



**Industria y Comercio**  
**SUPERINTENDENCIA**

**PCT**  
SOLICITUD

**PATENTE DE INVENCION**

21. EXPEDIENTE No.

07-47232

**54. TITULO** **"VACUNAS DE CEBADO/REFUERZO CONTRA EL  
PALUDISMO"**

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K 39/015

71. SOLICITANTE **CRUCCELL HOLLAND B.V.; GLAXOSMITHKLINE  
BIOLOGICALS. S.A. v THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES,  
as represented by the SECRETARY OF THE ARMY, on behalf of the  
WALTER REED ARMY INSTITUTE OF RESEARCH.**

DOMICILIO LEIDEN, HOLANDA; RIXENSART, BÉLGICA Y  
SPRING, ESTADO DE MADISON, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**  
T.P. 53.215

22. BOGOTA, D.C. 11 MAY 2007

(FORMA P 10)

SS

FM 14-05-2007  
Cecilia, Pichler  
Alicia Solicitante

# PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-047232-00000-0000

Fecha: 2007-05-11 15:52:14  
Tra. 11 PATENTEIYII  
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONES  
Eve: 379 FASENACIONALI  
Folios: 171

## FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

|                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                    |                                                                                                                                                                                                                                        |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <b>1</b> SOLICITUD DE:<br><input checked="" type="checkbox"/> Patente de Invención<br><input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                    |                                                                                                                                                                                                                                        |  |
| <input type="checkbox"/> Capítulo I.<br><input checked="" type="checkbox"/> Capítulo II.                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                    |                                                                                                                                                                                                                                        |  |
| <b>2</b> SOLICITANTE<br>(71)                                                                                                                                                      | <b>Nombre:</b> CRUCELL HOLLAND B.V.; GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS, S.A. y THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES, as represented by the SECRETARY OF THE ARMY, on behalf of the WALTER REED ARMY INSTITUTE OF RESEARCH.<br><br><b>Dirección:</b> Archimedesweg 4, NL-2333 CN Leiden; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart y 503 Robert Grant Avenue, Silver Spring, MD 20910-7500.<br><br><b>Nacionalidad o Domicilio:</b> Leiden, Holanda; Rixensart, Bélgica y Spring, Estado de Madison, Estados Unidos de América.<br><br><b>Lugar de Constitución:</b> Bélgica.<br><br><b>Teléfono:</b> 3264270 <b>Fax:</b> 6069701<br><br><b>E-mail:</b> jlcco@lloredacamacho.com |                                    | <b>IDENTIFICACION</b><br><br><b>C.C.</b> <input type="checkbox"/> <b>NIT</b> <input type="checkbox"/><br><b>C.E.</b> <input type="checkbox"/> <b>Otro</b> <input type="checkbox"/><br><br><b>Cual</b> _____<br><br><b>Número</b> _____ |  |
| <b>3</b> REPRESENTANTE O APODERADO                                                                                                                                                | <b>Nombre:</b> ALICIA LLOREDICA RICAURTE<br><br><b>Dirección:</b> Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia<br><br><b>Teléfono:</b> 3264270 <b>Fax:</b> 6069701<br><br><b>E-mail:</b> jlcco@lloredacamacho.com                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                    | <b>C.C.</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>NIT</b> <input type="checkbox"/><br><b>C.E.</b> <input type="checkbox"/> <b>Otro</b> <input type="checkbox"/><br><br><b>Cual</b> _____<br><br><b>Número</b> 39.690.713 TP 53.215    |  |
| <b>4</b> INVENTOR(ES)<br>(72)                                                                                                                                                     | <b>Nombre:</b> PAU, Maria Grazia; GOUDSMIT, Jaap; COHEN, Joseph, D.; DUBOIS, Patrice, M.; STEWART, V. Ann y HEPPNER, Donald.<br><br><b>Dirección:</b> Bargelaan 80, NL-2333 CW Leiden; Koninginneweg 4, NL-1075 CX Amsterdam; GlaxoSmithKline, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart y 503 Robert Grant Avenue, Silver Spring, MD 20910-7500.<br><br><b>Nacionalidad o Domicilio:</b> Holanda, Bélgica y Estados Unidos de América.                                                                                                                                                                                                                                  |                                    |                                                                                                                                                                                                                                        |  |
| <b>5</b> PCT (86)<br><b>Solicitud Internacional No.</b> PCT/EP2005/055209 <b>Fecha:</b> 13/10/05<br><b>Publicación Internacional No.</b> WO 2006/040334 A1 <b>Fecha:</b> 20/04/06 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                    |                                                                                                                                                                                                                                        |  |
| <b>6</b> Título (54) VACUNAS DE CEBADO/ REFUERZO CONTRA EL PALUDISMO                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                    |                                                                                                                                                                                                                                        |  |
| <b>7</b> Clasificación Internacional (51) A61K 39/015                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                    |                                                                                                                                                                                                                                        |  |
| <b>8</b> Prioridad<br>SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>                                                                                          | (33) País de Origen<br>US<br>EP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | (32) Fecha<br>14/10/04<br>14/10/04 | (31) Número de Solicitud<br>60/619,056<br>04105035.2                                                                                                                                                                                   |  |
| <b>9</b> Comprobante de Pago No. 07-29.997 <b>Fecha:</b> Abril 16 de 2007                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                    |                                                                                                                                                                                                                                        |  |

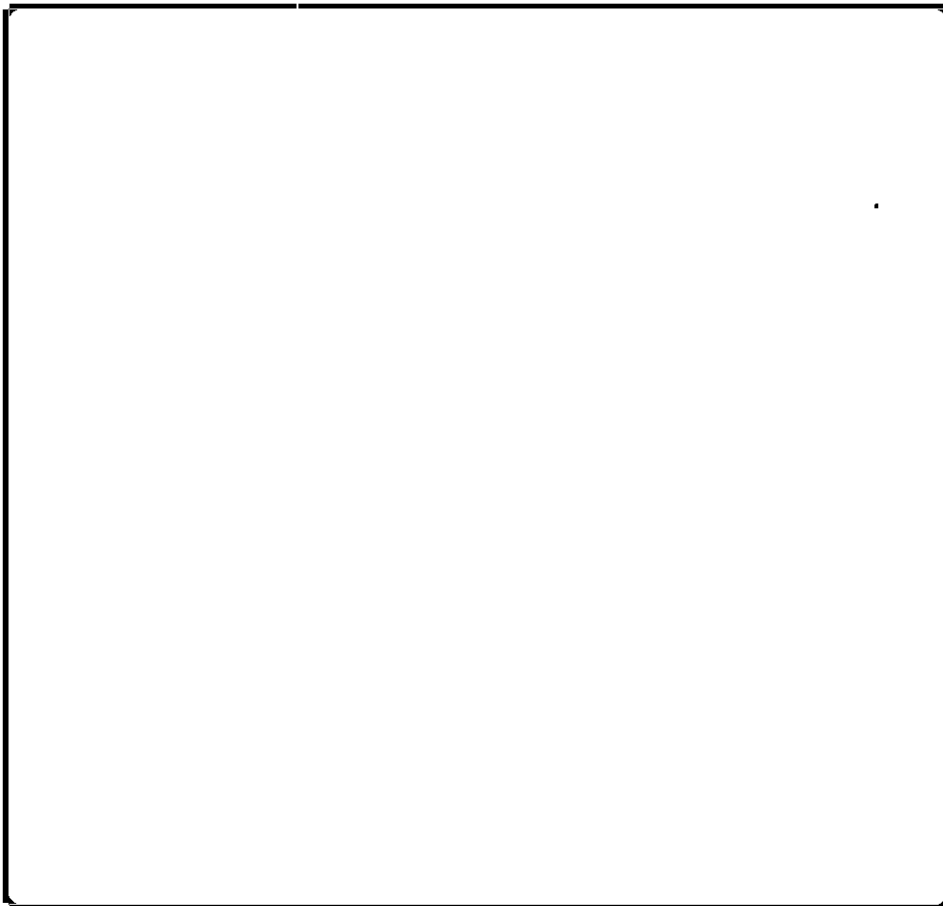
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal (Poder GlaxoSmithKline Biologicals S.A.).
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (resumen, descripción, reivindicaciones y dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción, Notificación Registro de un cambio con su traducción, Capítulo Reivindicatorio como fue originalmente presentado en Fase Internacional con su traducción, Anexo Explicativo de Modificaciones a las Reivindicaciones y listado de secuencias con su traducción.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén

T.P. 53.215

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-047232- -00000-0000

Fecha: 2007-05-11 15:52:14 Dep. 2020 NUECREACIONES  
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 379 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 171

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 29,997  
FECHA : ABRIL 16 DE 2007

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE         | TIPO PAGO    | BANCO         | CUENTA      | No. PAGO | FECHA PGO  | Vr. PAGO     |
|---------------------|--------------|---------------|-------------|----------|------------|--------------|
| LLORED A Y CIA S. A | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | 050-00110-6 | 64016208 | 16/04/2007 | 2,698,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO              | CONCEPTO                            | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------------------|-------------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 482,000.00     |
|       |                         | TOTAL :                             | \$ 482,000.00  |

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

2

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se esta presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.

  
ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

*[Handwritten mark]*

4

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 2004-09-09-466  
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO  
PRESENTADO EN INGLES

---

**PODER**

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Certificado Notarial (Sociedad) documento también escrito en inglés y en español.

Notarización, documento escrito en español.

