



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 765**

51 Int. Cl.:
C12N 15/30 (2006.01)
C12N 15/863 (2006.01)
A61K 39/002 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03769329 .8**
96 Fecha de presentación : **26.09.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1554383**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.07.2005**

54 Título: **Cepas de MVA recombinantes como vacunas potenciales contra la malaria por *P. falciparum*.**

30 Prioridad: **23.10.2002 DE 102 49 390**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.05.2010

73 Titular/es: **Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Grabengasse 1
69117 Heidelberg, DE
Helmholtz Zentrum München Deutsches
Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
(GmbH)**

72 Inventor/es: **Sutter, Gerd;
Bujard, Hermann;
Westerfeld, Nicole y
Miao, Jun**

74 Agente: **Miltényi, Peter**

ES 2 339 765 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

Cepas de MVA recombinantes como vacunas potenciales contra la malaria por *P. falciparum*.

5 **Introducción**

Aquí se describen la producción de virus *vaccinia* recombinantes de la cepa MVA (virus *vaccinia* Ankara modificado) para la producción recombinante del antígeno de la malaria gp190/MSP-1 completo del agente patógeno de la malaria *Plasmodium falciparum* así como dominios naturales individuales y partes de los mismos. Además la invención se refiere al uso de MVA recombinantes, que llevan la secuencia sintética de ADN del antígeno de la malaria así como partes de la misma integradas en el genoma vírico, como vacuna para la inmunización contra la malaria.

La malaria se cuenta entre las enfermedades infecciosas más graves del mundo. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) cada año se registran de 400 a 900 millones de episodios de la enfermedad. Según informaciones de la Iniciativa Multilateral contra la Malaria (MIM) cada año mueren entre 700.000 y 2,7 millones de personas por la infección (MIM, 2001). Además en 99 países el 40% de la población mundial está expuesta a riesgo de malaria. La enfermedad está causada por protozoos unicelulares del género *Plasmodium* del filo *Apicomplexa*. Hay cuatro especies que infectan a los seres humanos: *Plasmodium malariae*, responsable de la fiebre cuartana, *Plasmodium vivax* y *Plasmodium ovale*, que causan ambos la fiebre terciana y finalmente *Plasmodium falciparum*, el agente patógeno de la malaria tropical y responsable después de todo de casi todas las infecciones mortales.

Actualmente su propagación aumenta de nuevo. Esto es debido sobre todo al desarrollo de una intensa resistencia del agente patógeno de la malaria, que es favorecida debido a que los medicamentos utilizados en la terapia son además recomendados y empleados para la profilaxis. Junto a la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos la investigación se concentra en el desarrollo de vacunas, que en el curso de las infecciones de malaria inducen mecanismos de inmunidad en seres humanos, que muestran una capacidad de resistencia aumentada contra los *Plasmodium*, como se muestra en el desarrollo de distintos tipos de inmunidad en seres humanos en las regiones epidémicas de malaria.

MSP-1 como vacuna potencial

MSP-1, la proteína principal de la superficie de los merozoítos, la forma invasora de la fase sanguínea del agente patógeno de la malaria, es una proteína de 190-220 kDa. Esta proteína se procesa más tarde durante el desarrollo de los merozoítos en fragmentos proteicos más pequeños, que hasta la invasión de eritrocitos por el parásito se encuentran como complejos anclados mediante un anclaje de glicosilfosfatidil-inositol sobre la superficie del merozoíto y se pueden aislar.

Las secuencias de las proteínas MSP-1 de distintas cepas de *P. falciparum* pertenecen a dos grupos, que se nombran según dos aislados representativos K1 y MAD20. En conjunto la proteína consta de varias regiones muy conservadas, de regiones dimorfas de las que se puede adjuntar respectivamente una de las dos y de dos bloques oligomorfos relativamente pequeños en la parte N-terminal de la proteína (Fig. 1, Tanabe *et al.*, 1987).

La inmunización de ratones con la proteína purificada del parásito *P. yoelii* protegió a los animales de la en caso contrario infección mortal (Holder y Freeman, 1981). También la transferencia de anticuerpos monoclonales contra MSP-1 de *P. yoelii* proporcionó protección en un modelo de ratón (Majarian *et al.*, 1984).

Además de los estudios en ratones también se inmunizaron monos *Saimiri* y *Aotus* con MSP-1 nativa purificada por inmunoadfinidad. En estos experimentos la proteína obtenida de *P. falciparum* protegió de forma parcial (Perrin *et al.*, 1984) o total (Siddiqui *et al.*, 1987) contra la posterior infección con el parásito.

Una purificación del material nativo de *Plasmodium* es realmente costosa y no permite la producción a gran escala. Por lo tanto la investigación en vacunas se concentra en el desarrollo de vacunas recombinantes.

De esta manera se inmunizaron con éxito ratones con MSP-1-19 purificada de *E. coli* o *Saccharomyces cerevisiae* (Daly y Long, 1993; Ling *et al.*, 1994; Tian *et al.*, 1996; Hirunpetcharat *et al.*, 1997), así como con *Mycobacterium bovis* que llevan MSP-1-19 (Matsumoto *et al.*, 1999). De forma alternativa a la inmunización con proteínas nativas o recombinantes también se usó como vacuna el ADN codificante de MSP-1-19 y protegió a los ratones inmunizados de la infección con *P. chabaudi* (Wunderlich *et al.*, 2000).

Las inmunizaciones de monos con MSP-1-19 y MSP-1-42 recombinantes de *P. falciparum* proporcionó protección parcial (Kumar *et al.*, 1995; Egan *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 1996; Stowers *et al.*, 2001). La interpretación de los experimentos de inmunización en monos solo es realmente posible de forma limitada, ya que no se da un análisis estadístico de los resultados debido al pequeño número de animales de experimentación.

En estudios en fase I y II con fragmentos de MSP-1 como vacuna también se ha mostrado su inmunogenicidad en seres humanos. Se trata de p19 de *P. falciparum* fusionada a un epítipo de célula T auxiliar de la toxina del tétanos (Keitel *et al.*, 1999) y los bloques 3 y 4 de MSP-1 (Saul *et al.*, 1999; Genton *et al.*, 2000).

ES 2 339 765 T3

Algunos estudios epidemiológicos en regiones endémicas mostraron una correlación en adultos entre los títulos de anticuerpo contra MSP-1 y la inmunidad contra la malaria (Tolle *et al.*, 1993; Riley *et al.*, 1992; Riley *et al.*, 1993).

5 Estas investigaciones junto con los estudios de inmunización en animales demuestran que MSP-1 se trata de un candidato muy prometedor para el desarrollo de una vacuna contra la malaria.

En general estos estudios se pueden diferenciar en dos planteamientos, o bien se usa material purificado de parásitos o material producido en sistemas heterólogos.

