusión de tamaños 3, este procedimiento proporciona una reducción mayor
 que una reducción sustancial del material auxiliar en la preparación de esporozoítos purificados con respecto al
 material auxiliar en la preparación de pre-purificación (factor de reducción) de 200 a 10.000 veces. La cantidad de
 SGM residual en las preparaciones purificadas de esporozoítos purificados estériles rutinariamente es inferior a 25
 55 ng de material auxiliar por 25.000 esporozoítos (mayor que el 97% de reducción con relación a la cantidad inicial de
 SGM), preferiblemente menos de 15 ng por 25.000 esporozoítos (98% de reducción), y más preferiblemente menos
 de 1 ng por 25.000 esporozoítos (99,9%). El SGM contaminante en cada preparación purificada descrita en la
 presente se reduce usualmente varios miles de veces con respecto a SGM en el material de glándula salivar
 pre-purificada inicial triturado del que se deriva cada preparación purificada. Preferiblemente, el factor de reducción
 de purificación es al menos 15 veces, más preferiblemente, el factor de purificación es al menos 1500 veces, y lo
 60 más preferiblemente al menos 3500 veces. La media geométrica del factor de reducción en las 10 campañas
 descritas en el Ejemplo 1 es 1625, una reducción de 99,93% en SGM durante el proceso de purificación.

Por ejemplo, las preparaciones de esporozoítos purificadas, aisladas de las glándulas salivales de los mosquitos
 disecados mostradas en el Ejemplo 1 (Tabla 2) contenían un intervalo de 0,19 ng a 1,01 ng SGM por 25.000

5 esporozoítos y el porcentaje de reducción de SGM auxiliar varió de 99,91% a 99,97%. Alternativamente, el método descrito en el Párrafo 59 a continuación proporciona una preparación de esporozoítos con no más de 85 ng de SGM por 25.000 (reducción del 95% del material SGM asociado) y se consideran sustancialmente purificados. La media geométrica de SGM en preparaciones purificadas de las 10 campañas de producción de la Tabla 2 (utilizando 3 filtros de exclusión por tamaños) fue de 0,51 ng SGM por 25.000 esporozoítos con un intervalo de confianza del 95% de 0,34 a 0,67 ng SGM por 25.000 esporozoítos.

10 En una realización alternativa no abarcada por las reivindicaciones, el filtro N° 3 se elimina del tren de filtros descrito en el párrafo 56 anterior y se utiliza una metodología de filtro de exclusión de tamaños 2 (Filtro Intermedio N° 1 y Filtro N° 2). Los esporozoítos se capturan como se describe en el párrafo 56 anterior. En un ejemplo de esta realización, se cargó una preparación cruda de 1.555 ng/25.000 esporozoítos y se purificó como se describe (menos el filtro N° 3). Después de la recolección (ya sea en un filtro de 0,4 micras o de 0,45 micras) y la resuspensión, la preparación purificada contenía 84 ng/25.000 esporozoítos. En este caso, el factor de reducción fue mayor de 18 veces y se eliminó el 94,6% de la contaminación por SGM. Esta preparación se considera sustancialmente purificada.

15 El intervalo del rendimiento de esporozoítos purificados fue entre el 30% y el 100% del número de esporozoítos en la preparación de partida, usualmente entre 50% y 70%.

20 Este método es eficaz para reducir la contaminación en una preparación de esporozoítos crudos. Los esporozoítos se conservan entonces. En una realización, los esporozoítos son crioconservados (Leef J.L. et al., Bull WHO 57 (supl. 1) (1979) 87-91, Orjih A.U., F. y Nussenzweig RS, Am. J. Trop. Med. Hyg. (1980) 29 (3): 343 - 7). En una realización, los esporozoítos se conservan por liofilización. En una realización, los esporozoítos se conservan por refrigeración. Otros métodos de conservación son conocidos por los expertos en la técnica.

Atenuación

25 Se conocen varios medios para inducir la atenuación del esporozoíto de Plasmodium. Estos incluyen la alteración genética hereditaria, la mutación genética, la exposición a la radiación y la exposición a sustancias químicas mutagénicas, la exposición a productos químicos de inhibición metabólica y la exposición a condiciones ambientales tales como alta o baja temperatura o presión.

30 Se han descrito métodos para inducir la atenuación de esporozoítos por exposición a la radiación (véase, por ejemplo, Hoffman & Luke, Patente de Estados Unidos N° 7.229.627; publicación de Estados Unidos N° 2005/0220822). Los esporozoítos pueden atenuarse por al menos 100 Gy pero no más de 1000 Gy, preferiblemente de 120 a 200 Gy, y lo más preferiblemente aproximadamente 150 Gy. La atenuación de los parásitos de Plasmodium de la vacuna descrita en este documento permite que los parásitos del estadio de los esporozoítos permanezcan metabólicamente activos, infecciosos con la capacidad de invadir hepatocitos (potencia); al tiempo que se asegura que los parásitos no se desarrollen a la etapa completamente madura del esquizonte del hígado, no pueden volver a entrar en el torrente sanguíneo del anfitrión, invadir eritrocitos ni alcanzar las etapas de desarrollo que causan la enfermedad (seguridad). Los expertos en la técnica pueden determinar rutinariamente las etapas de desarrollo del parásito y ajustar la atenuación según sea necesario.

40 La biología de la infección por Plasmodium de los hepatocitos proporciona oportunidades para ensayos in vitro para demostrar tanto la potencia como la seguridad. Normalmente, los esporozoítos migran desde el lugar de la picadura del mosquito al hígado, principalmente a través del torrente sanguíneo, pero potencialmente a través del sistema linfático. En el hígado se multiplican dentro de los hepatocitos, produciendo, en el caso de *P. falciparum*, aproximadamente 10.000-40.000 progenie (merozoítos) por célula infectada. Estos parásitos en el estadio hepático expresan múltiples proteínas, que no se expresan en esporozoítos o en etapas posteriores de desarrollo. Después de desarrollarse en el hígado hasta la fase de merozoíto, se liberan de los hepatocitos y vuelven a entrar en el torrente sanguíneo, expresando un conjunto diferente de proteínas específicas del estadio - diferentes de las expresadas durante el esporozoíto y los estadios hepáticos tempranos - e invaden los eritrocitos, donde la adicional multiplicación aumenta el número de parásitos en aproximadamente de 10 a 20 veces cada 48 horas. A diferencia del desarrollo de cinco a diez días en el hígado, que no induce ningún síntoma o signo de enfermedad, la infección no tratada de la fase sanguínea provoca hemólisis, escalofríos temblorosos, fiebres altas y postración y muchos otros síntomas y signos de malaria.

50 Ensayo de potencia

El nivel de potencia infecciosa de los esporozoítos de *P. falciparum* atenuados por radiación y purificados puede evaluarse midiendo la expresión del Antígeno 1 de la Etapa Hepática de *P. falciparum* (PfLSA-1) en cultivos de hepatocitos humanos usando un ensayo de inmunofluorescencia (IFA). PfLSA-1 es una proteína que no está expresada por esporozoítos, pero que se expresa por parásitos de *P. falciparum* (tanto atenuados como naturales) después de haber invadido con éxito hepatocitos (Figura 3). La expresión de PfLSA-1 indica que los esporozoítos atenuados son metabólicamente activos.

Los hepatocitos humanos (línea celular HC-04 [1F9], véase Prachumsri, J. y N. Yimamnuaychok, documento de EE.UU. 7.015.036) se sembraron aproximadamente 24 ± 6 horas antes de la infección usando una relación 1:1 de

medio Eagle modificado de Dulbecco y mezcla de Ham F-12 suplementada con suero bovino fetal al 10% y solución de penicilina/estreptomicina al 2% (medio de crecimiento HC-04). Las células se sembraron a una concentración de $4,0 \times 10^4$ células/0,3 ml/pocillo en placas de laboratorio de 8 pocillos de laboratorio Tek Permax (NUNC) recubiertas con laminina de colágeno-IV de Entactin (ECL) (Upstate) y se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 5% de CO_2 y 80% de humedad relativa. Cuando la confluencia de la monocapa alcanza $\geq 80\%$ a 24 ± 6 horas después de la siembra, el sobrenadante del cultivo se aspira de cada pocillo, se reemplaza con 0,3 ml de medio de crecimiento HC-04 fresco y se devuelve a la incubadora.