**APOSTILLA**

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

**Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte**

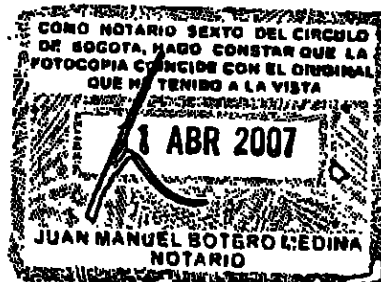
1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte  
Este documento público
2. ha sido firmado James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

**CERTIFICADO**

5. en Londres
6. el 01 de septiembre de 2004
7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
8. Número: **G 749037**
9. Sello/Estampilla:
10. Firma: (ilegible)

TRADUCTOR OFICIAL  
RESOLUCION 2177

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



NO SE ASUME  
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

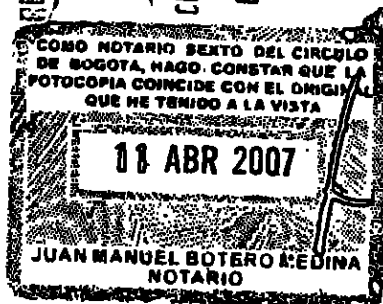
2004 SET 10 A 10:47

*ues*  
JEFE DE LEGALIZACIONES  
BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE  
RELACIONES EXTERIORES

260567

*Anita Escobar*  
CUYA FIRMA APARECE EN EL  
DOCUMENTO DESEMPEÑA  
LAS FUNCIONES INDICADAS



Sello de la Oficina de Asuntos  
Exteriores y del Commonwealth

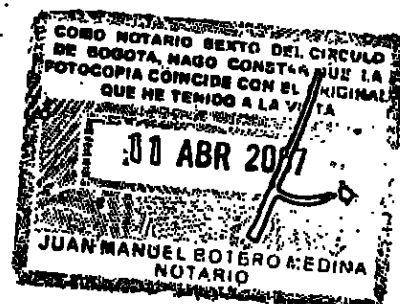
W. Glass  
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 9 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL  
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo  
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Yo, el infrascrito, **JAMES KERR MILLIGAN**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

**C E R T I F I C O:**

**QUE** es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad denominada **"GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A."** (anteriormente denominada **"Smithkline Beecham Biologicals s.a."**), Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Bélgica, con domicilio social en Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica;

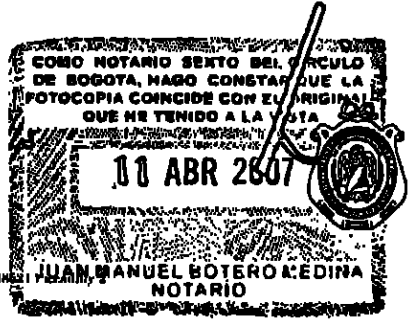
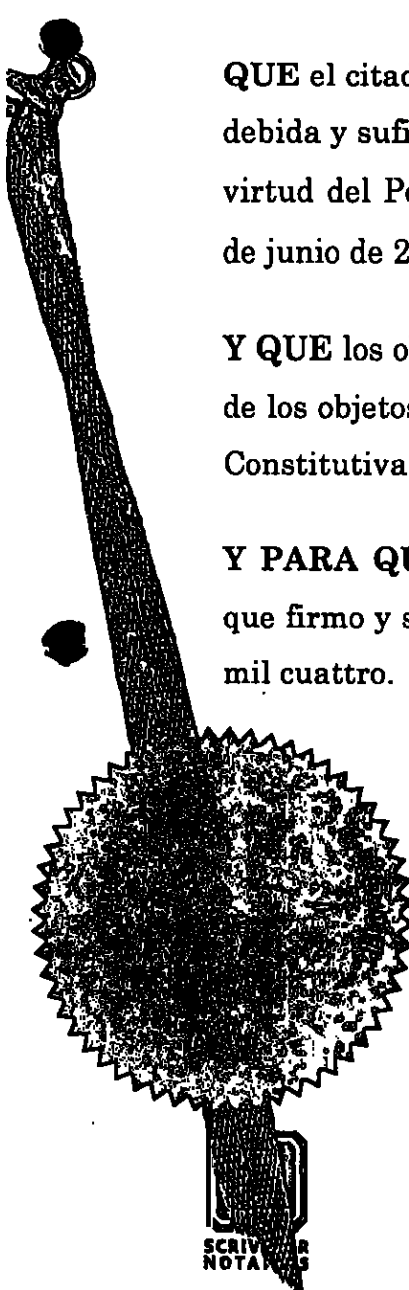
**QUE** el citado Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 12 de junio de 2002, cuyo original he tenido a la vista.

**Y QUE** los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

**Y PARA QUE CONSTE** y obre los efectos conducentes expido la presente que firmo y sello en Londres, el día de hoy primero de septiembre del año dos mil cuatro.

*[Handwritten signature]*

**JAMES KERR MILLIGAN**  
Notario Público de Londres, Inglaterra



7

APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961/Convention de La Haye du 5 octob

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland  
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document/Le présent acte public

2. has been signed by James Keef Milligan  
a été signé par .....  
3. acting in the capacity of Notary Public  
agissant en qualité de .....  
4. bears the seal/stamp of Notary Public  
est revêtu du sceau/timbre de .....

Certified/Attesté

5. at London/à Londres  
6. the/le .....  
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs/  
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **G 749037**

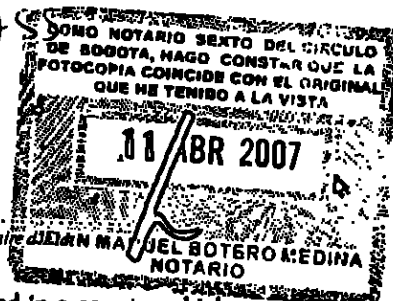
9. Stamp:  
timbre:



10. Signature: WGLAS

WGLAS

For the Secretary of State/ Pour le Secrétaire d'Etat



If this document is to be used in a country which is  
not party to the Hague Convention of 5 October 1961,  
it should be presented to the consular section of the  
mission representing that country.

A

Los abajo firmados, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica.

con domicilio en **rue de l'Institut 89,  
B-1330 Rixensart,  
Bélgica**

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y dé cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, a corporation organized and existing under the laws of Belgium.

domiciled at **rue de l'Institut 89,  
B-1330 Rixensart,  
Belgium**

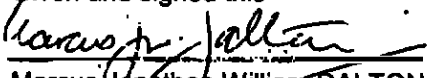
hereby appoint, **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims; recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

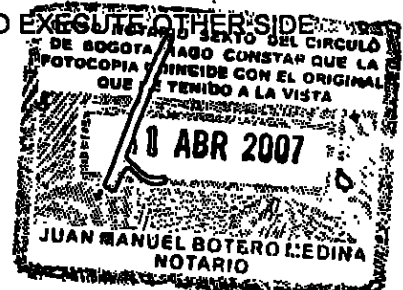
We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

31 AUG 2004

Given and signed this

  
**Marcus Jonathan William DALTON**  
Attorney and Authorised Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica

{ss

Hoy de de 200 , compareció , a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es de **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de **Bélgica**, domiciliada en la ciudad de **Rixensart, Bélgica**, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de

que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en , con fecha , y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Belgium

{ss

On this day of 200 , personally came

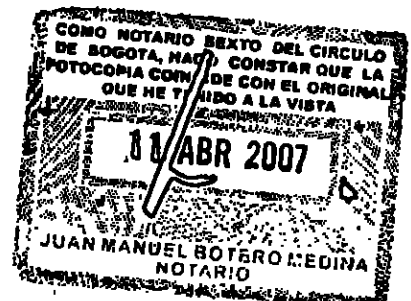
to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the

of **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the **Belgium**, domiciled at the City of **Rixensart, Belgium**, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of

, that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at

, under date of , and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.



|                                                                                                                                      |                    |                                                                                                                                                                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <br><b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA |                    | <b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br><b>DIVISION DE NUEVAS CREACIONES</b><br><b>EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN</b><br><b>SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT</b>                                              |           |
| (21) N° de solicitud:                                                                                                                |                    | (51) Int Cl: A61K 39/015                                                                                                                                                                                                 |           |
| 22) Fecha de solicitud: 11-05-07                                                                                                     |                    | (71) Solicitante(s) CRUCELL HOLLAND B.V.; GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS, S.A. y THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES, as represented by the SECRETARY OF THE ARMY, on behalf of the WALTER REED ARMY INSTITUTE OF RESEARCH. |           |
| (30) Prioridad                                                                                                                       | (31) No. Prioridad | 32) Fecha                                                                                                                                                                                                                | (33) País |
|                                                                                                                                      | 60/619,056         | 14-10-04                                                                                                                                                                                                                 | US        |
|                                                                                                                                      | 04105035.2         | 14-10-04                                                                                                                                                                                                                 | EP        |
|                                                                                                                                      |                    | (72) Inventor(es) PAU, Maria Grazia; GOUDSMIT, Jaap; COHEN, Joseph, D.; DUBOIS, Patrice, M.; STEWART, V. Ann y HEPPNER, Donald.                                                                                          |           |
|                                                                                                                                      |                    | (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE                                                                                                                                                                                  |           |
| (85) Fecha límite inicio fase nacional: 14-05-07                                                                                     |                    | (87) Publicación internacional                                                                                                                                                                                           |           |
| (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT                                                                           |                    | Fecha: 20-04-06                                                                                                                                                                                                          |           |
| Fecha de presentación de la solicitud: 13-10-05                                                                                      |                    | N° publicación: WO2006/040334 A1                                                                                                                                                                                         |           |
| No. de solicitud PCT/EP2005/055209                                                                                                   |                    |                                                                                                                                                                                                                          |           |
| (54) Título: VACUNAS DE CEBADO/ REFUERZO CONTRA EL PALUDISMO                                                                         |                    |                                                                                                                                                                                                                          |           |

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Un kit de partes que comprende:

- un adenovirus recombinante con replicación defectuosa en un excipiente farmacéuticamente aceptable, dicho adenovirus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de circumsporozoito (CS) a partir de un parásito que causa el paludismo, y
- un antígeno proteináceo coadyudado;

en donde dicho adenovirus recombinante se selecciona del grupo que consiste de adenovirus humano serotipo 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 y 50, y en donde dicho adenovirus recombinante con replicación defectuosa es una composición cebadora y dicho antígeno proteináceo coadyudado es una composición de refuerzo.