10 Tanto para investigaciones sobre la función como para el uso como vacuna, las proteína se deben producir con buen rendimiento, alta calidad y de forma reproducible. Si bien se puede purificar MSP-1 de parásitos, realmente esto solo es posible a pequeña escala con grandes gastos y por lo tanto la producción de MSP-1 según los criterios mencionados no es realizable de este modo.

15 Los virus *vaccinia* pertenecen al género *Orthopoxvirus* en la subfamilia de los *Chordopoxvirinae*. Se trata respecto a los virus de la viruela de virus complejos, que con un genoma de ADN bicatenario de aprox. 200 kb y un tamaño de 250 x 350 nm pertenecen a los mayores virus conocidos. Constan de un virión en forma de ortoedro que está rodeado de una envuelta de membrana. En la célula huésped tiene lugar la replicación y generación del virus de la viruela exclusivamente en el citoplasma (para una revisión: Moss *et al.*, 1996). Los virus *vaccinia* tienen un espectro de células huésped muy amplio, infectan casi todas las células que provienen tanto de seres humanos como de animales. 20 En 1953 Anton Mayr aisló y purificó la cepa de dermovaccinia del corioalantoides *vaccinia* Ankara (CVA). Este virus se multiplicó mediante el pase continuo en fibroblastos embrionarios de pollo y de ahí se produjo un virus atenuado, que ya no muestra virulencia en animales y seres humanos (Stickl *et al.*, 1974). A pesar de ello se pudo seguir usando el virus para la inmunoprofilaxis contra las enfermedades ocasionadas por los *Orthopoxvirus* en seres humanos y 25 animales (Stickl *et al.*, 1974). Este virus se nombró virus *vaccinia* Ankara modificado (MVA) de acuerdo con su lugar de origen.

Examinado desde la genética molecular el virus ha perdido durante los más de 570 pases en fibroblastos embrionarios de pollo 31 kb de la secuencia de ADN de su genoma, principalmente en forma de seis grandes deleciones, entre 30 ellas al menos dos genes, que determinan el espectro de células huésped y por lo tanto la capacidad de replicación del virus (Meyer *et al.*, 1991). La construcción de partículas víricas infecciosas en una infección por MVA en la mayoría de las células procedentes de mamíferos, incluidas las células de seres humanos, se bloquea primeramente muy tarde en el ciclo infeccioso, en el paso de ensamblaje de los viriones, es decir, los genes víricos bajo el control de promotores tanto para la transcripción temprana como para la intermedia y la tardía también se pueden expresar en células 35 no permisivas. Esto diferencia al MVA de otros poxvirus atenuados y deficientes en replicación, como por ejemplo, el virus *vaccinia* NYVAC o el virus de la viruela del canario ALVAC, cuya infección en la mayoría de las células de mamíferos se interrumpe ya antes de la replicación del ADN vírico (Tartaglia *et al.*, 1992; Sutter y Moss, 1992).

Para el desarrollo de vacunas contra la malaria se usaron diferentes virus *vaccinia* recombinantes, entre ellos 40 se usaron virus competentes para la replicación del tipo Western Reserve y Copenhagen y virus atenuados del tipo NYVAC, ALVAC o COPAC (Kaslow *et al.*, 1991; Etlinger y Altenburger, 1991; Aidoo *et al.*, 1997; Allsopp *et al.*, 1996).

En relación con el virus *vaccinia* atenuado MVA se han descrito únicamente virus recombinantes que llevan como 45 antígeno de la malaria CSP del parásito de roedores *Plasmodium berghei* (Schneider *et al.*, 1998; Plabanski *et al.*, 1998; Degano *et al.*, 1999; Gilbert *et al.* 1999).

Además se han descrito virus *vaccinia* recombinantes que contienen una secuencia que codifica MSP-1. Los autores de una publicación exponen que han integrado la secuencia codificante de MSP-1 nativa en el genoma del virus 50 de tipo Western Reserve, pero no apoyan esta afirmación de forma experimental (ningún análisis de restricción, PCR, análisis de transferencia Northern o transferencia Southern, etc.). Una inmunización de monos Saimiri con este virus recombinante no produjo la formación de anticuerpos específicos para MSP-1 y además se mantuvo también sin influencia medible en la respuesta inmune humoral contra MSP-1 tras una infección con *P. falciparum* (Pye *et al.*, 1991).

55 En otra publicación se describe el vector NYVAC-Pf7 que expresa entre otros *msp-1* de *P. falciparum*. Los sueros de dos de los seis monos Rhesus inmunizados no muestran en el análisis de inmunotransferencia ninguna de las señales reconocibles en la publicación contra MSP-1 nativa. Las señales de otros tres animales reconocen únicamente partes del complejo proteico y solo el suero de un animal inmunizado reconoce un espectro de bandas más amplio. No se realizaron análisis cuantitativos para anticuerpos específicos contra MSP-1 mediante ELISA (Tine *et al.*, 1996).

En ensayos en seres humanos en fase I/IIa con NYVAC-Pf7 no se ha demostrado ni una respuesta inmune celular contra MSP-1 ni una respuesta inmune humoral medible mediante ELISA (Ockenhouse *et al.*, 1998).

65 Por el contrario, Tine y col. (1996) identifican MSP-1 intacta en el análisis por inmunotransferencia, en donde parece contradictorio, que MSP-1 se transporta fuera de la célula por medio de secuencias señal de *P. falciparum* (véanse las publicaciones de Moran y Caras, 1994, Yang *et al.*, 1997).

ES 2 339 765 T3

El objeto de la presente invención, por lo tanto, es preparar un virus *vaccinia* recombinante, que sea capaz de,

- contener secuencias de ADN que codifican MSP-1 de *P. falciparum* o partes de las mismas integradas de forma estable,
- expresar esas secuencias de forma estable y reproducible y de este modo
- producir proteína MSP-1 de forma secretada o anclada a la superficie, para
- inmunizar un huésped y por tanto
- ocasionar una respuesta inmune celular y humoral.

El objeto de la presente invención se soluciona mediante la preparación de una vacuna, que comprende

- a) un virus MVA recombinante, que comprende un fragmento o fragmentos del ácido nucleico que codifica la proteína MSP-1 de *Plasmodium falciparum*; y
- b) un vehículo farmacológicamente aceptable,

en donde el fragmento de MSP-1 o los fragmentos de MSP-1 codificado(s) por el ácido nucleico se elige(n) exclusivamente de:

- p42;
- p42 y p38;
- p83, p30, p42 y p38.

Según la invención, la expresión “virus basado en MVA” significa un virus derivado de MVA, que presenta una o más mutaciones en regiones no esenciales del genoma vírico. Las regiones esenciales del virus MVA son por ello todas las partes del genoma del virus MVA que son necesarias para el mantenimiento de la expresión génica vírica y la capacidad de multiplicación del virus MVA, aquí se cuentan por ejemplo las secuencias génicas que codifican para las subunidades de la ARN polimerasa vírica o la ADN polimerasa vírica. Preferiblemente el virus basado en MVA es el virus MVA.