Los esporozoítos atenuados de *P. falciparum* se diluyen con medio de crecimiento HC-04 hasta una concentración de 500 esporozoítos/ μl . A continuación se añaden 50 μl de la muestra de parásito diluido a cada pocillo, después de aspirar 300 μl de medio, permitiendo que un total de $2,5 \times 10^4$ células infecten las células HC-04 en cada pocillo. Los hepatocitos infectados se incuban durante $3 \pm 0,5$ horas, se lavan tres veces con medio de crecimiento HC-04 por aspiración suave del sobrenadante y se cultivan con 0,3 ml de medio fresco por pocillo. Los cultivos se observan diariamente durante tres días para cualquier indicación de la presencia de contaminación. En ausencia de contaminación, el sobrenadante de cultivo se aspira de los pocillos individuales y se reemplaza con 0,3 ml de medio de crecimiento HC-04 fresco diariamente y se devuelve a la incubadora. A 72 ± 6 horas después de la infección, los cultivos se observan microscópicamente para detectar una posible contaminación. En ausencia de contaminación, los cultivos se lavan tres veces con 0,3 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS), se fijan a temperatura ambiente con 0,3 ml de metanol frío (almacenado a -20°C), se lavan tres veces con 0,3 ml de PBS y se almacenan en 0,3 ml del mismo. Los portaobjetos se pueden almacenar en un refrigerador a $2-8^\circ\text{C}$ durante un máximo de 72 horas hasta que se tiñen para inmunofluorescencia usando un suero de conejo policlonal anti-PfLSA-1 como anticuerpo primario y un anticuerpo secundario anti-conejo marcado con Alexa fluor-488. La cámara de plástico y la junta se retiran de los portaobjetos teñidos. Los portaobjetos se montan utilizando el medio de montaje Vectashield (Vector) y se cubren con una cubierta sliP. Los portaobjetos se evalúan contando todos los parásitos que expresan PfLSA-1 por pocillo usando un microscopio de epifluorescencia con contraste de fase (Figura 3). Los esporozoítos se consideran potentes si no hay contaminación de las preparaciones en ninguna etapa y el número de parásitos fluorescentes es de al menos 200/pocillo.

Composiciones de vacuna

Se han proporcionado composiciones farmacéuticas que comprenden esporozoítos de *Plasmodium* vivos, tanto atenuados como patogénicos, y métodos de uso de estas composiciones como composiciones preventivas de vacuna para prevenir la enfermedad y como composiciones patógenas de desafío para infectar a voluntarios en la prueba de vacunas y fármacos (véase particularmente Hoffman, documento de EE.UU. N° US2005/0220822). Se han considerado diversas categorías de esporozoítos atenuados para su uso en vacunas. Estos incluyen esporozoítos atenuados por diversos métodos incluyendo alteración genética hereditaria, mutación genética, exposición a radiación y exposición química. Se han descrito varios aislamientos atenuados creados por manipulación genética directa de los parásitos para *P. falciparum* (van Schaijk et al., PLoS ONE (2008) 3:e3549), así como especies de *Plasmodium* específicas murinas (Kappe et al., Patente de Estados Unidos 7.122.179; Van Dijk et al., PNAS (2005) 102: 12194 - 12199, Labaied et al Infect Immun. (2007) 75: 3758). En una realización, la atenuación de la radiación de *Plasmodium* humano-específico se logra mediante la exposición a la radiación gamma. (Hoffman, S.L. et al. (2002)185: 1155 - 1164). Los procedimientos de purificación proporcionados en el presente documento están destinados a la purificación de esporozoítos totalmente infecciosos así como de esporozoítos atenuados.

En una realización, los esporozoítos de *Plasmodium* atenuados pueden manipularse genéticamente para contener genes exógenos de otras especies de *Plasmodium* o de otros organismos patógenos que se pueden expresar antes, durante o después de la infección.

También se contemplan metodologías de vacunación que comprenden esporozoítos patógenos purificados. Por ejemplo, se pueden administrar esporozoítos patógenos a individuos tratados simultáneamente con antipalúdicos (por ejemplo, cloroquina) eficaces contra los parásitos asexuales de los eritrocitos o administrados a individuos tratados posteriormente con antipalúdicos eficaces contra los parásitos asexuales de los eritrocitos, evitando así la patología causada por los parásitos in vivo, permitiendo al mismo tiempo a los parásitos estimular respuestas inmunes protectoras. Roestenberg, M., et al. (2009) NEJM 361: 468 - 478; Pombo, DJ. et al. (2002) Lancet 360: 610 - 617.

Esporozoítos patógenos purificados y estériles son también útiles en protocolos de desafío para evaluar la efectividad de vacunas y metodologías de vacunación en estudios de desafío de voluntarios previamente tratados con estas vacunas y metodologías de vacunas. Del mismo modo, los esporozoítos patógenos purificados son útiles para generar los síntomas, signos o patología de la malaria en los estudios para evaluar la eficacia de los fármacos quimioprolifáticos y terapéuticos.

Los esporozoítos patógenos vivos estériles que han sido purificados, así como los esporozoítos atenuados vivos estériles que han sido purificados son generalmente más útiles que sus contrapartes no purificadas no estériles porque las composiciones y vacunas que comprenden esporozoítos purificados esterilizados reducen o eliminan el riesgo de que el material auxiliar o contaminación causará respuestas inmunes indeseadas, infecciones adventicias

u otras consecuencias inesperadas. Las vacunas que comprenden esporozoítos de especies de Plasmodium atenuados, vivos, purificados normalmente se administran por vía parenteral y por otras vías como se describe en la presente memoria. Tales vacunas son útiles para la prevención o reducción de la gravedad de la malaria, sus manifestaciones, síntomas o su patología.

5 En una realización útil para comprender la invención, las composiciones y vacunas que comprenden esporozoítos purificados, atenuados, preparados asépticamente proporcionan protección parcial, mejorada o completa en sujetos humanos y otros mamíferos no expuestos previamente a un patógeno causante de malaria o expuestos, pero no completamente protegidos. Estas composiciones y vacunas son igualmente útiles para reducir la posibilidad de desarrollar una infección que produce enfermedades a partir de parásitos que causan paludismo, incluyendo especies de Plasmodium, p. ej. P. falciparum o P. vivax y similares, y reducir la posibilidad de enfermar cuando se infecta, reducir la gravedad de la enfermedad, como la fiebre, cuando uno se infecta, reducir la concentración de parásitos en la persona infectada, o reducir las tasas de mortalidad por paludismo en poblaciones expuestas a parásitos de la malaria. En muchos casos, es beneficiosa incluso una protección parcial o retraso en el tiempo que toma un individuo inmunizado en comparación con un individuo no inmunizado a infectarse con los parásitos o enfermarse de la infección. De manera similar, una estrategia de tratamiento de la vacuna que da lugar a cualquiera de estos beneficios en aproximadamente el 30% de una población puede tener un impacto significativo en la salud de una comunidad y de los individuos que residen en la comunidad. En otras realizaciones que comprenden esporozoítos patógenos, las composiciones descritas son útiles para demostrar la eficacia de vacunas, fármacos para el tratamiento de la malaria y otros tratamientos y prevenciones de la malaria.

20 Se proporcionan métodos para la prevención de la malaria en un sujeto útil para comprender la invención. Los métodos comprenden administrar al sujeto una vacuna que ha sido preparada asépticamente y comprende esporozoítos de Plasmodium atenuados, vivos, sustancialmente purificados en una cantidad eficaz para prevenir la malaria.

25 El sujeto al que se administra la vacuna de acuerdo con estos métodos puede ser cualquier humano u otro mamífero, susceptible a la infección con un parásito de la malaria. Para tales métodos, la administración puede ser a través del tracto alimentario, tal como oral, o la administración puede ser parenteral, incluyendo, pero no limitado a, mucosa, intranasal, epidérmica, cutánea, intramuscular, subcutánea, intradérmica, submucosa, intravenosa y similares. Además, la administración puede ser por infusión continua o por bolos únicos o múltiples, así como administración mediada por microagujas.