77

|                                                                                                                                                                                                                          |                    |                                                                                                                                                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|                                                                                                                                          |                    | <b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b>                                                                                                                                                          |           |
| <b>Industria y Comercio</b>                                                                                                                                                                                              |                    | <b>DIVISION DE NUEVAS CREACIONES</b>                                                                                                                                                                     |           |
| <b>TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS</b>                                                                                                                                                                                      |                    |                                                                                                                                                                                                          |           |
| <b>SUPERINTENDENCIA</b>                                                                                                                                                                                                  |                    | <b>PATENTE DE INVENCION</b> <input type="checkbox"/> <b>PCT</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>MODELO DE UTILIDAD</b> <input type="checkbox"/> <b>DISEÑO INDUSTRIAL</b> <input type="checkbox"/> |           |
| (21) N° de solicitud:                                                                                                                                                                                                    |                    | (22) Fecha de solicitud: 11-05-07                                                                                                                                                                        |           |
| (51) Clasificación Internacional : A61K 39/015                                                                                                                                                                           |                    |                                                                                                                                                                                                          |           |
| (71) Solicitante(s) CRUCELL HOLLAND B.V.; GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS, S.A. y THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES, as represented by the SECRETARY OF THE ARMY, on behalf of the WALTER REED ARMY INSTITUTE OF RESEARCH. |                    |                                                                                                                                                                                                          |           |
| (72) Inventor(es) PAU, Maria Grazia; GOUDSMIT, Jaap; COHEN, Joseph, D.; DUBOIS, Patrice, M.; STEWART, V. Ann y HEPPNER, Donald.                                                                                          |                    |                                                                                                                                                                                                          |           |
| (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE                                                                                                                                                                                  |                    |                                                                                                                                                                                                          |           |
| (30) Prioridad                                                                                                                                                                                                           | (31) No. Prioridad | (32) Fecha                                                                                                                                                                                               | (33) País |
|                                                                                                                                                                                                                          | 60/619,056         | 14.10.04                                                                                                                                                                                                 | US        |
|                                                                                                                                                                                                                          | 04105035.2         | 14.10.04                                                                                                                                                                                                 | EP        |
| (85) Fecha inicio fase nacional: 14-05-07                                                                                                                                                                                |                    | (87) Publicación internacional                                                                                                                                                                           |           |
| (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT                                                                                                                                                               |                    | Fecha: 20-04-06                                                                                                                                                                                          |           |
| Fecha de presentación de la solicitud: 13-10-05                                                                                                                                                                          |                    | N° publicación: WO2006/040334 A1                                                                                                                                                                         |           |
| No. de solicitud PCT/EP2005/055209                                                                                                                                                                                       |                    |                                                                                                                                                                                                          |           |
| (54) Título: VACUNAS DE CEBADO/ REFUERZO CONTRA EL PALUDISMO                                                                                                                                                             |                    |                                                                                                                                                                                                          |           |

+



**REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No.  
PCT/EP2005/055209

A. CLASIFICACION DE MATERIA  
A61K 39/015

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

**B. CAMPOS BUSCADOS**

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

A61K

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Interno, BIOSIS, PAJ, Dato WPI

**C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES**

| Categoría * | Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes                                                                                                                                                                                                           | Relevante a la reivindicación No. |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Y           | STOUTE J A ET AL: "Eficacia a largo plazo y respuestas inmunes tras la inmunización con la vacuna de la malaria RTS, S"<br>THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES. OCT 1998<br>vol. 178, no. 4, Octubre 1998 (1998-10),<br>páginas 1139-1144, XP008046110<br>ISSN: 0022-1899<br>documento completo | 1-31                              |

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

\* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'Z' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

13 de Marzo de 2006

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

24-03-2006

Nombre y dirección de correo de ISA/  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL-2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx, 31 651 epo nl,  
Fax: (+31 70) 340-3016

Funcionario autorizado

Hix, R.

*[Handwritten signature]*

**REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No.  
 PCT/EP2005/055209

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría * | Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Relevante a la reivindicación No. |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Y           | GARCON NATHALIE ET AL: "Desarrollo de RTS, S/AS02: Una vacuna candidata para la malaria, basada en una subunidad purificada, formulada con un novedoso adyuvante"<br>EXPERT REVIEW OF VACCINES ABR 2003, vol. 2, no. 2, Abril 2003 (2003-04), páginas 231-238, XP008046132<br>ISSN: 1476-0584<br>documento completo<br>----                                                                    | 1-31                              |
| Y           | SUN PEIFANG ET AL: "La inmunidad protectora inducida con la vacuna de la malaria RTS, S, se relaciona con células T CD4+ y CD8+ específicas a proteínas del circumporozoite de plasmodium falciparum, que producen IFN-gamma"<br>JOURNAL OF INMUNCLOGY, vol. 171, no. 12, 15 de diciembre de 2003 (2003-12-15), páginas 6961-6967, XP002325853<br>ISSN: 0022-1767<br>documento completo<br>--- | 1-31                              |
| Y           | STOUTE J A ET AL: "UNA EVALUACIÓN PRELIMINAR DE UNA VACUNA DE PROTEÍNA RECOMBINANTE DEL CIRCUMPOROZOITO CONTRA LA MALARIA POR PLASMODIUM FALCIPARUM"<br>NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, THE MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, WALTHAM, MA, US; vol. 336, no. 2, 9 de enero de 1997 (1997-01-09), páginas 86-91, XP000990284<br>ISSN: 0028-4793<br>documento completo<br>----                     | 1-31                              |
| Y           | DOHERTY J F ET AL: "Un ensayo fase I de seguridad e inmunogenicidad contra la vacuna candidata para la malaria RTS, S /SBAS2 en adultos semi-inmunes en Gambia"<br>AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, vol. 61, no. 6, Diciembre 1999 (1999-12), páginas 865-868, XP002325854<br>ISSN: 0002-9637<br>documento completo<br>----<br>---/----                                      | 1-31                              |

**REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No.  
PCT/EP2005/055209

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría * | Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Relevante a la reivindicación No. |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Y           | <p>KESTER KENT E ET AL: "Eficacia de los regimenes de vacuna con la proteína recombinante del circumsporozoite contra la malaria experimental por plasmodium falciparum"</p> <p>JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES,</p> <p>vol. 183, no. 4,</p> <p>15 de Febrero de 2001 (2001-02-15), páginas 640-647, XP002325855</p> <p>ISSN: 0022-1899</p> <p>documento completo</p>                                                                                 | 1-31                              |
| Y           | <p>SCHWENK ROBERT ET AL: "Opsonización mediante anticuerpos antígeno-específicos, como un mecanismo de inmunidad protectora indicida por la vacuna basada en la proteína del circumsporozoite de plasmodium falciporum"</p> <p>PARASITE IMMUNOLOGY (OXFORD),</p> <p>vol. 25, no. 1, Enero 2003 (2003-01)</p> <p>páginas 17-25, XP002325856</p> <p>ISSN: 0141-9838</p> <p>documento completo</p>                                                      | 1-31                              |
| Y           | <p>WO 93/10152 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.) 27 de mayo de 1993 (1993-05-27)</p> <p>citado en la solicitud</p> <p>documento completo</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 1-31                              |
| Y           | <p>WO 2004/055187 A (CRUCCELL HOLLAND B.V.; PAU, MARIA GRAZIA; HOLTERMAN, LENNART; KASPERS, J) 1 de julio de 2004 (2004-07-01)</p> <p>citado en la solicitud</p> <p>documento completo</p>                                                                                                                                                                                                                                                           | 1-31                              |
| A           | <p>BRUNA-ROMERO O ET AL:"Inmunidad protectora mejorada contra la malaria por vacunación con un adenovirus recombinante que codifica la proteína del circumporozoite de plasmodium que carece del motivo de anclaje de GPI"</p> <p>VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC.</p> <p>GUILDFORD, GB,</p> <p>vol. 22, no. 27-28,</p> <p>9 de septiembre de 2004 (2004-09-09), páginas 3575-3584, XP004526937</p> <p>ISSN: 0264-410X</p> <p>documento completo</p> |                                   |

76

**REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No.  
PCT/EP2005/055209

| C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                   |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Categoría *                                          | Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Relevante a la reivindicación No. |
| A                                                    | WALSH DOUGLAS S ET AL: "Seguridad e inmunogenicidad de la vacuna de la malaria RTS, S+ TRAP formulada en el sistema de adyuvante AS02A en monos rhesus infantiles"<br>AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE,<br>vol. 70, no. 5, Mayo 2004 (2004-05), páginas 499-509, XP008046107<br>ISSN: 0002-9637<br>documento completo                                                 |                                   |
| P,X                                                  | -----<br>HEPPNER D G ET AL: "Hacia una vacuna multiantígeno, multietapa basada en RTS, S contra la malaria por falciparum: progreso en el Instituto de Investigación Walter Reed Army"<br>VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB,<br>vol. 23, no. 17-18,<br>18 de marzo de 2005 (2005-03-18), páginas 2243-2250, XP004777532<br>ISSN: 0264-410X<br>documento completo<br>----- | 1-31                              |