El sistema *vaccinia* NYVAC-Pf7 conocido del estado de la técnica se basa en el virus básico NYVAC, que proviene originalmente de la cepa de virus *vaccinia* Copenhague y que se atenuó a través de las delecciones dirigidas de 18 marcos abiertos de lectura. Sin embargo, la replicación del ADN de NYVAC está bloqueada en células de mamíferos (Tartaglia *et al.*, 1992), mientras que en el caso de MVA el ensamblaje del virus está interrumpido. Esto tiene la ventaja, de que al contrario que en NYVAC en MVA la expresión génica tardía tiene lugar, lo que se puede usar para la expresión de genes recombinantes. MVA puede por eso tanto inducir preferiblemente durante la fase temprana de la transcripción una respuesta de células T citotóxicas como estimular la rama humoral de la respuesta inmune a través de la alta expresión de proteínas durante la fase tardía.

MVA, que ya durante la campaña de vacunación contra la viruela se empleó extensamente, se considera como un virus de vacunación muy seguro para los seres humanos (Stickl *et al.*, 1974).

Según la invención, un virus MVA recombinante que comprende al menos un ácido nucleico que codifican un fragmento o fragmentos de la proteína MSP-1 de *P. falciparum*.

La secuencia de aminoácidos de MSP-1 está disponible de bases de datos accesibles. 3D7 (aislado MAD20): CAA84556; FCB-1 (aislado K1): CAB36903. Ambas de la base de datos de los NIH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Especialmente preferido es el ácido nucleico que codifica el fragmento de MSP-1 o fragmentos de MSP-1, un ácido nucleico que tiene disminuido su contenido en AT como se describe en DE 19640817 A1. En especial es preferido un ácido nucleico que deriva de la secuencia MSP-1 de *P. falciparum* y en el que una gran parte de los codones de Plasmodium se cambian de modo que la frecuencia de codones del gen sintético corresponda a los humanos sin que por ello cambie la secuencia de aminoácidos.

Según una forma de realización preferida la proteína MSP-1 es la MSP-1 del aislado 3D7, la proteína MSP-1 que de aquí en adelante se denomina “MSP-1D”. De forma alternativa la proteína MSP-1 puede ser de la cepa FCB1, que de aquí en adelante se denomina “MSP-1F”. La proteína MSP-1 comprende los fragmentos indicados de estas dos formas de MSP-1. Aquí están comprendidos p42; p42 y p38; y p83, p30, p42 y p38. En particular es preferida la combinación p83 y p30, así como p38 y p42. La posición de los fragmentos se muestra en la figura 1. Además, también está comprendido el fragmento p42 de ambas formas de MSP-1.

ES 2 339 765 T3

En una forma de realización preferida el virus contenido en la vacuna comprende un promotor adecuado para la expresión, en donde la secuencia codificante de *msp-1* está bajo el control del promotor. El promotor puede ser un promotor de MVA, pudiendo ser el promotor un promotor génico temprano, intermedio o tardío o una combinación de los mismos. No obstante también están comprendidos promotores que no son de MVA, que son adecuados para la expresión en el sistema de expresión usado. Aquí se pueden usar tanto promotores constitutivos como inducibles. Para la producción de proteína a gran escala se puede usar un promotor fuerte del virus *vaccinia*, como el promotor sintético tardío o temprano/tardío o el sistema de polimerasa híbrido *vaccinia/T7*; para la inducción de respuesta de células T citotóxicas restringidas a MHC de clase I *in vivo* se puede usar preferiblemente un promotor natural temprano o el tándem temprano/tardío; además se puede usar el sistema represor/operador lac de *E. coli* o el sistema híbrido *vaccinia/T7* para la iniciación de la expresión génica; (Methods in Molecular Biology, Volumen 62, Editor Rocky S. Tuan, Humana Press, Broder y Earl, página 176, con identificación posterior).

Según una forma de realización preferida adicional el virus comprende además un marcador de selección. El marcador de selección es adecuado para la selección y/o cribado en una forma conocida. Los marcadores de selección adecuados comprenden por ejemplo, el sistema lacZ de *E. coli*, el sistema de selección que hace uso del gen de la xantina-guanina fosforribosil transferasa (XGPRT) de *E. coli*. Además se pueden usar métodos de selección que cambian la especificidad de célula huésped del virus (Staib *et al.*, 2000). Se pueden usar marcadores de selección adicionales conocidos en el estado de la técnica.

Según una forma de realización preferida adicional el ácido nucleico está fusionado en el extremo 5' con una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de péptido señal. Como se sabe del estado de la técnica, las secuencias señal y de anclaje de *P. falciparum* al expresarse en células de mamífero no son reconocidas o no se procesan correctamente (Moran y Caras, 1994; Burghaus *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1997).

El problema de la modulación selectiva de la compartimentación intracelular se resuelve mediante el uso de la secuencia señal de los "factores de aceleración de la degradación" (DAF) humanos (Fig. 2). Las secuencias adecuadas de péptido señal son específicas de eucariotas superiores. Ejemplos para tales secuencias señal junto a las de los factores de aceleración de la degradación son inmunoglobulinas o péptidos señal de diferentes factores de crecimiento y citoquinas (von Heijne, 1985). Según una forma de realización preferida la secuencia del péptido señal dirige la secreción de los productos génicos, por ejemplo citoquinas, anticuerpos, etc.

Además, son secuencias señal preferidas las que llevan a un anclaje por GPI del extremo C-terminal del producto génico en la superficie celular, como en los DAF humanos. De forma alternativa son preferidas secuencias de péptidos que dirigen la localización de unión a membrana del producto génico, como en el caso de las inmunoglobulinas de isotipo M o las proteínas G del virus de la estomatitis vesicular.

Según una forma de realización preferida adicional el virus puede contener además sitios adecuados donantes de ajuste o aceptores de ajuste, de modo que se forma el correspondiente ARN con ajuste que es adecuado para la traducción dentro el individuo tratado. El ácido nucleico puede contener además una secuencia que sea adecuada como sitio de unión a ribosomas.

Como vehículo farmacológicamente aceptable son adecuados todos los vehículos y diluyentes conocidos en el estado de la técnica. Siempre que se pretenda una vía de aplicación determinada, se puede elegir o cambiar el vehículo farmacológicamente aceptable de un modo conocido.

La vacuna se puede administrar por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, intraperitoneal u oral. La vacuna se da para profilaxis y/o terapia contra la malaria en seres humanos y animales.