30 La prevención y/o el tratamiento de la malaria pueden ser fácilmente comprobados por el experto en la práctica mediante la evaluación de las manifestaciones clínicas o patológicas asociadas con la infección palúdica, por ejemplo, temperatura elevada, dolor de cabeza, fatiga, coma o porcentaje de eritrocitos parasitados. Por lo tanto, de acuerdo con los métodos de la presente descripción, el sujeto muestra signos clínicos mejorados o ausentes, síntomas o manifestaciones patológicas de la malaria después de la administración de una vacuna que comprende esporozoítos de Plasmodium atenuados, vivos, purificados.

35 Los intervalos de dosificación eficaces y óptimos para vacunas e inmunógenos pueden determinarse usando métodos conocidos en la técnica. Se proporciona orientación sobre las dosificaciones apropiadas para conseguir un efecto antipalúdico a partir de los ensayos ejemplificados descritos en la presente memoria. Más específicamente, los resultados del patrón de inmunización descrito en el presente documento y en las referencias citadas pueden ser extrapolados por personas con experiencia en la técnica necesaria para proporcionar un programa de vacunación de prueba. Los sujetos voluntarios son inoculados con dosis variables a intervalos programados y las muestras de sangre de prueba se evalúan para los niveles de protección contra la malaria después de un desafío posterior con parásitos infecciosos. Tales resultados se pueden usar para refinar una dosis de inmunización optimizada y un régimen de dosificación (programa) para la inmunización eficaz de sujetos mamíferos, específicamente humanos. 40 Una dosis eficaz para conferir una inmunidad protectora es de 5.000 a 400.000 esporozoítos atenuados purificados administrados en un régimen de dosificación de 1 a 6 dosis, más particularmente una dosis de 15.000 a 270.000 esporozoítos atenuados purificados en un régimen de dosificación de al menos 2 dosis y más particularmente una dosis de 25.000 a 150.000 esporozoítos atenuados purificados en un régimen de dosificación de 3 ó 4 dosis.

45 Una respuesta inmune en un sujeto puede medirse mediante pruebas estándar incluyendo, pero sin limitarse a ellas, la evaluación de respuestas inmunes humerales y celulares, incluyendo, pero sin limitarse a: medición de respuestas de anticuerpos específicos de antígeno o de fase de parásito; medición directa de linfocitos de sangre periférica por medios conocidos en la técnica; ensayos de citotoxicidad de células asesinas naturales (Provinciali et al. (1992) J. Immunol. Meth. 155: 19 - 24), ensayos de proliferación celular (Vollenweider et al., 1992) J. Immunol. Meth. 149: 133 - 135), inmunoensayos de células inmunes y subconjuntos (Loeffler et al. (1992) Cytom. 13:169 - 174; Rivoltini et al. (1992) Can. Immunol. Immunother. 34: 241 - 251); y pruebas cutáneas para la inmunidad mediada por células (Chang et al. (1993) Cancer Res. 53:1043 - 1050). Se han descrito varios métodos y análisis para medir la fuerza del sistema inmune, por ejemplo, Coligan et al. (Ed.) (2000) Current Protocols in Immunology, vol. 1, Wiley & Sons.

50 Las vacunas proporcionadas comprenden composiciones asépticas y no asépticas de esporozoíto de Plasmodium atenuados, vivos, purificados, sustancialmente libres de material auxiliar, y composiciones con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas vacunas son eficaces para prevenir o mitigar la malaria

60

después de la exposición a parásitos infecciosos. Los métodos de formulación de composiciones farmacéuticas y vacunas son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington, The Science and Practice de Pharmacy 21ª Edición, Hendrickson, ed. (USIP: 2005)).

5 Están comprendidas por la invención composiciones de vacuna, preparadas asépticamente, o de otro modo, que comprenden esporozoítos de Plasmodium purificados, vivos, atenuados o no atenuados, junto con un diluyente y tampón apropiado. Los diluyentes, comúnmente la solución salina tamponada con fosfato (PBS), o la solución salina normal (NS), tienen diferentes pH y fuerza iónica en el contenido del tampón. Tales composiciones pueden incluir también un excipiente tal como albúmina de suero, particularmente albúmina de suero humano. La albúmina sérica puede purificarse a partir de fuentes naturales tales como sangre humana, o puede producirse mediante tecnologías de ADN o síntesis recombinante. Dichas composiciones también pueden incluir aditivos tales como antioxidantes, por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito sódico, y/o conservantes o criopreservadores. También se puede usar la incorporación del material en preparaciones en partículas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc., o en liposomas. (Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) páginas 1435 - 1712.

15 Con el fin de determinar la cantidad efectiva de las vacunas, el experto en la materia, teniendo en cuenta el contexto terapéutico, la edad y la salud general del receptor, será capaz de determinar la dosificación adecuada. La dosificación seleccionada depende del efecto terapéutico deseado, de la vía de administración y de la duración del tratamiento deseado. Los experimentos para determinar los niveles para dosificaciones pueden ser determinados por cualquier experto en la técnica mediante ensayos clínicos humanos apropiados en los que se evalúan diversos regímenes de dosificación para determinar su capacidad para obtener protección contra la malaria.

20 Las vacunas descritas y los métodos divulgados de uso de estas vacunas pueden ser útiles como un componente en un régimen de vacuna, comprendiendo cada componente una vacuna discreta que se administrará por separado a un sujeto. Los regímenes pueden incluir la inmunización secuencial con esporozoítos atenuados de especies de Plasmodium y otros tipos de vacunas de Plasmodium, las llamadas estrategias de sensibilización-recuerdo "prime-boost". Esto puede incluir los esporozoítos atenuados como una proteína primaria o proteínas recombinantes relacionadas con Plasmodium en un adyuvante como un refuerzo o viceversa. Esto también puede incluir vacunas de ADN relacionadas con Plasmodium o un virus recombinante, tal como un adenovirus, que expresa proteínas relacionadas con Plasmodium, como una vacuna primaria y purificada, atenuada de esporozoítos como un refuerzo, o viceversa. También puede incluir inmunización secuencial o mixta con esporozoítos atenuados de especies de Plasmodium y alguna forma de parásitos del estadio eritrocítico, incluyendo, muertos y vivos atenuados. Un complejo de vacuna que comprende componentes separados puede denominarse un régimen de vacuna, un régimen de cebado/refuerzo, una vacuna de componente, un kit de vacuna de componente o un envase de vacuna de componente, que comprende componentes de vacuna separados. Por ejemplo, un complejo de vacuna puede comprender como componente, una vacuna que comprende esporozoítos atenuados vivos, purificados y asépticos. El complejo puede comprender adicionalmente uno o más componentes de vacuna subunitarios recombinantes o sintéticos, incluyendo, pero sin limitarse a, proteína recombinante, polipéptido sintético, ADN que codifica estos elementos per se o incorporado funcionalmente en virus recombinantes, bacterias recombinantes o parásitos recombinantes. Un componente de vacuna puede incluir también esporozoítos axénicos, atenuados, asépticos que se permiten desarrollar extracelularmente a la etapa hepática temprana.

40 Se han descrito cepas de *P. falciparum* de diferentes partes del mundo - África Occidental, África Oriental, SE Asia, y similares. Los voluntarios inmunizados con una cepa de esporozoíto atenuado exhiben protección contra otras cepas (Hoffman, S. L. et al. (2002) J. Inf. Dis. 185: 1155 - 1164). En una realización, se combinan múltiples aislamientos y/o cepas de una especie de Plasmodium en una composición de esporozoíto o en una formulación de vacuna.

45 Se sabe que varias especies de Plasmodium causan paludismo en los seres humanos, predominantemente *P. falciparum* y *P. vivax*. Otras especies de Plasmodium también causan malaria, incluyendo *P. malariae* y *P. ovale*. *P. knowlesi* también es conocido por causar enfermedades humanas. En una realización, dos o más especies de Plasmodium se combinan en una formulación de vacuna. En aún otras realizaciones, los componentes separados de un régimen de vacuna pueden derivarse de diferentes especies, por ejemplo, algunas dosis de *P. falciparum* y otras de *P. vivax*.