76

| REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL                           |   |                      |    |                                         | Solicitud Internacional No. |                         |
|-------------------------------------------------------------|---|----------------------|----|-----------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| información sobre miembros familias de patentes             |   |                      |    |                                         | PCT/EP2005/055209           |                         |
| Documento de patente<br>citado en el reporte de<br>búsqueda |   | Fecha de publicación |    | Miembro(s) de la familia de<br>patentes |                             | Fecha de<br>publicación |
| WO 9310152                                                  | A | 27-05-1993           | AT | 177755 T                                |                             | 15-04-1999              |
|                                                             |   |                      | AU | 1471797 A                               |                             | 12-06-1997              |
|                                                             |   |                      | AU | 2927892 A                               |                             | 15-06-1993              |
|                                                             |   |                      | CA | 2123612 A1                              |                             | 27-05-1993              |
|                                                             |   |                      | DE | 69228698 D1                             |                             | 22-04-1999              |
|                                                             |   |                      | DE | 69228698 T2                             |                             | 16-09-1999              |
|                                                             |   |                      | DK | 614465 T3                               |                             | 27-09-1999              |
|                                                             |   |                      | EP | 0614465 A1                              |                             | 14-09-1994              |
|                                                             |   |                      | ES | 2129461 T3                              |                             | 16-06-1999              |
|                                                             |   |                      | GR | 3029717 T3                              |                             | 30-06-1999              |
|                                                             |   |                      | HK | 1012405 A1                              |                             | 05-05-2000              |
|                                                             |   |                      | JP | 7501213 T                               |                             | 09-02-1995              |
|                                                             |   |                      | KR | 251505 B1                               |                             | 01-05-2000              |
|                                                             |   |                      | MX | 9206574 A1                              |                             | 01-05-1993              |
|                                                             |   |                      | NZ | 245114 A                                |                             | 26-07-1995              |
|                                                             |   |                      | PT | 101052 A                                |                             | 31-01-1994              |
|                                                             |   |                      | SG | 48390 A1                                |                             | 17-04-1998              |
| WO 2004055187                                               | A | 01-07-2004           | US | 2005265974 A1                           |                             | 01-12-2005              |



| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                       |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                             | Relevant to claim No. |
| Y                                                    | GARÇON NATHALIE ET AL: "Development of RTS,S/AS02: a purified subunit-based malaria vaccine candidate formulated with a novel adjuvant."<br>EXPERT REVIEW OF VACCINES. APR 2003, vol. 2, no. 2, April 2003 (2003-04), pages 231-238, XP008046132<br>ISSN: 1476-0584<br>the whole document                                                      | 1-31                  |
| Y                                                    | SUN PEIFANG ET AL: "Protective immunity induced with malaria vaccine, RTS,S, is linked to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-specific CD4+ and CD8+ T cells producing IFN-gamma."<br>JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 171, no. 12, 15 December 2003 (2003-12-15), pages 6961-6967, XP002325853<br>ISSN: 0022-1767<br>the whole document | 1-31                  |
| Y                                                    | STOUTE J A ET AL: "A PRELIMINARY EVALUATION OF A RECOMBINANT CIRCUMSPOROZOITE PROTEIN VACCINE AGAINST PLASMODIUM FALCIPARUM MALARIA"<br>NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, THE, MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, WALTHAM, MA, US, vol. 336, no. 2, 9 January 1997 (1997-01-09), pages 86-91, XP000990284<br>ISSN: 0028-4793<br>the whole document  | 1-31                  |
| Y                                                    | DOHERTY J F ET AL: "A Phase I safety and immunogenicity trial with the candidate malaria vaccine RTS,S/SBAS2 in semi-immune adults in The Gambia"<br>AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, vol. 61, no. 6, December 1999 (1999-12), pages 865-868, XP002325854<br>ISSN: 0002-9637<br>the whole document                           | 1-31                  |
|                                                      | -----<br>-/-<br>-----                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                       |

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | KESTER KENT E ET AL: "Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental Plasmodium falciparum malaria" JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, vol. 183, no. 4, 15 February 2001 (2001-02-15), pages 640-647, XP002325855<br>ISSN: 0022-1899<br>the whole document                                                                                | 1-31                  |
| Y         | SCHWENK ROBERT ET AL: "Opsonization by antigen-specific antibodies as a mechanism of protective immunity induced by Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-based vaccine." PARASITE IMMUNOLOGY (OXFORD), vol. 25, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 17-25, XP002325856<br>ISSN: 0141-9838<br>the whole document                                                     | 1-31                  |
| Y         | WO 93/10152 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A) 27 May 1993 (1993-05-27)<br>cited in the application<br>the whole document                                                                                                                                                                                                                                                  | 1-31                  |
| Y         | WO 2004/055187 A (CRUCCELL HOLLAND B.V; PAU, MARIA GRAZIA; HOLTERMAN, LENNART; KASPERS, J) 1 July 2004 (2004-07-01)<br>cited in the application<br>the whole document                                                                                                                                                                                                          | 1-31                  |
| A         | BRUNA-ROMERO O ET AL: "Enhanced protective immunity against malaria by vaccination with a recombinant adenovirus encoding the circumsporozoite protein of Plasmodium lacking the GPI-anchoring motif" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 22, no. 27-28, 9 September 2004 (2004-09-09), pages 3575-3584, XP004526937<br>ISSN: 0264-410X<br>the whole document |                       |

-/-

21

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                       |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                       | Relevant to claim No. |
| A                                                    | WALSH DOUGLAS S ET AL: "Safety and immunogenicity of RTS,S+TRAP malaria vaccine, formulated in the AS02A adjuvant system, in infant rhesus monkeys" - AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, vol. 70, no. 5, May 2004 (2004-05), pages 499-509, XP008046107<br>ISSN: 0002-9637<br>the whole document                         |                       |
| P,X                                                  | HEPPNER D G ET AL: "Towards an RTS,S-based, multi-stage, multi-antigen vaccine against falciparum malaria: progress at the Walter Reed Army Institute of Research" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 23, no. 17-18, 18 March 2005 (2005-03-18), pages 2243-2250, XP004777532<br>ISSN: 0264-410X<br>the whole document | 1-31                  |

21

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2005/055209

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9310152                                | A | 27-05-1993          | AT 177755 T                | 15-04-1999          |
|                                           |   |                     | AU 1471797 A               | 12-06-1997          |
|                                           |   |                     | AU 2927892 A               | 15-06-1993          |
|                                           |   |                     | CA 2123612 A1              | 27-05-1993          |
|                                           |   |                     | DE 69228698 D1             | 22-04-1999          |
|                                           |   |                     | DE 69228698 T2             | 16-09-1999          |
|                                           |   |                     | DK 614465 T3               | 27-09-1999          |
|                                           |   |                     | EP 0614465 A1              | 14-09-1994          |
|                                           |   |                     | ES 2129461 T3              | 16-06-1999          |
|                                           |   |                     | GR 3029717 T3              | 30-06-1999          |
|                                           |   |                     | HK 1012405 A1              | 05-05-2000          |
|                                           |   |                     | JP 7501213 T               | 09-02-1995          |
|                                           |   |                     | KR 251505 B1               | 01-05-2000          |
|                                           |   |                     | MX 9206574 A1              | 01-05-1993          |
|                                           |   |                     | NZ 245114 A                | 26-07-1995          |
|                                           |   |                     | PT 101052 A                | 31-01-1994          |
|                                           |   |                     | SG 48390 A1                | 17-04-1998          |
| WO 2004055187                             | A | 01-07-2004          | US 2005265974 A1           | 01-12-2005          |

SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual  
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional

20 de Abril de 2006 (20.04.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 2006/040334 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
A61K 39/015 (2006.01)

(74) Agentes: KLEIN, Bart et al.; Crucell Holland B.V., c/o Archimedesweg 4, NL-2333 CN Leiden (NL).

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP2005/055209

(81) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera para toda clase de protección nacional requerida): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Fecha de Registro Internacional: 13 de Octubre de 2005  
(13.10.2005)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:  
60/619,056 14 de Octubre de 2004 (14.10.04) US  
04105035.2 14 de Octubre de 2004 (14.10.04) EP

(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera para toda clase de protección regional requerida): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiatica (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitante: (para todos los estados designados excepto Estados Unidos) CRUCELL HOLLAND B.V. [NL/NL]; Archimedesweg 4, NL-2333 CN Leiden (NL). GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). WALTER REED ARMY INSTITUTE OF RESEARCH [US/US]; 503 Robert Grant Avenue, Silver Spring, Maryland 20910-7500 (US).

Declaración bajo la Regla 4.17:

- relativo a la calidad de inventor (Regla 4.17 (iv))

(72) Inventores: y

Publicado:

-- con reporte de Búsqueda Internacional  
-- antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser publicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones.

(75) Inventores/ solicitantes (para Estados Unidos solamente): PAU, Maria Grazia [IT/NL]; Bargelaan 80, NL-2333 CW Leiden (NL). GOUDSMIT, Jaap [NL/NL]; Koninginneweg 4, NL-1075 CX Amsterdam (NL). COHEN, Joseph, D. [US/BE]; GlaxoSmithKline, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). DUBOIS, Patrice, M. [BE/BE]; GlaxoSmithKline Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). STEWART, V. Ann [US/US]; 503 Robert Grant Avenue, Silver Spring, Maryland 20910-7500 (US). HEPPNER, Donald [US/US]; 503 Robert Grant Avenue, Silver Spring, Maryland 20910-7500 (US).

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: VACUNAS DE CEBADO/ REFUERZO CONTRA EL PALUDISMO

(57) Resumen: La invención se refiere a nuevos regímenes de vacunación en los cuales se aplican regímenes específicos de cebado/refuerzo usando vectores adenovirales recombinantes de baja neutralización que portan ácidos nucleicos que codifican para antígenos de plasmodium falciparum y vacunas de proteínas recombinantes purificadas tales como RTS,S, en el contexto de adyuvantes adecuados.

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
20 April 2006 (20.04.2006)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2006/040334 A1

(51) International Patent Classification:  
A61K 39/015 (2006.01)

(74) Agents: KLEIN, Bart et al.; Crucell Holland B.V., c/o  
Archimedesweg 4, NL-2333 CN Leiden (NL).