Según una forma de realización preferida la vacuna puede contener además MSP-1 y/o un fragmento de la misma especificado en la reivindicación 1 o bien una combinación de fragmentos de la misma especificada en la reivindicación 1. Especialmente preferida es la proteína MSP-1 producida de forma recombinante, en especial recombinante en *E. coli*. El ácido nucleico que codifica MSP-1 es preferiblemente tal que su contenido relativo de AT está disminuido. Especialmente preferido es tal ácido nucleico como se describe en DE-19640817 A1, en el que en especial los codones de *Plasmodium falciparum* se cambian por codones humanos, sin que por ello cambie la secuencia de aminoácidos.

Siempre que la vacuna comprenda tanto el virus recombinante como la MSP-1 o un fragmento de la misma, la vacuna puede estar en forma de kit. De esta manera es adecuada para la administración simultánea, secuencial o separada de ambos componentes de la vacuna.

Los ejemplos siguientes deben ilustrar la invención.

Figura 1

Estructura primaria de MSP-1 de las cepas de *P. falciparum* FCB-1 y MAD20

Las flechas por encima de la secuencia señalan los sitios de procesamiento de la proteína nativa (Holder *et al.*, 1987), que corta MSP-1 en los fragmentos p83, p30, p38 y p42, que se anclan como complejo en la superficie del

ES 2 339 765 T3

parásito. En el segundo paso del procesamiento p42 se divide en p33 y p19. Las flechas debajo de las representaciones señalan los sitios únicos de corte de endonucleasas de restricción de la secuencia de ADN sintético.

Abreviaturas: PS = péptido señal, AG = anclaje por GPI

5

Figura 2

Expresión de msp1d-38/42 en células HeLa infectadas con MVA recombinante

10 Se infectaron células HeLa con rMVA-msp1d/38+42S o rMVA-msp1d/38+42A y a continuación se fijaron. La segunda y cuarta filas muestran respectivamente células que después de la fijación se permeabilizaron con Triton X-100, mientras que la membrana de las células en las filas uno y tres se mantuvieron intactas. Las células así tratadas se incubaron con mAc 5.2, que reconoce un epítipo conformacional específico de MSP-1 en la región C-terminal del fragmento p19 de MSP-1 y un suero policlonal, que reconoce la proteína del RE Sec61beta (marcador anti-RE),
15 como anticuerpo primario, éstas se marcaron por tinción mediante IgG anti-ratón conjugada con Cy3 (reconoce mAc 5.2) o IgG anti-conejo conjugada a FITC (reconoce anti-Sec61beta) y a continuación se analizaron en el microscopio confocal. Cuando las células se infectaron con rMVA-msp1d/38+42S o rMVA-msp1d/38+42A y se permeabilizaron, la señal para MSP-1D-38/42 (mAc 5.2) puede colocalizar con el marcador de RE. Cuando por el contrario las células permanecieron intactas, MSP-1D-38/42 se reconoce sólo en el caso de infección con rMVA-msp1d/38+42A en la
20 superficie de las células infectadas. El marcador de RE actúa aquí como control para la integridad de la membrana celular.

Abreviaturas: RE = retículo endoplásmico; mAc = anticuerpo monoclonal.

25 Figura 3

Detección de MSP-1D-42 y MSP-1D-38/42 en células HeLa infectadas con MVA recombinante por medio de inmunotransferencia

30 A Se infectaron células HeLa con rMVA-msp1d/42S, rMVA-msp1d/42A, rMVA-msp1d/38+42S o rMVA-msp1d/38+42A y se incubaron durante la noche. Se separaron muestras del sobrenadante y la fracción celular mediante electroforesis en gel de SDS en condiciones no reductoras, se transfirieron a una membrana de PVDF y se probaron con mAc 5.2 como primer anticuerpo. Solo se pudieron detectar las quimeras de la secuencia señal de DAF y el fragmento correspondiente de MSP-1D en los sobrenadantes de las células infectadas, mientras que la expresión intracelular dio una señal en todas las células infectadas con MVA recombinante.
35

Figura 4

Desarrollo de la respuesta inmune humoral después de tres inmunizaciones con rMVA-msp1d/42S o rMVA-msp1d/42A y una inmunización con MSP-1D-HX42 de E. coli

40 En A se muestra el análisis de la respuesta inmune humoral mediante ELISA con MSP-1D-HX42 producida de forma recombinante y purificada de *E. coli* como antígeno. Las curvas muestran el desarrollo de anticuerpos específicos de p42, medidos a la $DO_{405} = 1$. Los ratones se inmunizaron respectivamente en un intervalo de tres semanas con 10^6 UI (primera inmunización, al mismo tiempo que la extracción de sangre S0) ó 10^8 UI (1^a y 2^a dosis de recuerdo, al mismo tiempo que S1 y S2) de rMVA-msp1d/42S. Además los ratones se inyectaron por vía subcutánea después de cuatro semanas más cada uno con $5 \mu\text{g}$ de MSP-1D-HX42 de *E. coli* en adyuvante incompleto de Freund (una semana después de la extracción de sangre S3). S0 a S5 muestran los tiempos de la extracción de sangre, en donde se extrajo sangre de S0 a S3 a intervalos de tres semanas respectivamente, la extracción de S4 y S5 tuvo lugar respectivamente a intervalos de cuatro semanas. Las flechas marcan los tiempos de las inmunizaciones. La estrella marca la cuarta
50 inmunización con de MSP-1D-HX42 de *E. coli*.

B muestra el mismo análisis para la inmunización con rMVA-msp1d/42A.

55 Figura 5

Desarrollo de la respuesta inmune humoral después de inmunizaciones con rMVA-msp1d/S o rMVA-msp1d/83+30/38+42A en combinación con una inmunización con MSP-1D de E. coli

60 Se determinó la respuesta inmune humoral por medio de un ELISA con el uso de MSP-1D producida de forma recombinante purificada de *E. coli* como antígeno. Como en la figura 4, las curvas muestran el desarrollo de anticuerpos específicos de p42, medidos a la $DO_{405} = 1$. Los ratones se inmunizaron respectivamente en un intervalo de tres semanas (en la figura señalados mediante flechas). Las estrategias de inmunización de los grupos adjuntos están compuestas como sigue:

65

Grupo 1: $20 \mu\text{g}$ de MSP-1D (día 0), 10^8 UI de rMVA-msp1d/S (día 21), 5 ratones

Grupo 2: $20 \mu\text{g}$ de MSP-1D (día 0), 10^8 UI de rMVA-msp1d/A (día 21), 5 ratones

ES 2 339 765 T3

Grupo 3: 20 µg de MSP-1D (día 0), 10⁸ UI de rMVA-msp1d/S (día 21), 20 µg de MSP-1D (día 42), 10 ratones

Grupo 4: 20 µg de MSP-1D (día 0), 10⁸ UI de rMVA-msp1d/S (día 21), 10⁸ de UI rMVA-msp1d/S (día 42), 10 ratones

Grupo 5: 20 µg de MSP-1D (día 0), 10⁸ UI de rMVA-msp1d/83+30/38+42A (día 21), 20 µg de MSP-1D (día 42), 9 ratones

Grupo 6: 20 µg de MSP-1D (día 0), 10⁸ UI de rMVA-msp1d/83+30/38+42A (día 21), 10⁸ UI de rMVA-msp1d/83+30/38+42A (día 42), 10 ratones

Grupo 7: 20 µg de MSP-1D (día 0), 10⁸ UI de rMVA-msp1d/A (día 21), 20 µg de MSP-1D (día 42), 5 ratones.