50 En otra realización, el esporozoíto puede ser un parásito transgénico o recombinante, es decir, un parásito que incluya y exprese una secuencia de ADN o un gen que es extraño a la especie de parásito que la contiene, a la que se hace referencia en la presente memoria como un transgén. (Véase, p. ej., Franke-Fayard, et al. Molec. and Biochem. Parasitol. 2004, "A Plasmodium berghei reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle". 137: 23 - 33; Wengelnik, K. et al. The EMBO J. 1999 The A-domain and the thrombospondin-related motif of Plasmodium falciparum TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands. 18: 5195-5204). Los expertos en la técnica entenderán que un parásito transgénico, es decir, que contiene un transgén, puede purificarse de acuerdo con la metodología descrita en la presente memoria de la misma manera y en el mismo grado que el parásito parental del que se ha creado el parásito transgénico.

Recientemente, los resultados publicados indican la protección cruzada de especies en un sistema de malaria de roedores que ha demostrado tener un alto grado de predictibilidad de lo que ocurre con el sistema de malaria humano (Sedegah, M. et al (2007) Parasite Immunol. 29: 559 - 565). Esto sugiere que una composición de vacuna que comprende *P. falciparum* puede proporcionar inmunidad protectora contra *P. vivax* y/u otras especies de Plasmodium humano.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser conservadas, crioconservadas, liofilizadas, secadas por pulverización, refrigeradas, o termoestabilizadas a temperatura ambiente y similares.

Tanto la descripción anterior como los ejemplos siguientes son ejemplares y explicativos solamente y no son restrictivos de la invención, como se reivindica. Además, la invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que, por supuesto, pueden variar. Además, la terminología usada para describir realizaciones particulares no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por sus reivindicaciones.

A menos que se defina lo contrario, los significados de todos los términos técnicos y científicos usados en la presente invención son los entendidos comúnmente por cualquier experto en la técnica al que pertenece esta invención. Un experto normal en la técnica apreciará también que cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria descriptiva también puede usarse para practicar o probar la invención.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "a", "o", "el" y "la" incluyen a los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a "una vacuna de esporozoítos atenuados" incluye una pluralidad de tales esporozoítos y la referencia a "el agente" incluye a la referencia a uno o más agentes y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Además, los esporozoítos que son metabólicamente activos y que están vivos, pero atenuados en su ciclo de vida, y que tienen la capacidad de causar las manifestaciones clínicas y la patología de la malaria, se denominan diversamente atenuados, vivos atenuados y metabólicamente activos, vivos atenuados.

Los parámetros numéricos expuestos en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas de la presente invención. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debería al menos ser interpretado a la luz del número de dígitos significativos reportados, aplicando técnicas de redondeo ordinarias. Sin embargo, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se informan con la mayor precisión posible. Cualquier valor numérico obtenido a partir de una medición experimental, sin embargo, inherentemente contiene ciertos errores de la desviación estándar de su medición experimental.

Son posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención a la luz de las enseñanzas anteriores. Por lo tanto, debe entenderse que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención se puede practicar de manera diferente a como se describe específicamente.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención. Son meramente ilustrativos de la invención y revelan diversas propiedades beneficiosas de ciertas realizaciones de la invención. Estos ejemplos no deben ser interpretados como limitantes de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Determinación del SGM auxiliar - ELISA

Los esporozoítos de cualquier especie de Plasmodium pueden purificarse por los métodos proporcionados. Los ejemplos proporcionados en este documento describen la purificación de los esporozoítos de *P. falciparum* (PfSPZ). Sin embargo, otras realizaciones utilizan *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y/o *P. knowlesi*. Todavía otras realizaciones utilizan mezclas de estos parásitos. Todavía otras realizaciones utilizan esporozoítos atenuados de cada especie. Aún otras realizaciones utilizan esporozoítos atenuados que incluyen y expresan una secuencia de ADN o gen que es extraño a ese parásito.

A - Preparación de anti-suero anti-SGM de conejo

i) Extracción de glándulas salivales de mosquitos

Para generar anti-sueros de conejo contra las glándulas salivales de los mosquitos, se inmovilizaron mosquitos de *Anopheles stephensi* de 10 a 14 días de edad criados con insectos, colocándolos en un refrigerador a 4°C durante aproximadamente cinco minutos. Los mosquitos inmovilizados se colocaron brevemente en una placa Petri que contenía etanol al 70% y luego se transfirieron a una placa Petri que contenía solución salina tamponada con fosfato IX (PBS). Un par de glándulas salivales de cada mosquito se disecó a mano en 1X PBS en un portaobjetos de vidrio de microscopio y se transfirió a un microtubo estéril claro de 1,7 ml (Axygen Scientific Inc. CA) que contiene 20-30 µl de 1X PBS. Diariamente, se diseccionaron aproximadamente 100 mosquitos y se pusieron 100 pares de glándulas

salivales en 30 µl de PBS en un congelador a -70°C. Cuando se obtuvieron suficientes glándulas salivales para una inmunización, los viales se retiraron del congelador, se descongelaron a temperatura ambiente y se agruparon.

ii) Procesamiento de las glándulas salivales

5 Para la inoculación primaria, las glándulas salivales se diseccionaron a partir de 1.000 mosquitos y se almacenaron a -70°C. El día de la inoculación, las muestras se descongelaron, se reunieron y se lisaron por tres ciclos de congelación-descongelación adicionales usando un baño de hielo seco/etanol y descongelación a temperatura ambiente. Las glándulas salivales se reconstituyeron en un volumen final de 600 µl de 1X PBS y se emulsionaron con Montanide ISA 720 (SEPPIC, Inc., Fairfield, NJ).

10 Para todas las inmunizaciones posteriores, las glándulas salivales se diseccionaron a partir de 500 mosquitos y se almacenaron a -70°C diariamente. El día de la inoculación, las muestras se descongelaron, se agruparon y se homogeneizaron con un mazo (Kontes EF2488A). El mazo se enjuagó con 100 µl de PBS que se añadió al grupo. La muestra se reconstituyó hasta un volumen final de 600 µl de PBS y se emulsionó en los 30 minutos después de la reconstitución.

iii) Emulsión de las glándulas salivales

15 Se obtuvieron viales de vidrio de dos ml (dos viales para el control adyuvante, dos viales para las glándulas salivales en adyuvante). 750 µl de adyuvante Montanide ISA 720 se extrajeron a través de una jeringa de filtro de 5 micras. Se inyectaron 700 µl del coadyuvante filtrado en cada vial de vidrio. Se añadieron 300 µl de PBS al vial de control y trescientos µl de glándulas salivales en PBS al vial experimental. Los viales se cubrieron con un tapón de caucho. Cada vial se tapó adicionalmente con una tapa de sellado de aluminio y se prensó el sello con un punzonador. Los
20 viales se colocaron en los pequeños orificios de una almohadilla de vórtice, se unieron con cinta adhesiva y se sometieron a vórtice durante 30 minutos.

iv) Cantidades de emulsión e inoculación

25 Para la inmunización primaria se usaron dos viales de vidrio para emulsionar el antígeno de 1.000 mosquitos, (cada uno de los cuales contenía 1000 µl de una proporción en volumen 300:700 de glándula salival/PBS:adyuvante de Montanide) dando un volumen de emulsión total de 2 ml. Para inmunizaciones posteriores, el antígeno de 500 mosquitos se emulsionó de forma similar en un volumen total de 2.000 µl. Por lo tanto, se inyectó la mitad de la concentración de antígeno en inmunizaciones posteriores en el mismo volumen de emulsión que el inóculo primario. Los conejos de control en todas las inmunizaciones recibieron 2 ml de emulsión que contenía una proporción en volumen de 300:700 de PBS:adyuvante. Todas las emulsiones se inocularon en conejos en una hora de
30 emulsificación.

Los conejos experimentales recibieron 2.000 µl de emulsión de glándulas salivales:adyuvante (proporción 300:700 en volumen) inyectada subcutáneamente en ocho sitios, 250 µl por sitio. Los conejos de control recibieron 2.000 µl de emulsión de PBS:adyuvante (proporción 300:700 en volumen) inyectada subcutáneamente en ocho sitios, 250 µl por sitio.