(21) International Application Number:  
PCT/EP2005/055209

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,  
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,  
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,  
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY,  
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO,  
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,  
SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 13 October 2005 (13.10.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/619,056 14 October 2004 (14.10.2004) US  
04105035.2 14 October 2004 (14.10.2004) EP

(71) Applicants (for all designated States except US): CRU-  
CELL HOLLAND B.V. [NL/NL]; Archimedesweg 4,  
NL-2333 CN Leiden (NL). GLAXOSMITHKLINE BI-  
OLOGICALS, S.A. [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330  
Rixensart (BE). WALTER REED ARMY INSTITUTE  
OF RESEARCH [US/US]; 503 Robert Grant Avenue,  
Silver Spring, Maryland 20910-7500 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,  
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): PAU, Maria-  
Grazia [IT/NI]; Bargelaan 80, NL-2333 CW Leiden  
(NL). GOUDSMIT, Jaap [NL/NL]; Koninginneweg 4,  
NL-1075 CX Amsterdam (NL). COHEN, Joseph; D.  
[US/BE]; GlaxoSmithKline, Rue de l'Institut 89, B-1330  
Rixensart (BE). DUBOIS, Patrice, M. [BE/BE]; Glaxo-  
SmithKline, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).  
STEWART, V. Ann [US/US]; 503 Robert Grant Avenue,  
Silver Spring, Maryland 20910-7500 (US). HEPPNER,  
Donald [US/US]; 503 Robert Grant Avenue, Silver Spring,  
Maryland 20910-7500 (US).

Declaration under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

— with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the  
claims and to be republished in the event of receipt of  
amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MALARIA PRIME/BOOST VACCINES

(57) Abstract: The invention relates to novel vaccine regimens in which specific prime/boost regimens are applied using low-  
neutralized recombinant adenoviral vectors harboring nucleic acids encoding antigens from Plasmodium falciparum and purified  
recombinant protein vaccines such as RTS,S, in the context of appropriate adjuvants.

WO 2006/040334 A1

PCT

De la OFICINA INTERNACIONAL

NOTIFICACION DE REGISTRO  
DE UN CAMBIO

(Regla 92 bis. 1 del PCT e  
Instrucciones Administrativas, Sección 422)

Para:  
KLEIN, Bart  
Crucell Holland B.V.  
c/o Archimedesweg 4  
NL-2333 CN Leiden  
Holanda

Fecha de envío por correo (día/mes/año)  
20 de Marzo de 2007 (20.03.2007)

Archivo de referencia del solicitante o agente  
0116WO00ORD

NOTIFICACION IMPORTANTE

Solicitud Internacional No.

Fecha de registro internacional (día/mes/año)

PCT/EP2002/055209

13 de Octubre de 2005 (13.10.2005)

1. Las siguientes indicaciones aparecieron en el registro en relación con:

☒ el solicitante      ☐ el inventor      ☐ el agente      ☐ el representante común

Nombre y Dirección

WALTER REED ARMY INSTITUTE OF RESEARCH  
503 Robert Grant Avenue  
Silver Spring, Maryland 20910-7500  
Estados Unidos de América

País de Nacionalidad  
US

País de Residencia  
US

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

2. La Oficina Internacional por el presente notifica al solicitante que el siguiente cambio se ha registrado en relación con:

☐ la persona      ☒ el nombre      ☐ la dirección      ☐ la nacionalidad      ☐ la residencia

Nombre y Dirección

THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES, as  
represented by the SECRETARY OF THE ARMY, on  
behalf of the WALTER REED ARMY INSTITUTE OF  
RESEARCH.  
503 Robert Grant Avenue  
Silver Spring, MD 20910-7500  
Estados Unidos de América

País de Nacionalidad  
US

País de Residencia  
US

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

3. Otras observaciones, si fuese necesario:

4. Se ha enviado una copia de esta notificación a:

☒ la Oficina que recibe      ☐ las Oficinas designadas relacionadas  
☐ la Autoridad de Búsqueda Internacional      ☒ las Oficinas seleccionadas relacionadas  
☐ la Autoridad de Examen Preliminar Internacional      ☐ otros:

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Funcionario autorizado  
Muller Antonia

Facsímile No. +41 22 338 82 70

Facsimile No. +41 22 338 89 75

Teléfono No. +41 22 338 82 43

0116 WO 00 020  
0116 WO 00 020

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KLEIN, Bart  
Crucell Holland B.V.  
c/o Archimedesweg 4  
NL-2333 CN Leiden  
PAYS-BAS

|                                                                |                                                                            |
|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Date of mailing (day/month/year)<br>20 March 2007 (20.03.2007) |                                                                            |
| Applicant's or agent's file reference<br>0116WO000RD           | IMPORTANT NOTIFICATION                                                     |
| International application No.<br>PCT/EP2005/055209             | International filing date (day/month/year)<br>13 October 2005 (13.10.2005) |

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

|                                                                                                                                                         |                            |                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Name and Address<br>WALTER REED ARMY INSTITUTE OF RESEARCH<br>503 Robert Grant Avenue<br>Silver Spring, Maryland 20910-7500<br>United States of America | State of Nationality<br>US | State of Residence<br>US |
|                                                                                                                                                         | Telephone No.              |                          |
|                                                                                                                                                         | Facsimile No.              |                          |
|                                                                                                                                                         | Teleprinter No.            |                          |

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

|                                                                                                                                                                                                                                                            |                            |                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Name and Address<br>THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES, as represented by the<br>SECRETARY OF THE ARMY, on behalf of the WALTER REED ARMY<br>INSTITUTE OF RESEARCH<br>503 Robert Grant Avenue<br>Silver Spring, MD 20910-7500<br>United States of America | State of Nationality<br>US | State of Residence<br>US |
|                                                                                                                                                                                                                                                            | Telephone No.              |                          |
|                                                                                                                                                                                                                                                            | Facsimile No.              |                          |
|                                                                                                                                                                                                                                                            | Teleprinter No.            |                          |

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned  
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned  
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

|                                                                                                                                 |                                                                                                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland<br>Facsimile No. +41 22 338 82 70 | Authorized officer<br>Muller Antonia<br>Facsimile No. +41 22 338 89 75<br>Telephone No. +41 22 338 82 43 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**CAPITULO REIVINDICATORIO COMO FUE  
ORIGINALMENTE PRESENTADO EN FASE  
INTERNACIONAL JUNTO CON SU  
TRADUCCION**

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

- 5           1. Un kit de partes caracterizado porque comprende:
- un adenovirus recombinante de replicación defectuosa en un excipiente farmacéuticamente aceptable, el adenovirus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica para un antígeno de circumsporozoito (CS) de un
- 10 parásito causante de paludismo y
- un antígeno proteináceo adyuvado,
- en donde el adenovirus recombinante se selecciona del grupo que consiste en adenovirus humano serotipo 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 y 50.
- 15           2. El kit de partes de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el adenovirus recombinante es adenovirus humano serotipo 35.
3. El kit de partes de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el antígeno
- 20 proteináceo comprende una proteína CS, o un fragmento inmunogénico de la misma, de un parásito causante de paludismo.
4. El kit de partes de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque el antígeno
- 25 proteináceo comprende una proteína híbrida de proteína CS o

un fragmento inmunogénico de la misma fusionado al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), en forma de partículas de lipoproteína con HBsAg.

5. El kit de partes de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el antígeno proteináceo comprende RTS,S.

6. El kit de partes de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el antígeno proteináceo es adyuvado con un adyuvante que comprende QS21 y 3D-MPL.

7. El kit de partes de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque el adyuvante comprende además liposomas que contienen colesterol.

8. El kit de partes de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el parásito causante de paludismo es *Plasmodium falciparum*.

9. El kit de partes de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el ácido nucleico heterólogo es optimizado en codones para una producción incrementada de la proteína codificada en un mamífero, de preferencia un humano.

10. El kit de partes de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el adenovirus recombinante está presente en una mezcla con un adyuvante.

11. Un kit de partes caracterizado porque comprende:

- un adenovirus simiano, canino o bovino recombinante y de replicación defectuosa en un excipiente  
5 farmacéuticamente aceptable, el adenovirus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica para un antígeno de circumsporozoito (CS) de *Plasmodium falciparum* optimizado en codones y

un antígeno proteináceo adyuvado que comprende  
10 RTS,S.

12. El kit de partes de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque el antígeno proteináceo es adyuvado con un adyuvante que comprende QS21 y 3D-MPL.

15 13. El kit de partes de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el adyuvante comprende además liposomas que contienen colesterol.

14. El kit de partes de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque el  
20 adenovirus recombinante de replicación defectuosa es una composición cebadora y el antígeno proteináceo adyuvado es una composición de refuerzo.

15. Uso de un adenovirus recombinante de replicación defectuosa que comprende un ácido nucleico  
25 heterólogo que codifica para un antígeno CS de un parásito

causante de paludismo, y un antígeno proteínáceo adyuvado, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de paludismo, en donde el adenovirus recombinante es un adenovirus simiano, canino o bovino, o un adenovirus humano serotipo 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 ó 50.

16. El uso de conformidad con la reivindicación 15, en donde el adenovirus recombinante de replicación defectuosa se usa como una composición cebadora y el antígeno proteínáceo adyuvado se usa como una composición de refuerzo.

10 17. El uso de conformidad con la reivindicación 15 ó 16, en donde el antígeno proteínáceo comprende una proteína CS, o un fragmento inmunogénico de la misma, de un parásito causante de paludismo.

18. El uso de conformidad con cualquiera de las 15 reivindicaciones 15 a 17, en donde el parásito causante de paludismo es *Plasmodium falciparum*.

19. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en donde el antígeno proteínáceo comprende una proteína híbrida de proteína CS o un fragmento 20 inmunogénico de la misma fusionado al antígeno superficial del virus de la hepatitis B (HBsAg), en forma de partículas de lipoproteína con HBsAg.