A continuación los virus recombinantes que llevan a la producción de MSP-1 en forma anclada en su superficie se señalan con una "A" y aquellos para la secreción de MSP-1 con una "S".

TABLA 1

Lista completa de las construcciones víricas producidas en el marco de la invención

	rMVA-msp1d	rMVA-msp1f
MSP-1 secretada	rMVA-msp1d/S rMVA-msp1d/83S rMVA-msp1d/83+30S rMVA-msp1d/42S rMVA-msp1d/38+42S	
MSP-1 anclada en la superficie	rMVA-msp1d/A rMVA-msp1d/83A rMVA-msp1d/83+30A rMVA-msp1d/42A rMVA-msp1d/38+42A rMVA-msp1d/83+30/38+42A	rMVA-msp1f/A rMVA-msp1f/83+30/38+42A rMVA-msp1f/38+42A

La producción de MSP-1 o los fragmentos y la localización de las proteínas en las células infectadas se detectó por medio de microscopía confocal y se muestra ejemplarmente para la infección de células HeLa con rMVA-msp1d/38+42S y rMVA-msp1d/38+42A (Fig. 2).

La secreción de todas las variantes de MSP-1 de células infectadas con MVA recombinante se detectó mediante análisis de inmunotransferencia de sobrenadantes celulares y aquí se muestra ejemplarmente para rMVA-msp1d/42S y rMVA-msp1d/38+42S (Fig. 3).

Posteriormente se investigaron los MVA recombinantes en ensayos de inmunización en ratones para su efecto inmunógeno en relación a la respuesta inmune humoral. Para ello se determinaron títulos altos de anticuerpos contra la proteína del parásito inducidos para msp-1 recombinante de MVA mediante ELISA. El título del anticuerpo específico para p42 y el diferente potencial de inmunización observado mediante proteínas ancladas a la superficie producidas por MVA recombinante o secretadas se muestra ejemplarmente para la inmunización con rMVA-msp1d/42S y rMVA-msp1d/42A (Fig. 4).

Bibliografía

Aidoo, M., Lalvani, A., Whittle, H. C., Hill, A. V. y Robson, K. J. (1997). Recombinant vaccinia viruses for the characterization of *Plasmodium falciparum*-specific cytotoxic T lymphocytes: recognition of processed antigen despite limited re-stimulation efficacy. *Int Immunol* 9, 731-7.

Allsopp, C. E., Plebanski, M., Gilbert, S., Sinden, R. E., Harris, S., Frankel, G., Dougan, G., Hioe, C., Nixon, D., Paoletti, E., Layton, G. y Hill, A. V. (1996). Comparison of numerous delivery systems for the induction of cytotoxic T lymphocytes by immunization. *Eur J Immunol* 26, 1951-9.

Antoine, G., Scheiflinger, F., Dourer, F y Falkner, F. G. (1998). The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: Comparison with other Orthopoxviruses. *Virology* 244, 365-396.

5 **Chang, S. P., Case, S. E., Gosnell, W. L., Hashimoto, A., Kramer, K. J., Tam, L. Q., Hashiro, C. Q., Nikaido, C. M., Gibson, H. L., Lee-Ng, C. T., Barr, P. J., Yokota, B. T. y Hut, G. S. (1996).** A recombinant baculovirus 42-kilodalton C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 protects Aotus monkeys against malaria. *Infect Immun* 64, 253-61.

10 **Daly, T. M. y Long, C. A. (1993).** A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii* yoelii 17XL merozoite surface protein 1 induces a protective immune response in mice. *Infect. Immun.* 61, 2462-7.

15 **Degano, P., Schneider, J., Hannan, C. M., Gilbert, S. C. y Hill, A. V. (1999).** Gene gun intradermal DNA immunization followed by boosting with modified *Vaccinia* virus Ankara: enhanced CD8+ T cell immunogenicity and protective efficacy in the influenza and malaria models. *Vaccine* 18, 623-32.

Egan, A. F., Blackman, M. J. y Kaslow, D. C. (2000). Vaccine efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in malaria-naive, -exposed, and/or -rechallenged *Aotus vociferans* monkeys. *Infect Immun* 68, 1418-27.

20 **Etlinger, H. M. y Altenburger, W. (1991).** Overcoming inhibition of antibody responses to a malaria recombinant vaccinia virus caused by prior exposure to wild type virus. *Vaccine* 9, 470-2.

25 **Genton, B., Al-Yaman, F., Anders, R., Saul, A., Brown, G., Pye, D., Irving, D. O., Briggs, W. R., Mai, A., Ginny, M., Adiguma, T., Rare, L., Giddy, A., Reber-Liske, R., Stuerchler, D. y Alpers, M. P. (2000).** Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine in adults living in an endemic area of Papua New Guinea. *Vaccine* 18, 2504-11.

30 **Gilbert, S. C., Schneider, J., Plebanski, M., Hannan, C. M., Blanchard, T. J., Smith, G. L y Hill, A. V. (1999).** Ty virus-like particles, DNA vaccines and Modified Vaccinia Virus Ankara; comparisons and combinations. *Biol Chem* 380, 299-303.

35 **Hirunpetcharat, C., Tian, J. H., Kaslow, D. C., van Rooijen, N., Kumar, S., Berzofsky, J. A., Miller, L. H. y Good, M. F. (1997).** Complete protective immunity induced in mice by immunization with the 19-kilodalton carboxyl-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 (MSP1[19]) of *Plasmodium yoelii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*: correlation of protection with antigen-specific antibody titer, but not with effector CD4+ T cells. *J Immunol* 159, 3400-11.

40 **Holder, A. A. y Freeman, R. R. (1981).** Immunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens. *Nature*. 294, 361-364.

Holder, A. A., Sandhu, J. S., Hillman, Y., Davey, L. S., Nicholls, S. C., Cooper, H. y Lockyer, M. J. (1987). Processing of the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 94, 199-208.

45 **Kaslow, D. C., Isaacs, S. N., Quakyi, I. A., Gwadz, R. W., Moss, B. y Keister, D. B. (1991).** Induction of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies by recombinant vaccinia virus. *Science* 252, 1310-1313.