35 v) Programa de inmunización de conejos

La Tabla 1 proporciona el programa de inmunización utilizado para generar el anticuerpo policlonal utilizado en los ejemplos proporcionados en la presente memoria. Este esquema no pretende ser limitativo con respecto al método de la preparación de anticuerpos policlonales, sino que se proporciona sólo como un ejemplo y la descripción del anticuerpo usado en la presente memoria

40 Tabla 1 – Programa de inmunización

Tiempo (días)	Procedimiento
0	Dos conejos pre-sangrados (uno control y uno experimental) para el suero que se utilizará como referencia para evaluar los títulos de anticuerpos.
0	Primera inoculación de conejo experimental con 2.000 µl de emulsión de material de glándula salivar diseccionada de 1.000 mosquitos y conejo de control con 2.000 µl de emulsión de 1X PBS y Montanide ISA 720.
21	Segunda inoculación de conejo experimental con 2.000 µl de emulsión de material de glándulas salivales diseccionado de 500 mosquitos y conejo de control con 2.000 µl de emulsión de 1X PBS y Montanide ISA 720.
30	Prueba sangrado N° 1; pre-sangrado y sueros de prueba recibidos para su evaluación

ES 2 640 614 T3

42	Tercera inoculación de conejo experimental con 2.000 µl de emulsión de material de glándula salival diseccionada a partir de 500 mosquitos y conejo de control con 2.000 µl de emulsión de 1X PBS y Montanide ISA 720
51	Prueba sangrado N° 2; sueros recibidos para su evaluación
57	Cuarta inoculación de conejo experimental con 2.000 µl de emulsión de material de la glándula salival diseccionada de 500 mosquitos y conejo de control con 2.000 µl de emulsión de 1X PBS y Montanide ISA 720.
66	Ensayo sangrado N° 3; sueros recibidos para su evaluación.
92	Basándose en los resultados del sangrado de prueba N° 3, se administró una inoculación adicional de material de la glándula salival. La quinta inoculación de conejo experimental con 2.000 µl de emulsión de material de glándulas salivales diseccionado a partir de 500 mosquitos y control de conejo con emulsión de 2.000 µl de 1x PBS y Montanide ISA 720.
102	Se exsanguinaron conejos y se obtuvieron 45 ml de suero de cada conejo.

B - Ensayo ELISA de SGM

Se utilizó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para cuantificar el material auxiliar. Como ejemplo, se cuantificó el material de las glándulas salivales (SGM) procedente de las glándulas salivales de *A. stephensi* en preparaciones de esporozoítos de *P. falciparum*. Las placas de ELISA (Nunc MaxiSorp Cert, N/Ster, PS, 96 pocillos de fondo plano Immuno Plate, Cat. 439454) con diluciones de los patrones SGM (preparados a partir de glándulas salivales de mosquitos no infectados) y muestras de esporozoítos de preparaciones de glándulas salivales crudas, así como muestras de las preparaciones de esporozoítos purificadas fueron preparadas para el ensayo. El anticuerpo primario era suero anti-SGM de conejo (descrito en A, anterior) diluido 1:200. El anticuerpo secundario fue IgG anti-conejo conjugada con fosfatasa alcalina diluida 1:5.000 (Promega, Cat. N° S373B). Se usaron los Kits KPL Blue Phos Substrate and Stop (KPL, Cat No. 50-88-06 y 50-89-00). Las placas se leyeron en un lector de microplacas Molecular Devices a 635 nm.

Existen dos componentes para el ensayo utilizado para cuantificar SGM en las preparaciones de esporozoítos. El primero consiste en generar una curva estándar con SGM de referencia de concentración conocida, y el segundo consiste en cuantificar la cantidad de SGM presente en las muestras de pre-purificación y post-purificación. Se genera una nueva curva estándar para cada ensayo usando un estándar de referencia SGM (RS-SGM) de concentración SGM conocida como antígeno de captura. Para establecer la curva estándar, se preparó una dilución en serie de concentración decreciente (de 2,0 a 0,05 µg/ml) de RS-SGM en E-199 con 1% de HSA. Para evaluar el SGM residual en preparaciones de esporozoítos de pre-purificación y post-purificación, estas muestras también se diluyeron en serie en E-199 con HSA al 1%. Las muestras de RS-SGM diluidas y las preparaciones de esporozoítos se diluyeron adicionalmente a HSA al 0,25% con 1XPBS y se añadieron a la placa de ELISA por triplicado. Esta dilución en PBS es necesaria porque disminuye el contenido de HSA. El HSA actúa como agente bloqueante y puede disminuir la sensibilidad del ensayo. Las placas de ELISA recubiertas con SGM se incubaron primero con el antisuero anti-SGM policlonal de conejo (véase el párrafo 100) y luego con los anticuerpos anti-conejo marcados con enzima y finalmente con un sustrato enzimático (véase el párrafo 101). En la presencia de SGM, el sustrato enzimático cambia de color y las densidades ópticas (OD) del contenido de los pocillos cambian. La OD de cada muestra se determinó usando el lector de microplacas. Para determinar la cantidad de SGM en las preparaciones de esporozoítos, los valores de OD de estas muestras y el patrón de referencia se ajustaron con un modelo mixto logístico que tiene asíntotas comunes y pendiente pero valores de ED50 separados para cada muestra. Los valores relativos del ED50 se usaron en combinación con la concentración conocida (o asignada) de SGM en la muestra de referencia para estimar la concentración de SGM en las muestras de esporozoíto y VBP de prepurificación. Los límites de confianza inferior y superior del 95% se determinaron de manera similar para las preparaciones de esporozoítos a partir de los datos globales que incorporaron una estimación de la variación basada en tres ensayos experimentales que contenían un patrón de referencia común y muestras de ensayo. A partir de los números de esporozoítos que se sabe que están presentes en cada preparación de esporozoítos, se calculó los ng de esporozoítos SGM/25.000, así como los factores de reducción y las reducciones porcentuales del material auxiliar.

La Tabla 2 muestra los resultados de 10 campañas de producción. "Inicio" representa las cantidades medidas en ng de SGM/25.000 esporozoítos en preparaciones crudas agrupadas después de la trituración de las glándulas salivales disecadas de mosquitos infectados. "Final" representa la cantidad medida correspondiente de SGM en preparaciones que se purificaron por los métodos proporcionados en la presente memoria. Esta metodología da lugar a una purificación sustancial de los esporozoítos - 99,9% o más.

Se reconoce que los valores que surgen de las mediciones experimentales proporcionadas para ng SGM/25.000 esporozoítos se basan en los resultados del ensayo actual como se describe, no son absolutos y pueden ser algo diferentes si se usa otro ensayo o método de análisis.

Tabla 2. Purificación de esporozoítos

Número de campaña	ng[SGM]/25,000spz			Factor de reducción		SGM residual (%)	% de reducción
	Inicio	Final	95% CI inferior	95% CI superior			
1	1.091,65	1,01	0,74	1,38	1,081	0,09	99,91
2	511,00	0,19	0,12	0,28	2,689	0,04	99,96
3	836,64	0,23	0,16	0,35	3,637	0,03	99,97
4	757,11	0,29	0,20	0,41	2,610	0,04	99,96
5	847,90	0,70	0,51	0,96	1,211	0,08	99,92
6	780,66	0,65	0,47	0,90	1,201	0,08	99,92
7	893,88	0,61	0,44	0,85	1,465	0,07	99,93
8	407,37	0,29	0,19	0,44	1,404	0,07	99,93
9	508,42	0,35	0,24	0,52	1,452	0,07	99,93
10	719,45	0,67	0,48	0,94	1,073	0,09	99,91
Media geométrica ^a	706,88	0,51	0,34	0,67	1,625	0,07	99,93

5 a - Los datos que comprenden las columnas 'Inicio', 'Factor de reducción' y 'Reducción porcentual' están sesgados. Por lo tanto, se calcularon las medias geométricas para estos datos. Los datos en las otras columnas se trataron de la misma manera para la consistencia.

Ejemplo 2 - Purificación de los esporozoítos en la campaña 3

10 Los esporozoítos se purificaron a partir de preparaciones de glándulas salivales trituradas usando filtración de exclusión de tamaños como se describe. Los esporozoítos se mantuvieron durante todo el proceso de purificación en medio de purificación. Al final de la purificación, se retiraron muestras para su observación visual (examen microscópico), pruebas de biocarga (USP <61>), pruebas de Mycoplasma y Spiroplasma, determinación in vitro de contaminantes virales; y el ensayo SGM-ELISA.