20. El uso de conformidad con la reivindicación 19, en donde el antígeno proteínáceo adyuvado comprende RTS,S.

25 21. El uso de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones 15 a 20, en donde el antígeno proteínáceo es adyuvado con QS21 y 3D-MPL.

22. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, en donde el ácido nucleico  
5 heterólogo es optimizado en codones para una producción incrementada de la proteína codificada en un mamífero, de preferencia un humano.

23. Un método para vacunar un mamífero contra una infección de paludismo, caracterizado porque comprende las  
10 etapas de:

- cebar al animal con un adenovirus recombinante de replicación defectuosa en un excipiente farmacéuticamente aceptable, el adenovirus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica para un antígeno CS de un parásito  
15 causante de paludismo y

- reforzar al mamífero con un antígeno proteínáceo adyuvado que comprenda una proteína híbrida de proteína CS o un fragmento inmunogénico de la misma fusionado al antígeno superficial del virus de la hepatitis B (HBsAg), en forma de  
20 partículas de lipoproteína con HBsAg.

24. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el antígeno proteínáceo comprende RTS,S.

25. El método de conformidad con la reivindicación 23 ó 24, caracterizado porque el adenovirus recombinante es

un adenovirus humano, simiano, canino o bovino.

26. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el adenovirus recombinante es un adenovirus humano seleccionado del grupo que consiste en 5 adenovirus humanos serotipos 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 y 50.

27. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, caracterizado porque el antígeno proteináceo es adyuvado con QS21 y 3D-MPL.

28. El método de conformidad con cualquiera de las 10 reivindicaciones 23 a 27, caracterizado porque el parásito causante de paludismo es *Plasmodium falciparum*.

29. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28, caracterizado porque el ácido nucleico heterólogo es optimizado en codones para una 15 producción incrementada de la proteína codificada en un mamífero, de preferencia un humano.

30. Un método para vacunar un mamífero contra una infección de paludismo caracterizado porque se usa el kit de partes de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 20 1 a 14.

31. Un método para vacunar un mamífero contra una infección de paludismo usando el kit de partes de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el refuerzo es seguido por uno o más refuerzos subsecuentes.

## CLAIMS

1. A kit of parts comprising:
  - a replication-defective recombinant adenovirus in a pharmaceutically acceptable excipient, said adenovirus comprising a heterologous nucleic acid encoding a circumsporozoite (CS) antigen from a malaria-causing parasite; and
  - an adjuvated proteinaceous antigen;
- 10 wherein said recombinant adenovirus is selected from the group consisting of human adenovirus serotype 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 and 50.
- 15 2. A kit of parts according to claim 1, wherein said recombinant adenovirus is human adenovirus serotype 35.
3. A kit of parts according to claim 1 or 2, wherein said proteinaceous antigen comprises a CS protein, or an immunogenic fragment thereof, from a malaria-causing
- 20 parasite.
4. A kit of parts according to claim 3, wherein said proteinaceous antigen comprises a hybrid protein of CS protein or an immunogenic fragment thereof fused to the
- 25 surface antigen from hepatitis B virus (HBsAg), in the form of lipoprotein particles with HBsAg.
5. A kit of parts according to claim 4 wherein the proteinaceous antigen comprises RTS,S.
- 30 6. A kit of parts according to any one of claims 1-5, wherein said proteinaceous antigen is adjuvated with an adjuvant comprising QS21 and 3D-MPL.

## CLAIMS

1. A kit of parts comprising:
  - a replication-defective recombinant adenovirus in a pharmaceutically acceptable excipient, said adenovirus comprising a heterologous nucleic acid encoding a circumsporozoite (CS) antigen from a malaria-causing parasite; and
  - an adjuvated proteinaceous antigen;
- 10 wherein said recombinant adenovirus is selected from the group consisting of human adenovirus serotype 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 and 50.
2. A kit of parts according to claim 1, wherein said recombinant adenovirus is human adenovirus serotype 35.
3. A kit of parts according to claim 1 or 2, wherein said proteinaceous antigen comprises a CS protein, or an immunogenic fragment thereof, from a malaria-causing
- 20 parasite.
4. A kit of parts according to claim 3, wherein said proteinaceous antigen comprises a hybrid protein of CS protein or an immunogenic fragment thereof fused to the
- 25 surface antigen from hepatitis B virus (HBsAg), in the form of lipoprotein particles with HBsAg.
5. A kit of parts according to claim 4 wherein the proteinaceous antigen comprises RTS,S.
- 30 6. A kit of parts according to any one of claims 1-5, wherein said proteinaceous antigen is adjuvated with an adjuvant comprising QS21 and 3D-MPL.

14. A kit of parts according to any one of claims 1-13, wherein said replication-defective recombinant adenovirus is a priming composition and said adjuvated proteinaceous antigen is a boosting composition.

5

15. Use of a replication-defective recombinant adenovirus comprising a heterologous nucleic acid encoding a CS antigen from a malaria-causing parasite, and an adjuvated proteinaceous antigen in the manufacture  
10 of a medicament for the treatment or prevention of malaria, wherein said recombinant adenovirus is a simian, a canine, a bovine adenovirus or a human adenovirus serotype 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 or 50.

15 16. Use according to claim 15, wherein said replication-defective recombinant adenovirus is used as a priming composition and said adjuvated proteinaceous antigen is used as a boosting composition.

20 17. Use according to claim 15 or 16, wherein said proteinaceous antigen comprises a CS protein, or an immunogenic fragment thereof, from a malaria-causing parasite.

25 18. Use according to any one of claims 15-17, wherein said malaria-causing parasite is *Plasmodium falciparum*.

19. Use according to any one of claims 15-18, wherein said proteinaceous antigen comprises a hybrid protein of  
30 CS protein or an immunogenic fragment thereof fused to the surface antigen from hepatitis B virus (HBsAg), in the form of lipoprotein particles with HBsAg.

20. Use according to claim 19, wherein said adjuvated proteinaceous antigen comprises RTS,S.

21. Use according to any one of claims 15-20, wherein  
5 said proteinaceous antigen is adjuvated with QS21 and 3D-MPL.

22. Use according to any one of claims 15-21, wherein  
10 said heterologous nucleic acid is codon-optimized for increased production of the encoded protein in a mammal, preferably a human.

23. A method of vaccinating a mammal for a malaria infection comprising the steps of:

- 15 - priming said mammal with a replication-defective recombinant adenovirus in a pharmaceutically acceptable excipient, said adenovirus comprising a heterologous nucleic acid encoding a CS antigen from a malaria-causing parasite; and
- 20 - boosting said mammal with an adjuvated proteinaceous antigen comprising a hybrid protein of CS protein or an immunogenic fragment thereof fused to the surface antigen from hepatitis B virus (HBsAg), in the form of lipoprotein particles with HBsAg.

25

24. A method according to claim 23, wherein said proteinaceous antigen comprises RTS,S.

25. A method according to claim 23 or 24, wherein said  
30 recombinant adenovirus is a human, a simian, a canine or a bovine adenovirus.

26. A method according to claim 25, wherein said recombinant adenovirus is a human adenovirus selected

38

from the group consisting of human adenovirus serotype  
11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 and 50.

27. A method according to any one of claims 23-26,  
5 wherein said proteinaceous antigen is adjuvated with QS21  
and 3D-MPL.

28. A method according to any one of claims 23-27,  
wherein said malaria-causing parasite is *Plasmodium*  
10 *falciparum*.

29. A method according to any one of claims 23-28,  
wherein said heterologous nucleic acid is codon-optimized  
for increased production of the encoded protein in a  
15 mammal, preferably a human.

30. A method of vaccinating a mammal for a malaria  
infection using a kit of parts according to any one of  
claims 1-14.  
20

31. A method of vaccinating a mammal for a malaria  
infection using a kit of parts according to claim 14,  
wherein the boost is followed by one or more subsequent  
boosts.  
25

**TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES**  
**PCT**  
**REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD**  
 (Capítulo II del Tratado de Cooperación de Patentes)  
 (PCT Artículo 36 y Regla 70)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                        |                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Registro de referencia del solicitante o agente<br>0116WO000ORD                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>PARA FUTURAS ACCIONES</b> Ver Forma PCT/IPEA/416                    |                                                   |
| Solicitud Internacional No.<br>PCT/EP2005/055209                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Fecha de registro internacional<br>(día/mes/año)<br>13.10.2005         | Fecha de prioridad<br>(día/mes/año)<br>14.10.2004 |
| Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC<br>INV. A61K39/015                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                        |                                                   |
| Solicitante<br><b>CRUCCELL HOLLAND B.V. et al.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                        |                                                   |
| 1. Este reporte es el reporte de examen preliminar internacional, establecido por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y transmitido al solicitante de conformidad con el Artículo 36.<br>2. Este REPORTE consta de un total de <u>8</u> hojas, incluyendo esta carátula.<br>3. Este reporte también es acompañado por ANEXOS, que comprenden:<br>a. <input checked="" type="checkbox"/> (enviado al solicitante y a la Oficina Internacional) un total de <u>4</u> hojas, como sigue:<br><input checked="" type="checkbox"/> hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos los cuales han sido modificados y son la base de este reporte y/o hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas).<br><input type="checkbox"/> hojas que reemplazan hojas anteriores, pero las cuales esta Autoridad considera que contienen una modificación que va más allá de la revelación en la solicitud internacional como se presentó, como se indicó en el ítem 4 de la Casilla No. I y la Casilla Suplementaria.<br>b. <input type="checkbox"/> (enviado únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y número de medio(s) electrónico(s)) _____, que contienen un listado de secuencias y/o tablas con ello, únicamente en una forma legible en computador, como se indicó en la Casilla Suplementaria Relacionada con el Listado de Secuencias (ver Sección 802 de las Instrucciones Administrativas). |                                                                        |                                                   |
| 4. Este reporte contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems:<br><input checked="" type="checkbox"/> Casilla No. I      Bases del Reporte<br><input type="checkbox"/> Casilla No. II      Prioridad<br><input checked="" type="checkbox"/> Casilla No. III      No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial.<br><input type="checkbox"/> Casilla No. IV      Falta de unidad de invención<br><input checked="" type="checkbox"/> Casilla No. V      Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación.<br><input type="checkbox"/> Casilla No. VI      Ciertos documentos citados<br><input type="checkbox"/> Casilla No. VII      Ciertos defectos en la solicitud internacional<br><input checked="" type="checkbox"/> Casilla No. VIII      Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                        |                                                   |
| Fecha de presentación de la demanda<br>27.07.2006                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Fecha de terminación de este reporte<br>05.10.2006                     |                                                   |
| Nombre y dirección de correo de la IPEA<br>European Patent Office-P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL-2280 HV Rijswijk-Pays Bas<br>Tel. +31 70 340-2040 Tx: 31 651 epo nl<br>Fax. +31 70 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Funcionario autorizado<br>Hix, Rebecca<br>Teléfono No. +31 70 340-3898 |                                                   |