50 **Keitel, W. A., Kester, K. E., Atmar, R. L., White, A. C., Bond, N. H., Holland, C. A., Krzych, U., Palmer, D. R., Egan, A., Diggs, C., Ballou, W. R., Hall, B. F. y Kaslow, D. (1999).** Phase I trial of two recombinant vaccines containing the 19kd carboxy terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (msp-1(19)) and T helper epitopes of tetanus toxoid. *Vaccine* 18, 531-9.

55 **Kumar, S., Yadava, A., Keister, D. B., Tian, J. H., Ohl, M., Perdue-Greenfield, K. A., Miller, L. H. y Kaslow, D. C. (1995).** Immunogenicity and *in vivo* efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in Aotus monkeys. *Mol Med* 1, 325-32.

Ling, I. T., Ogun, S. A. y Holder, A. A. (1994). Immunization against malaria with a recombinant protein. *Parasite Immunol* 96, 63-7.

60 **Majarian, W. R., Daly, T. M., Weidanz, W. P. y Long, C. A. (1984).** Passive immunization against murine malaria with an IgG3 monoclonal antibody. *J. Immunol.* 132, 3131-3137.

65 **Matsumoto, S., Yukitake, H., Kanbara, H. y Yamada, T. (1999).** Long-lasting protective immunity against rodent malaria parasite infection at the blood stage by recombinant BCG secreting merozoite surface protein-1. *Vaccine* 18, 832-4.

Meyer, H., Sutter, G. y Mayr, A. (1991). Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J Gen Virol* 72, 1031-8.

ES 2 339 765 T3

Moran, P. y Caras, I. W. (1994). Requirements for glycosylphosphatidylinositol attachment are similar but not identical in mammalian cells and parasitic protozoa. *J Cell Biol* 125, 333-43.

5 **Moss, B., Carroll, M. W., Wyatt, L. S., Bennink, J. R., Hirsch, V. M., Goldstein, S., Elkins, W. R., Fuerst, T. R., Lifson, J. D., Piatak, M., Restifo, N. P., Overwijk, W., Chamberlain, R., Rosenberg, S. A. y Sutter, G. (1996).** Host range restricted, non-replicating vaccinia virus vectors as vaccine candidates. *Adv Exp Med Biol* 397, 7-13.

10 **Ockenhouse, C. F., Sun, P. F., Lanar, D. E., Wellde, B. T., Hall, B. T., Kester, K., Stoute, J. A., Magill, A., Krzych, U., Farley, L., Wirtz, R. A., Sadoff, J. C., Kaslow, D. C., Kumar, S., Church, L. W., Crutcher, J. M., Wizel, B., Hoffman, S., Lalvani, A., Hill, A. V., Tine, J. A., Guito, K. P., de Taisne, C., Anders, R., Ballou, W. R. et al. (1998).** Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 177, 1664-73.

15 **Perrin, L. H., Merkli, B., Loche, M., Chizzolini, C., Smart, J. y Richle, R. (1984).** Antimalarial immunity in *Saimiri* monkeys. Immunization with surface components of asexual blood stages. *J. Exp. Med.* 160, 441-451.

20 **Plebanski, M., Gilbert, S. C., Schneider, J., Hannan, C. M., Layton, G., Blanchard, T., Becker, M., Smith, G., Butcher, G., Sinden, R. E. y Hill, A. V. (1998).** Protection from *Plasmodium berghei* infection by priming and boosting T cells to a single class I-restricted epitope with recombinant carriers suitable for human use. *Eur J Immunol* 28, 4345-55.

25 **Pye, D., Edwards, S. J., Anders, R. F., O'Brien, C. M., Franchina, P., Corcoran, L. N., Monger, C., Peterson, M. G., vVandenberg, K. L., Smythe, J. A., Westley, S. R., Coppel, R. L., vWebster, T. L., Kemp, D. J., Hampson, A. W. y Langford, C. J. (1991).** Failure of recombinant vaccinia viruses expressing *Plasmodium falciparum* antigens to protect *Saimiri* monkeys against malaria. *Infect. Immun.* 59, 2403-2411.

30 **Riley, E. M., Allen, S. J., Wheeler, J. G., Blackman, M. J., Bennett, S., Takacs, B., Schonfeld, H. J., Holder, A. A. y Greenwood, B. M. (1992).** Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol.* 14, 321-337.

35 **Riley, E. M., Morris-Jones, S., Blackman, M. J., Greenwood, B. M. y Holder, A. A. (1993).** A longitudinal study of naturally acquired cellular and humoral immune responses to a merozoite surface protein (MSP1) of *Plasmodium falciparum* in an area of seasonal malaria transmission. *Parasite Immunol.* 15, 513-524.

40 **Saul, A., Lawrence, G., Smillie, A., Rzepczyk, C. M., Reed, C., Taylor, D., Anderson, K., Stowers, A., Kemp, R., Allworth, A., Anders, R. F., Brown, G. V., Pye, D., Schoofs, P., Irving, D. O., Dyer, S. L., Woodrow, G. C., Briggs, W. R., Reber, R. y Sturchler, D. (1999).** Human phase I vaccine trials of 3 recombinant asexual stage malaria antigens with Montanide ISA720 adjuvant. *Vaccine* 17, 3145-59.

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

50 **Siddiqui, W. A., Tam, L. Q., Kramer, K. J., Hui, G. S., Case, S. E., Yamaga, K. M., Chang, S. P., Chan, E. B. y Kan, S. C. (1987).** Merozoite surface coat precursor protein completely protects *Aotus* monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3014-3018.

55 **Staib, C., Drexler, I., Ohlmann, M., Wintersperger, S., Erfle, V. y Sutter, G. (2000).** Transient host range selection for genetic engineering of modified vaccinia virus Ankara. *Biotechniques* 28, 1137-42, 1144-6, 1148.

60 **Stickl, H., Hochstein-Mintzel, V., Mayr, A., Huber, H. C., Schafer, H. y Holzner, A. (1974).** [MVA vaccination against smallpox: clinical tests with an attenuated live vaccinia virus strain (MVA) (traducción de los autores)]. *Dtsch Med Wochenschr* 99, 2386-92.

65 **Stowers, A. W., Cioce, V., Shimp, R. L., Lawson, M., Hui, G., Muratova, O., Kaslow, D. C., Robinson, R., Long, C. A. y Miller, L. H. (2001).** Efficacy of two alternate vaccines based on *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in an *Aotus* challenge trial. *Infect Immun* 69, 1536-46.

70 **Sutter, G. y Moss, B. (1992).** Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 10847-51.

75 **Tanabe, K., Mackay, M., Goman, M. y Scaife, J. G. (1987).** Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.* 195, 273-287.

80 **Tartaglia, J., Perkus, M. E., Taylor, J., Norton, E. K., Audonnet, J. C., Cox, W. I., Davis, S. W., van der Hoeven, J., Meignier, B., Riviere, M., et al. (1992).** NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* 188, 217-32.