A - Purificación de los esporozoítos

15 Preparación del material para la purificación: El producto de disección triturado de entre 272 y 356 mosquitos fue recibido en conjunto en un tubo. Se retiró una muestra (5 µl) del producto de disección y se dejó de lado a 22°C para su observación visual después de la agrupación (Fig. 1a). El producto de disección restante se diluyó entonces hasta 10 ml con el medio de purificación. Se retiró una muestra (total de 100 µl) en este punto para el recuento (20 µl) y el ensayo SGM (60 µl). Todas las soluciones y muestras se mantuvieron a aproximadamente 22°C durante la duración de la purificación.

25 Procedimiento de purificación: Utilizando una bomba peristáltica a un caudal de aproximadamente 4 ml/min (aproximadamente 140 l/h/m2), el producto de disección diluido se bombeó a través de tres filtros (filtro nº 1, filtro nº 2 y filtro nº 3) conectados en serie y capturados por filtración sin fin en el filtro nº 4. El filtro nº 1, un filtro de profundidad, tenía un tamaño de poro de 10 micras (Polygard®-CN Optiscale - Millipore Cat. Nº SN1HA47HH3). El tamaño de poro del Filtro nº 2, un filtro de profundidad, fue de 0,6 micras (filtro Polygard®-CN Optiscale -Millipore Cat. Nº SN06A47HH3). El filtro nº 3 tenía un tamaño de poro de 1,2 micrómetros (membrana Isopore, 47 mm de diámetro - Millipore Cat. RTTP04700) mantenido en un soporte de filtro Swin-Loc (Whatman Cat. No. 420400). El material filtrado se capturó en el filtro nº 4 en una célula de ultrafiltración agitada (Millipore, modelo 8200) equipada con una membrana Isopore, 90 mm de diámetro y un tamaño de poro de 0,4 µm (Millipore Cat. Nº HTTP09030). Se bombearon un total de 100 ml de medios de purificación para la operación nº 1 y un total de 120 ml para las operaciones nº 2-5 a través de las membranas junto con el producto de disección diluido. Esto se siguió con otros 100 ml de medio de purificación aplicado al Filtro nº 4. Cuando el volumen de retenido alcanzó aproximadamente 5-

10 ml, se recogió junto con lavados utilizando medios de purificación en un total de 35 ml que se transfirió a un tubo de centrifuga Oak Ridge de 35 ml estéril. Se recogieron otros 35 ml de lavado de una manera similar y también se transfirieron a un segundo tubo estéril de centrifuga Oak Ridge de 35 ml. Los tubos de Oak Ridge de 35 ml se centrifugaron a 16,340 g durante cinco minutos y se resuspendieron para contar y se mantuvieron a aproximadamente 22°C.

Después de contar, el material se resuspendió a una concentración de aproximadamente 15-18 x 10⁶ esporozoítos/ml. Se retiraron 150 µl para la evaluación de SGM y se almacenaron congelados a -70°C antes de realizar el ensayo SGM-ELISA. Se retiraron 20 µl de la preparación de PfSPZ purificada y se aplicaron a un portaobjetos de microscopio (Figura 1b). Se dejó reposar los esporozoítos durante al menos 5 minutos, hasta 30 minutos, y se observaron los esporozoítos a un aumento de 200X. Se llevó a cabo un procedimiento similar para la muestra de pre-purificación (Figuras 1a y 1b). Los datos específicos para cada operación en la campaña se presentan en la Tabla 3 y un análisis microscópico (fotomicrografía) de muestras pre- y post-purificación se presenta en la Figura 1a y 1b.

En la campaña 3, siete operaciones que utilizan entre 272 y 356 mosquitos por operación (2146 mosquitos totales) con rendimientos de esporozoítos purificados por operación que van del 40% al 75% (media del 57%) dando un total de 61,3 x 10⁶ esporozoítos purificados antes de la eliminación de todas las muestras para ensayos en proceso y de liberación. El ensayo de SGM (Ejemplo 1 - Tabla 2 - Campaña 3) mostró que los esporozoítos purificados contenían 0,23 ng SGM/25.000 esporozoítos. El contenido de SGM del material de pre-purificación reunido contenía 836,64 ng/25.000 esporozoítos. En este ejemplo hubo una purificación total de 3.637 veces de esporozoítos en el proceso de purificación. El ensayo de biocarga modificado USP <61> mostró que no había unidades formadoras de colonias, es decir, ninguna contaminación microbiana.

Tabla 3. Producción de esporozoítos - Campaña 3

Nº de operación	Inicio de Purificación			Final de Purificación	
	Mosquitos diseccionados	PfSPZ/Mosquito (x10 ⁻³)	Total PfSPZ (x10 ⁻⁶)	Total PfSPZ (x10 ⁻⁶)	Rendimiento (%)*
1	356	36,5	13,0	9,8	75,4
2	330	43,9	14,5	9,2	63,4
3	272	57,9	15,8	6,6	41,8
4	298	47,8	14,3	10,6	74,1
5	326	65,2	21,3	12,7	59,6
6	274	65,2	17,9	8,1	45,3
7	290	37,1	10,8	4,3	39,8
TOTAL	2146		107,6	61,3	
MEDIA		50,5			57,1

% Rendimiento = 100 x (Nº SPZ al final/Nº SPZ al inicio)

Ejemplo 3 - Purificación de esporozoítos en la campaña 6

Los esporozoítos se purificaron a partir de preparaciones de glándulas salivales trituradas usando filtración por exclusión de tamaños como se describe en el Ejemplo 2 anterior. Los esporozoítos se mantuvieron durante todo el proceso de purificación en medio de purificación. Se retiraron muestras para su observación visual (examen microscópico), pruebas microbiológicas y ensayo SGM-ELISA para cuantificar la cantidad de SGM en las muestras. Se prepararon muestras y se purificaron como en el Ejemplo 2.

En la campaña 6, ocho operaciones que utilizaron entre 343 y 395 mosquitos por operación (2997 mosquitos en total) con rendimientos de esporozoítos purificados por operación que oscilaban entre 51% y 87,5% (media 72,3%) dando un total de 160,5 x 10⁶ esporozoítos purificados antes de la eliminación de todas las muestras para ensayos en proceso y liberación (Tabla 4). El ensayo SGM-ELISA (Ejemplo 1 - Tabla 2 - Campaña 6) mostró que los esporozoítos purificados contenían 0,65 ng SGM/25.000 esporozoítos. El contenido de SGM del material de pre-purificación reunido contenía 780,66 ng/25.000 esporozoítos. En este ejemplo, hubo una purificación total de 1,201 veces de esporozoítos en el proceso de purificación. El ensayo de biocarga modificado USP <61> mostró que no

había unidades formadoras de colonias, es decir, ninguna contaminación microbiana. Los análisis microscópicos (fotomicrografía) de las muestras pre- y post-purificación se presentan en la Figura 2.

Tabla 4. Campaña de producción de esporozoítos 6

Nº de operación	Inicio de Purificación			Final de Purificación	
	Mosquitos diseccionados	PfSPZ/Mosquito (x10 ⁻³)	Total PfSPZ (x10 ⁻⁶)	Total PfSPZ (x10 ⁻⁶)	Rendimiento (%)*
1	372	89,7	33,4	29,2	87,4
2	395	115,2	45,5	23,2	51,0
3	395	101,3	40,0	22,2	55,5
4	384	99,9	38,4	20,6	53,6
5	366	72,4	26,5	14,8	55,8
6	343	43,4	14,9	10,1	67,8
7	363	86,8	31,5	19,3	61,3
8	379	67,3	25,5	21,1	82,7
TOTAL	2997		255,7	160,5	
MEAN		84,5			64,4

5

*% Rendimiento = 100 x (Nº SPZ al final/ Nº SPZ al inicio)

Ejemplo 4: Infección de una línea celular de hepatocitos humanos (HC-04 [1f9]) con esporozoítos de P. Falciparum irradiados (150 gy) de las campañas 5, 6 y 7.

10 Métodos. Se incubaron PfSPZ durante tres días con células HC-04 (1F9), y luego se evaluó la expresión de PflSA-1.

Tabla 5. Expresión de PflSA-1 en los parásitos de la etapa hepática después de la irradiación de PfSPZ.