**Casilla No. I Bases del reporte**

**1. Respecto al idioma, este reporte se basó en:**

- ☒ La solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó.
- ☐ Una traducción de la solicitud internacional al , que es el lenguaje de una traducción entregada para propósitos de:
- ☐ búsqueda internacional (según Reglas 12.3. y 23.1 (b)).
- ☐ publicación de la solicitud internacional (según la Regla 12.4(a))
- ☐ examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2 (a) y/o 55.3(a)).

**2. Respecto a los elementos de la solicitud internacional este Reporte se basó en (hojas reemplazadas que has sido suministradas a la oficina receptora en respuesta a una invitación según Artículo 14, son referidas en este reporte como "originalmente presentadas" y no son anexadas a este reporte):**

**Descripción, páginas**

1-61 como se presentó originalmente

**Reivindicaciones, números**

30, 31 como se presentó originalmente  
1-29 presentado con la demanda

**Dibujos, hojas**

1-12 como se presentó originalmente

☐ la secuencia numerada y/o alguna tabla(s)-ver Casilla Suplementaria a la Secuencia Numerada

**3. ☒ Las modificaciones resultaron en la cancelación de:**

- ☐ la descripción, páginas
- ☒ las reivindicaciones, Nos. 30,31
- ☐ los dibujos, hojas/figuras
- ☐ listado de secuencia (especificar)
- ☐ cualquier tabla(s) relacionadas con la serie de listados (especificar)

**4. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (alguno de) los anexos corregidos a este reporte y numerado antes no ha sido hecho, desde que ellos han sido considerados a través de la presentación original, como esta indicado en la casilla suplementaria (regla 70.2©)..**

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/figuras
- ☐ secuencia que enumera (especificar)
- ☐ algunas tabla(s) relatando secuencia numerada (especificar)

\*si el Item 4 aplica, algunas o todas aquellas hojas pueden ser marcadas "reemplazadas"

|                                                                  |                                                  |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE<br/>PATENTABILIDAD</b> | Solicitud internacional No.<br>PCT/EP2005/055209 |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|

**Casilla No. III. No establecimiento de opinión respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial**

1. Las cuestiones de si la invención reivindicada parece ser novedosa, involucrar nivel inventivo (ser no obvia) o ser industrialmente aplicable no han sido examinadas respecto a:

☐ toda la solicitud internacional

☒ las reivindicaciones Nos. 21-29

porque:

☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 21-29 se relaciona con la siguiente materia objeto las cuales no requieren examen preliminar internacional (*especificar*):

**ver hoja separada**

☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos. son tan imprecisas que no pudo formarse una opinión significativa (*especifique*):

☐ las reivindicaciones o dichas reivindicaciones Nos. están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa (*especificar*)..

☐ no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos.

☐ no fue posible formarse una opinión significativa sin la lista de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no:

☐ presentó una lista de secuencias en papel cumpliendo con el estándar presentado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicha lista no estaba disponible a la Autoridad de Examen Preliminar Internacional en un formato y manera aceptable a ella.

☐ presentó una lista de secuencias en formato electrónico cumpliendo con el estándar presentado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicha lista no estaba disponible a la Autoridad de Examen Preliminar Internacional en un formato y manera aceptable a ella.

☐ pagó los derechos de presentación tardía requeridos para la presentación de una lista de secuencias en respuesta a una invitación bajo las Reglas 13ter.1(a) o (b) y 13ter.2.

☐ no fue posible formarse una opinión significativa sin las tablas relacionadas con la lista de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no presentó dichas tablas en formato electrónico cumpliendo con los requerimientos técnicos presentados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas, y dichas tablas no estaban disponibles a la Autoridad de Examen Preliminar Internacional en un formato y manera aceptable a ella.

☐ las tablas relacionadas con la lista de secuencias nucleótidas y/o amino ácidas, si están en formato electrónico únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos presentados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

☐ Ver hoja separada para más detalles

|                                                                                                                                                                                                                        |                                      |                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------|
| REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD                                                                                                                                                                  |                                      | Solicitud internacional No.<br>PCT/EP2005/055209 |
| Casilla No. V Afirmación razonada bajo el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación                                          |                                      |                                                  |
| 1. Afirmación                                                                                                                                                                                                          |                                      |                                                  |
| Novedad (N)                                                                                                                                                                                                            | Reivindicaciones<br>Reivindicaciones | 1-29                                             |
| Nivel inventivo (IS)                                                                                                                                                                                                   | Reivindicaciones<br>Reivindicaciones | 1-29                                             |
| Aplicabilidad industrial (IA)                                                                                                                                                                                          | Reivindicaciones<br>Reivindicaciones | 1-20                                             |
| 2. Citaciones y Explicaciones (Regla 70.7)                                                                                                                                                                             |                                      |                                                  |
| ver hoja separada                                                                                                                                                                                                      |                                      |                                                  |
| Casilla No. VIII Ciertas obsesrvaciones en la solicitud internacional                                                                                                                                                  |                                      |                                                  |
| Las siguientes observaciones sobre la claridad de las reivindicaciones, la descripción y los dibujos o sobre la pregunta de si las reivindicaciones están completamente soportadas por la descripción, son formuladas: |                                      |                                                  |
| ver hoja separada                                                                                                                                                                                                      |                                      |                                                  |

### **Re Item III**

#### **No establecimiento de opinión con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial**

Las reivindicaciones 21 a 29 se relacionan con un método para vacunar un mamífero. La materia objeto considerada por esta Autoridad como cubierta por las provisiones de R. 67.1 (iv) PCT. En consecuencia, no se formulará opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Art. 34(4)(a)(I) PCT).

### **Re Item V**

#### **Declaración razonada bajo la Regla 66.2(a)(ii) con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que soportan dicha declaración**

- 1 Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 21 y 29 sobre la pregunta si son aplicables industrialmente, no existe un criterio unificado en los Estados Contratantes de PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable la materia objeto de las reivindicaciones para el uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero pueden permitir, sin embargo, reivindicaciones a un compuesto conocido para primer uso en tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.
- 2 Se hace referencia a los siguientes documentos en esta comunicación; la numeración se adjuntará al resto del procedimiento:
  - D1: Stoute et al. The Journal of Infectious Diseases, 1998, vol. 178; páginas 1139-44
  - D2: Garçon et al. Expert Review of vaccines, Abril 2003, vol. 2, no. 2, pg. 231-238
  - D3: WO 2004/055187 A (CRUCCELL HOLLAND B.V; Julio 1, 2004)
- 3 **NOVEDAD (Art. 33(2) PCT)**
  - 3.1 D1 y D2 involucran la vacuna RTS,S contra el paludismo, que es una proteína híbrida del antígeno de

circumsporozoito (CS) del *Plasmodium falciparum* fusionado al antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HbsAg) y que comprende los adyuvantes QS21 y 3D-MPL, llamados AS02®, ver D1, página 232, columna 2. La vacuna revelada en D1 y D2 fue la única vacuna candidata que se demostró que produce protección en el hombre en un sometimiento artificial así como en ensayos de campo naturales, en donde el sistema adyuvante fue capaz de producir altos títulos de anticuerpo, con una inmunidad fuerte mediada por célula, ver D1, Figura 1.

- 3.2 La técnica previa no revela la combinación de una vacuna contra paludismo como RTS,S y un adenovirus recombinante de replicación defectuosa.
- 3.3 En vista de la técnica previa citada, las reivindicaciones 1 a 29 parecen ser novedosas y por lo tanto, cumplen los requerimientos del Art. 33(2) PCT.

#### 4 NIVEL INVENTIVO (art. 33 (3) PCT)

- 4.1 Se considera que el documento D1 representa el estado de la técnica más relevante. A la luz de la diferencia definida en el punto 3.2, el problema a ser resuelto por la presente invención puede, por lo tanto, considerarse como la provisión de un medio alternativo para tratar el paludismo.
- 4.2 La solución propuesta es la combinación del sistema RTS,S y adyuvante conocido con un adenovirus con replicación defectuosa, que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de circumsporozoita (CS) a partir de un parásito que causa el paludismo, en donde el adenovirus con replicación defectuosa es una composición cebadora y el antígeno proteináceo cocoadyudado es la composición de refuerzo.
- 4.3 D3 revela adenovirus con replicación defectuosa que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de circumsporozoito (CS) de *Plasmodium*. Los adenovirus recombinantes usados son del Adenovirus serotipo 5 (Ad5CS) y Adenovirus serotipo 35 (Ad35CS) y está demostrado que cuando las vacunas son administradas producen una respuesta inmune fuerte ya sea como vacuna simple o como refuerzos.