ES 2 339 765 T3

Tian, J. H., Miller, L. H., Kaslow, D. C., Ahlers, J., Good, M. F., Ailing, D. W., Berzofsky, J. A. y Kumar, S. (1996). Genetic regulation of protective immune response in congenic strains of mice vaccinated with a subunit malaria vaccine. *J Immunol* 157, 1176-83.

5 **Tine, J. A., Lanar, D. E., Smith, D. M., Welde, B. T., Schultheiss, P., Ware, L. A., Kauffman, E. B., Wirtz, R. A., De Taisne, C., Hui, G. S., Chang, S. P., Church, P., Hollingdale, M. R., Kaslow, D. C., Hoffman, S., Guito, K. P., Ballou, W. R., Sadoff, J. C. y Paoletti, E. (1996).** NYVAC-Pf7: a poxvirus-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 64, 3833-44.

10 **Tolle, R., Fruh, K., Doumbo, O., Koita, O., N'Diaye, M., Fischer, A., Dietz, K. y Bujard, H. (1993).** A prospective study of the association between the human humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stage antigen gp190 and control of malarial infections. *Infect Immun* 61, 40-7.

15 von **Heijne, G. (1985).** Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* 184, 99-105.

Wunderlich, G., Moura, I. C. y del Portillo, H. A. (2000). Genetic immunization of BALB/c mice with a plasmid bearing the gene coding for a hybrid merozoite surface protein 1-hepatitis B virus surface protein fusion protects mice against lethal *Plasmodium chabaudi chabaudi* PC1 infection. *Infect Immun* 68, 5839-45.

20 **Yang, S., Carroll, M. W., Torres-Duarte, A. P., Moss, B. y Davidson, E. A. (1997).** Addition of the MSA1 signal and anchor sequences to the malaria merozoite surface antigen 1 C-terminal region enhances immunogenicity when expressed by recombinant vaccinia virus. *Vaccine* 15, 1303-13.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Vacuna que comprende

5 a) un virus MVA recombinante, que comprende un fragmento o fragmentos del ácido nucleico que codifica la proteína MSP-1 de *Plasmodium falciparum*; y

b) un vehículo farmacológicamente aceptable,

10 en donde el fragmento de MSP-1 o los fragmentos de MSP-1 codificado(s) por el ácido nucleico se elige(n) exclusivamente de:

• p42;

15 • p42 y p38;

• p83, p30, p42 y p38.

20 2. Vacuna según la reivindicación 1, **caracterizada** en que la proteína MSP-1 es la proteína MSP-1 del aislado 3D7 o la proteína MSP-1 de la cepa FCB1.

3. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizada** en que el ácido nucleico que codifica MSP-1 tiene un contenido en AT reducido comparado con la secuencia salvaje.

25 4. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** en que el ácido nucleico está bajo el control de un promotor.

5. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** en que el ácido nucleico está fusionado en el extremo 5' con una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de un péptido señal.

30 6. Vacuna según la reivindicación 5, **caracterizada** en que la secuencia del péptido señal dirige la secreción del producto génico.

35 7. Vacuna según la reivindicación 5, **caracterizada** en que la secuencia del péptido señal dirige la localización estable a la membrana del producto génico.

8. Vacuna según la reivindicación 5, **caracterizada** en que la secuencia señal dirige el anclaje por GPI del producto génico.

40 9. Vacuna según la reivindicación 8, **caracterizada** en que la vacuna contiene además como componente c) MSP-1 y/o un fragmento de la misma especificado en la reivindicación 1 o una combinación de fragmentos de la misma especificados en la reivindicación 1.

45 10. Vacuna según la reivindicación 9, **caracterizada** en que los componentes a) y c) se pueden administrar de forma simultánea, secuencial o por separado.

11. Uso de la vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la producción de un medicamento para la profilaxis o terapia de la malaria.

50 12. Uso de la vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y de MSP-1 y/o un fragmento de la misma especificado en la reivindicación 1 o una combinación de fragmentos de la misma especificados en la reivindicación 1 para la producción de un medicamento para la profilaxis o terapia de la malaria.