Campaña	PfSPZ/pocillo	Anticuerpo primario contra	Días en cultivo	Número de parásitos que expresan PflSA-1			Promedio/pocillo	Desviación estándar
				Pocillo 1	Pocillo 2	Pocillo 3		
5	25.000	PflSA-1	3	356	327	387	356,7	30,01
6	25.000	PflSA-1	3	401	359	378	379,3	21,03
7	25.000	PflSA-1	3	426	369	381	392,0	30,05

15 Resultados e Interpretación. La detección del antígeno 1 del estadio hepático de Plasmodium falciparum (PflSA-1), expresada en parásitos del estadio hepático, es una indicación de la potencia de los esporozoítos atenuados y purificados. Como se muestra en la Tabla 5, PflSA-1 se expresa por parásitos de la etapa hepática de P. falciparum después de los esporozoítos han sido expuestos a 150 Gy.

Ejemplo 5 Infección de una línea celular de hepatocitos humanos (HC-04 [1F9]) con esporozoítos de P. Falciparum irradiados (100, 120, 142,5, 150 Gy) o no irradiados.

20 Métodos. Los esporozoítos se incubaron durante tres días en células HC-04 (1F9), y luego se evaluó la expresión de PflSA-1.

5 Tabla 6. Número de parásitos del estadio hepático que expresan PflSA-1 después de diferentes dosis de irradiación.

Dosis de radiación (Gy)	Número de parásitos que expresan PflSA-1 por pocillo				Desviación estándar	% CV
	Pocillo 1	Pocillo 2	Pocillo 3	Media		
0	363	322	341	342,0	20,52	1,37
100	321	302	287	303,3	17,04	1,21
120	286	307	323	305,3	18,56	1,22
142,5	318	337	293	316,0	22,07	1,26
150	341	309	285	311,7	28,10	1,25

10 Resultados e Interpretación. Fueron añadidos 25.000 PfSPZ, que habían sido expuestos a diferentes dosis de radiación como se indica (Tabla 6) a cada pocillo de portaobjetos Lab-Tek de 8 pocillos que contenían células HC-04 (1F9). Los portaobjetos se incubaron durante 3 días y se evaluaron los parásitos que expresaban PflSA-1. Como se muestra en la Tabla 6, en comparación con los esporozoítos de Pf no irradiados, los esporozoítos de Pf expuestos a 150 Gy tenían 91% de la actividad de esporozoítos de Pf no irradiados en este ensayo. Esta diferencia no alcanzó el nivel de significación estadística en una prueba t de Student de dos colas ($p = 0,21$).

15

REIVINDICACIONES

1. Una preparación purificada de esporozoítos infecciosos de especies de Plasmodium de glándulas salivales de mosquitos que comprenden menos de 85 nanogramos de SGM (material de glándula salival) de mosquito por cada 25.000 esporozoítos, medido por ELISA utilizando suero anti-SGM de conejo como anticuerpo primario e IgG anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario.
2. La preparación purificada de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un excipiente, y que comprende menos de 15 nanogramos de SGM de mosquito por 25.000 esporozoítos, menos de 1 nanogramo de SGM de mosquito por 25.000 esporozoítos, o menos de 0,12 nanogramos de SGM de mosquito por 25.000 esporozoítos, medido por ELISA usando suero anti-SGM de conejo como anticuerpo primario e IgG anti-conejo conjugada con fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario.
3. La preparación purificada de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dichos esporozoítos se purifican a partir de una preparación de pre-purificación de material de glándula salivar de mosquito en la que al menos el 98% de SGM de mosquito se ha eliminado de dicha preparación de pre-purificación, al menos 99,9% de SGM de mosquito ha sido retirado de dicha preparación de pre-purificación, o al menos 99,97% de SGM de mosquito ha sido retirado de dicha preparación de pre-purificación.
4. La preparación purificada de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 preparada asépticamente.
5. La preparación purificada de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dichos esporozoítos contienen uno o más transgenes.
6. La preparación purificada de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la especie de dicho esporozoíto de la especie Plasmodium se elige del grupo que consiste en *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. knowlesi* y *P. ovale*.
7. La preparación purificada de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dichos esporozoítos están suficientemente atenuados de manera que después de la infección de un huésped, dichos parásitos no causan patología de la enfermedad de la malaria y en la que dicha atenuación se establece mediante la introducción de una alteración genética hereditaria o mutación genética, o por exposición a la radiación, exposición química o exposición ambiental.
8. La preparación purificada de la reivindicación 7, en la que la atenuación se establece por exposición a la radiación y donde dicha exposición a la radiación es de al menos 100 Gy, pero no más de 1000 Gy de radiación o donde dicha exposición a la radiación es 150 Gy.
9. La preparación purificada de la reivindicación 7 u 8 para su uso en conferir inmunidad protectora frente a la malaria inducida por una infección por parásitos de la especie de Plasmodium de un huésped humano o de otro mamífero, comprendiendo dicho uso la administración de al menos una dosis de la preparación purificada de esporozoítos atenuados metabólicamente activos; en el que dicha preparación purificada se prepara asépticamente y en donde las manifestaciones patológicas de dicha malaria se previenen en dicho huésped tras la exposición subsiguiente a parásitos patógenos de dichas especies de Plasmodium.
10. La preparación purificada para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, comprendiendo dicho uso la administración de al menos dos o al menos tres dosis de dicha preparación.
11. La preparación purificada de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en la confección de inmunidad protectora contra la malaria inducida por una infección parasitaria de la especie de Plasmodium en un huésped humano u otro mamífero, comprendiendo dicho uso la administración de un régimen de un fármaco antipalúdico concurrente con la administración de al menos una dosis de la preparación purificada de esporozoítos patógenos asépticamente preparados de dichas especies de Plasmodium, en la que se confiere inmunidad protectora en dicho huésped humano u otro mamífero y se evitan las manifestaciones patológicas de dicha malaria.
12. La preparación purificada para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicho fármaco antipalúdico es cloroquina.
13. Un método para la purificación de esporozoítos de Plasmodium metabólicamente activos, comprendiendo dicho método:
 - a. Proporcionar una preparación acuosa de pre-purificación derivada de las glándulas salivales de mosquitos que comprenden esporozoítos de Plasmodium y material no esporozoítico específico para las glándulas salivales de los mosquitos;
 - b. Hacer pasar dicha preparación de pre-purificación secuencialmente a través de un conjunto de filtros de exclusión de tamaños que comprende:
 - i) un primer filtro de matriz con un tamaño de poro nominal de 5 a 20 micrómetros;

- ii) un segundo filtro de matriz con un tamaño de poro nominal de 0,6 a 1,2 micrómetros;
- iii) un tercer filtro de membrana grabado en pista con un tamaño de poro de 1,2 a 3,0 micrómetros;
- c. Recoger dicha preparación de esporozoítos purificados en un filtro colector de filtración sin fin con un tamaño de poro capaz de retener dichos esporozoítos; y
- 5 d. Retirar dicha preparación de esporozoítos purificados del filtro colector; en el que dicha preparación de esporozoítos purificada comprende menos de 85 ng de material no esporozoítico específico a las glándulas salivales de mosquitos por 25.000 esporozoítos, medido por ELISA usando suero anti-SGM de conejo como anticuerpo primario e IgG anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario.
- 10 14. El método de la reivindicación 13 en el que dichos primer, segundo y tercer filtros están conectados secuencialmente en un sistema en el que dichos esporozoítos pasan a través de dichos filtros con un flujo.
- 15 15. El método de la reivindicación 14, en el que dicho sistema tiene un flujo de al menos 3 l/h/m² pero no más de 1500 l/h/m², o al menos 125 l/h/m², pero no más de 250 l/h/m².
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en el que dicho primer filtro tiene un tamaño de poro nominal de 10 micrómetros.
- 15 17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en el que dicho segundo filtro tiene un tamaño de poro nominal de 0,6 micrómetros.
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13-17, en el que dicho tercer filtro tiene un tamaño de poro de 1,2 micrómetros.
- 20 19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13-18, en el que dicho filtro de recogida tiene un tamaño de poro de 0,4 micrones.
20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13-19, en el que dicha preparación purificada comprende menos de 85 nanogramos de dicho material por cada 25.000 esporozoítos, menos de 15 nanogramos de dicho material por 25.000 esporozoítos, menos de 1 nanogramo de dicho material por 25.000 esporozoítos o menos de 0,12 nanogramos de dicho material por 25.000 esporozoítos.
- 25 21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13-20, en el que al menos el 98% de dicho material se ha eliminado de la preparación de pre-purificación, se ha eliminado al menos el 99,9% de dicho material de la preparación de pre-purificación, o al menos el 99,97% de dicho material se ha eliminado de la preparación de pre-purificación.

30

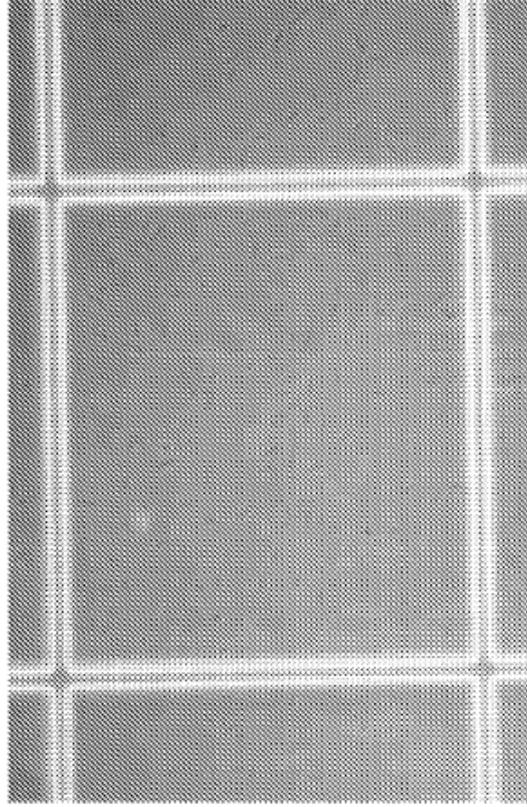


FIG. 1b

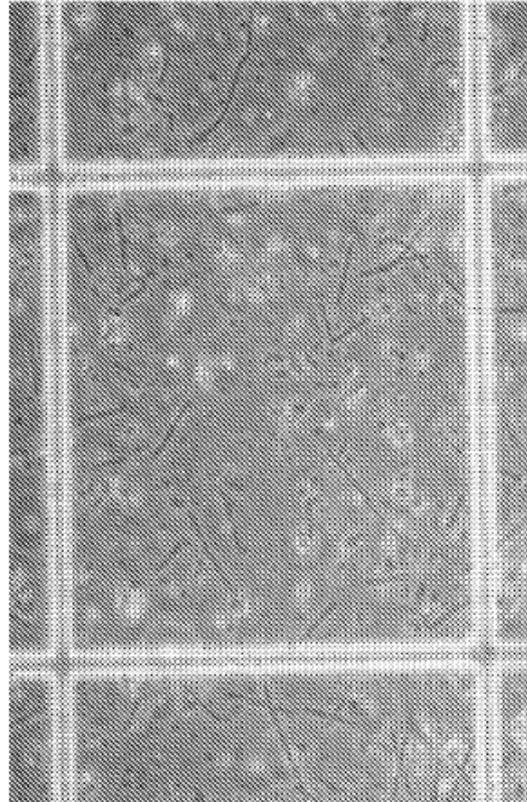


FIG. 1a

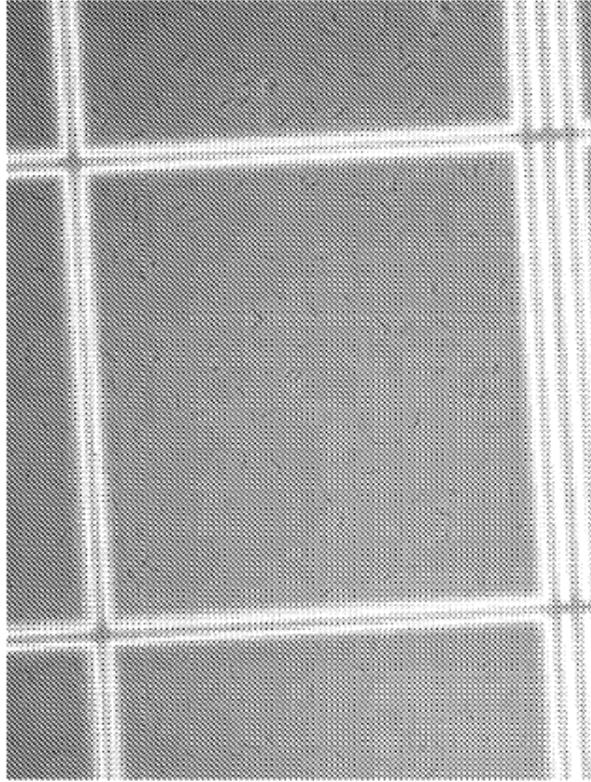


FIG. 2b

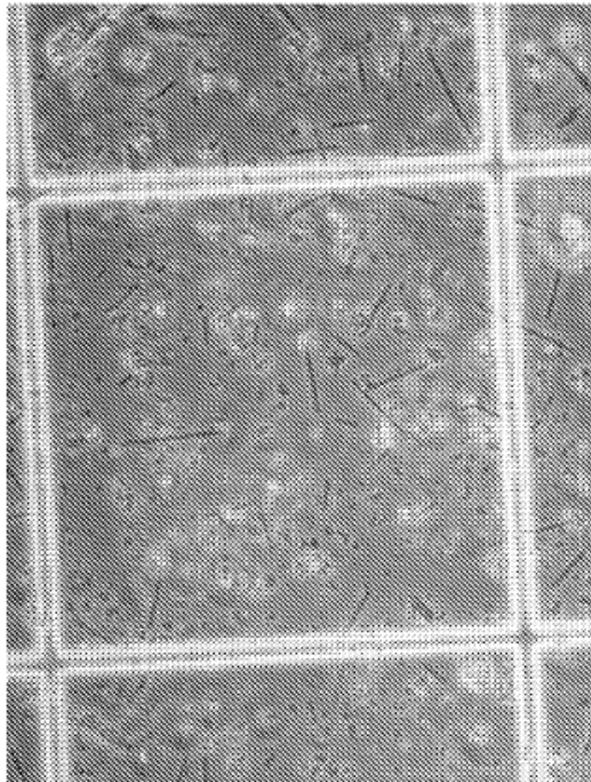


FIG. 2a



FIG.3a

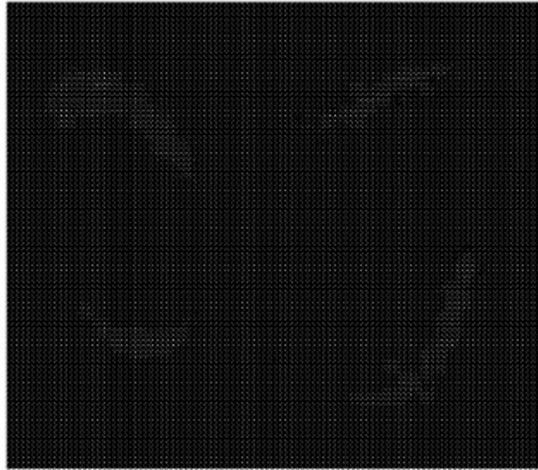


FIG.3b

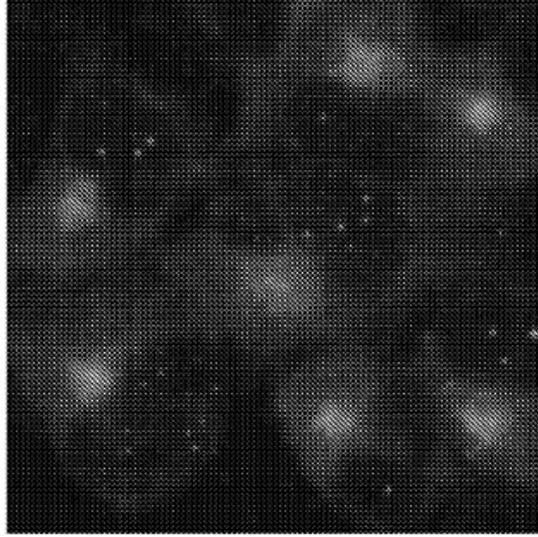


FIG.3c