55

60

65

Fig. 1

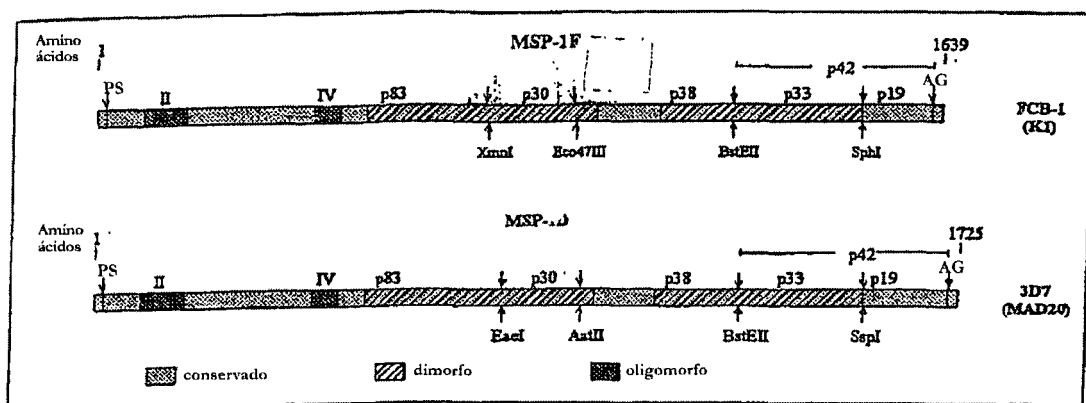


Fig. 2

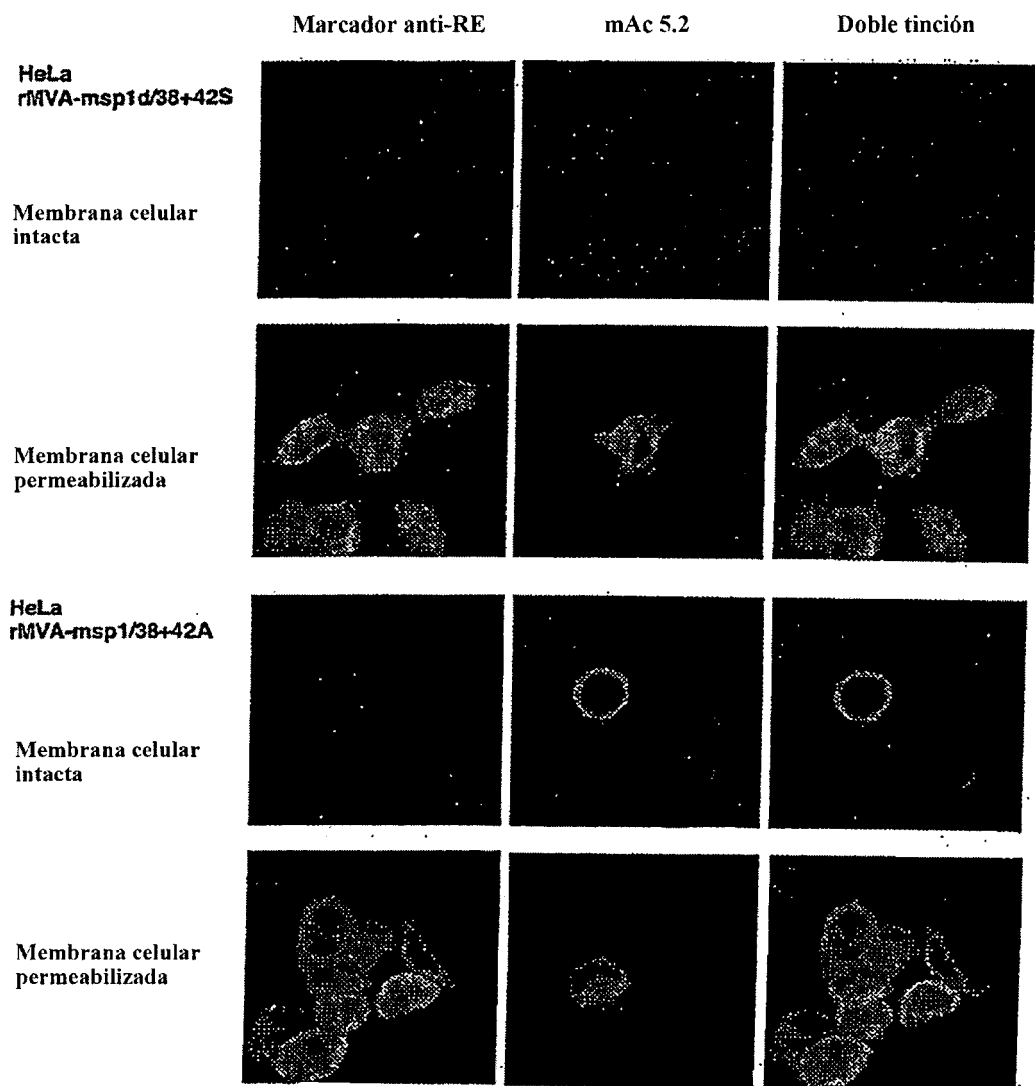


Fig. 3

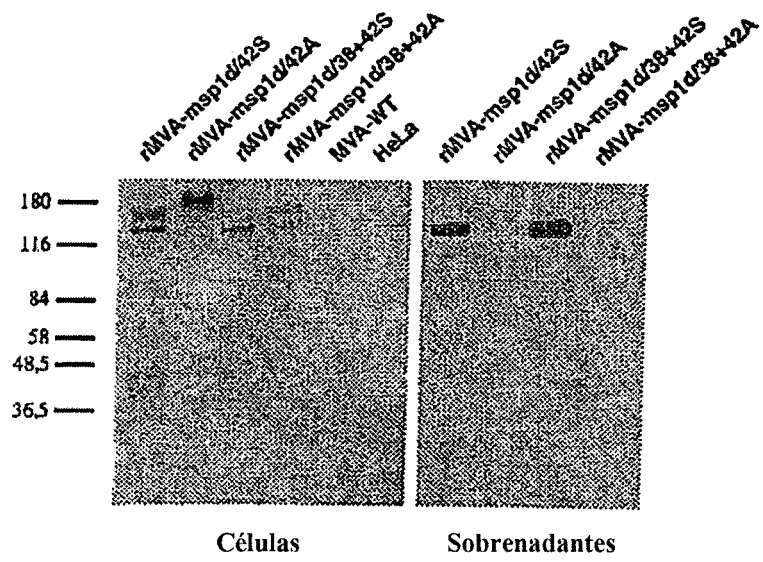
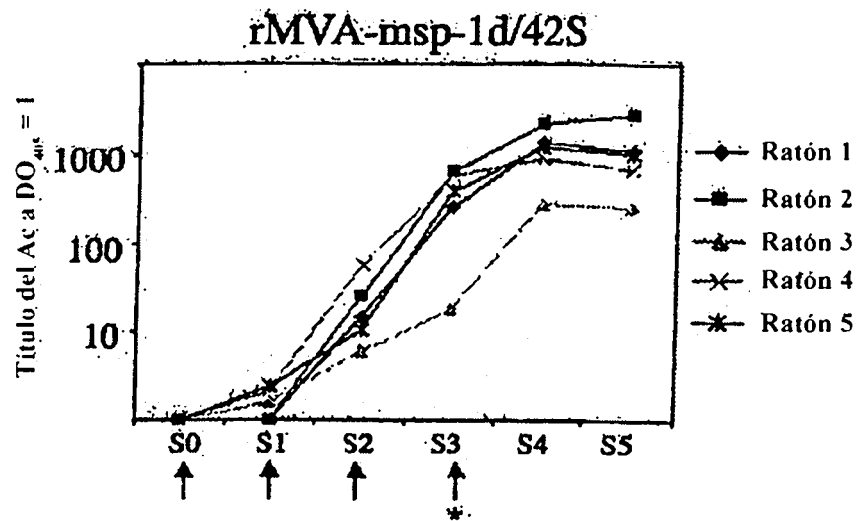


Fig. 4

A:



B

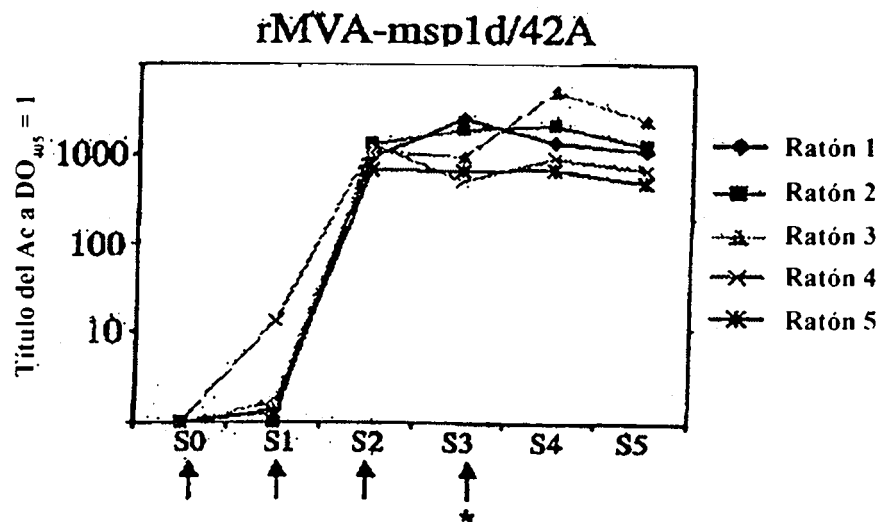


Fig. 5