- 4.4 Los dos sistemas de vacuna contra paludismo más efectivos en el estado de la técnica involucran la vacuna RTS,S que comprende los adyuvantes QS21 y 3D-MPL, revelados en D1 y D2, y el adenovirus con replicación defectuosa que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de circumsporozoito (CS) de *Plasmodium*, y Adenovirus serotipos 5 y 35 (Ad5CS y Ad35CS), D3.
- 4.5 El vector de adenovirus recombinante que expresa el antígeno *P.falciparum* en una composición cebadora en combinación con una composición de refuerzo que comprende RTS,S parece producir un aumento significativo de la respuesta inmune celular. Las Figuras 1 y 2 indican un aumento en la respuesta de célula T a las 2 semanas y 3 meses después del refuerzo, en donde la combinación de Ad35, RTS, RTS produce una respuesta más fuerte comparada con RTS, RTS, Ad35.
- 4.6 Los resultados también indican que una respuesta de célula T mayor se obtiene cuando se administra Ad35, RTs, RTs como cebador, refuerzo, refuerzo, la Figura 5, comparada con RTS, RTs, Ad35 (cebador, refuerzo, refuerzo), Figura 7. Las Figuras 11 y 12 también ilustran la diferencia en respuesta de célula T con diferentes órdenes de cebado.
- 4.7 En consecuencia, el adenovirus con replicación defectuosa (ad35) que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de circumsporozoito CS a partir de un parásito que causa el paludismo, usada como una composición cebadora, y el antígeno RTS,S proteináceo coadyudado, usado como composición de refuerzo, produce inesperadamente una respuesta de célula T más fuerte. Tal efecto no se sugería ni se esperaba a partir de las vacunas contra el paludismo del estado de la técnica, y por lo tanto, se considera que involucra un nivel inventivo de acuerdo con el Artículo 33 (3) PCT.
- 4.8 En vista de lo anterior, se considera que la materia objeto de las reivindicaciones 1 a 29 involucra un nivel inventivo en el sentido del Artículo 33(3) PCT.

### **Re Item VIII**

#### **Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional**

#### **CLARIDAD (Art. 6 PCT)**

1. La reivindicación independiente 1 involucra adenovirus recombinante seleccionado del grupo de adenovirus humanos serotipos 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 y 50, y la reivindicación 11 involucra adenovirus recombinante simio, canino o bovino, la reivindicación 14 incluye ambas definiciones; sin embargo, en los ejemplos de la descripción han sido demostrados como productores de un efecto sorprendente solamente los que involucran los adenovirus defectuosos de replicación Ad5CS y Ad35CS, que comprenden un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de circumsporozoito (CS) del *Plasmodium falciparum*. Adicionalmente, las reivindicaciones 1, 11, 14 y 21 definen “un antígeno proteináceo coadyudado” mientras que los ejemplos solo usan RTS,S con los adyuvantes QS21 y s-3D-MPL.
2. Una reivindicación independiente debe especificar claramente todas las características técnicas esenciales necesarias para definir la invención. En el caso presente, la combinación particular de Ad35, RTS, RTS, administrada como cebador, refuerzo, refuerzo ha mostrado producir el efecto técnico sorprendente al cual se le puede reconocer nivel inventivo. Por lo tanto, dichas características técnicas esenciales deben ser incorporadas en dichas reivindicaciones independientes 1, 11, 14 y 21 con el fin de satisfacer los requerimientos de claridad de acuerdo con al Artículo 6 PCT.
3. Adicionalmente, las reivindicaciones independientes 1, 11, 14 y 21 no parecen estar soportadas en la descripción a lo largo de todo el alcance reivindicado, e involucran materia objeto que es puramente especulativa y no se basa en hechos técnicos de acuerdo con al Artículo 6 PCT, ya que no se ha demostrado que ninguna otra combinación de características produzca el efecto técnico sorprendente.
3. Los términos “antígeno proteináceo coadyudado” de las reivindicaciones 1 y 11, “fragmento inmunogénico del mismo”, reivindicaciones 3, 4, 15, 17 y 21, y “codón optimizado”, reivindicaciones 9, 11, 20 y 27 son vagos e indefinidos, y como tales hacen que el alcance de las reivindicaciones no sea claro (Artículo 6 PCT).

27-07-2006

Fecha: Julio 27, 2006  
Nuestra referencia: 0116 WO 00 IRD  
Página 3

EP2005055209

## NUEVO JUEGO DE REIVINDICACIONES

## 1. Un kit de partes que comprende:

- un adenovirus recombinante con replicación defectuosa en un excipiente farmacéuticamente aceptable, dicho adenovirus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de circumsporozoito (CS) a partir de un parásito que causa el paludismo, y
- un antígeno proteínico coadyudado;

en donde dicho adenovirus recombinante se selecciona del grupo que consiste de adenovirus humano serotipo 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 y 50, y en donde dicho adenovirus recombinante con replicación defectuosa es una composición cebadora y dicho antígeno proteínico coadyudado es una composición de refuerzo.

2. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho adenovirus recombinante es el adenovirus humano serotipo 35.

3. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho antígeno proteínico comprende una proteína CS, o un fragmento inmunogénico de la misma, de un parásito que causa el paludismo.

4. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho antígeno proteínico comprende una proteína híbrida de la proteína CS o un fragmento inmunogénico de la misma, fusionado al antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HBsAg), en la forma de partículas de lipoproteína con HBsAg.

5. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el antígeno proteínico comprende RTS,S.

6. Un kit de partes de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho antígeno proteínico está coadyudado con un adyuvante que comprende QS21 y 3D-MPL.

7. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el adyuvante comprende además liposomas que contienen colesterol.

8. Un kit de partes de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicho parásito que causa el paludismo es *Plasmodium falciparum*.

recibido en la EPO el 27 de julio de 2006 14:21:17 pág HOJA ENMENDADA

27-07-2006

Fecha: Julio 27, 2006  
Nuestra referencia: 0116 WO 00 IRD  
Página 4

EP2005055209

9. Un kit de partes de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho ácido nucleico heterólogo es de codón optimizado para producción aumentada de la proteína codificada en un mamífero, preferiblemente un humano.

10. Un kit de partes de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicho adenovirus recombinante está presente en una mezcla con un adyuvante.

11. Un kit de partes que comprende:

- un adenovirus recombinante con replicación defectuosa simio, canino o bovino, en un excipiente farmacéuticamente aceptable, dicho adenovirus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de circunsporozoito (CS) de codón optimizado de *Plasmodium falciparum*; y
- un antígeno proteináceo coadyudado que comprende RTs, S;

en donde dicho adenovirus recombinante con replicación defectuosa es una composición cebadora y dicho antígeno proteináceo coadyudado es una composición de refuerzo.

12. Un kit de partes de acuerdo con reivindicación 11, en donde dicho antígeno proteináceo está coadyudado con un adyuvante que comprende QS21 y 3D-MPL.

13. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación 12, en donde al adyuvante comprende además liposomas que contienen colesterol.

14. Uso de un adenovirus recombinante con replicación defectuosa que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de CS en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de el paludismo, en donde dicho adenovirus recombinante es un adenovirus simio, uno canino, uno bovino o un adenovirus humano serotipo 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 o 50, y en donde dicho adenovirus recombinante con replicación defectuosa se usa como una composición cebadora y dicho antígeno proteináceo coadyudado se usa como una composición de refuerzo.

15. Uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde dicho antígeno proteináceo comprende una proteína CS, o un fragmento inmunogénico de la misma, de un parásito de causa el paludismo.

16. Uso de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, en donde dicho parásito que causa el paludismo es *Plasmodium falciparum*.

27-07-2006

Fecha: Julio 27, 2006  
Nuestra referencia: 0116 WO 00 IRD  
Página 5

EP2005055209

17. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en donde dicho antígeno proteínico comprende una proteína híbrida de la proteína CS o un fragmento inmunogénico de la misma fusionado al antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HBsAg), en la forma de partículas de lipoproteína con HBsAg.

18. Uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicho antígeno proteínico coadyudado comprende RTS,S.

19. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-18, en donde dicho antígeno proteínico está coadyudado con QS21 y 3D-MPL.

20. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-19, en donde dicho ácido nucleico heterólogo es de codón optimizado para producción aumentada de la proteína codificada en un mamífero, preferiblemente un humano

21. Un método para vacunar un mamífero contra una infección de paludismo, que comprende los pasos de:

- cebar dicho mamífero con un adenovirus recombinante con replicación defectuosa en un excipiente farmacéuticamente aceptable, dicho adenovirus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de CS de un parásito que causa el paludismo; y
- reforzar dicho mamífero con un antígeno proteínico coadyudado, que comprende una proteína híbrida de la proteína CS o un fragmento inmunogénico de la misma fusionado al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), en la forma de partículas de lipoproteína con HBsAg.

22. Un método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicho antígeno proteínico comprende RTS,S.

23. Un método de acuerdo con la reivindicación 21 o 23, en donde dicho adenovirus recombinante es un adenovirus humano, uno simio, uno canino o uno bovino.

24. Un método de acuerdo con la reivindicación 23, en donde dicho adenovirus recombinante es un adenovirus humano seleccionado del grupo que consiste de adenovirus humano serotipo 11, 24, 26, 34, 35, 48 y 50.

25. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-24, en donde dicho antígeno proteínico está coadyudado con QS21 y 3D-MPL.

recibido en la EPO el 27 de julio de 2006 14:21:17 pág HOJA ENMENDADA

50

CRUCELL IP DEPT

27-07-2006

Fecha: Julio 27, 2006  
Nuestra referencia: 0116 W/O 00 IRD  
Página 6

EP2005055209

26. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-25, en donde dicho parásito que causa el paludismo es *Plasmodium falciparum*.

27. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-26, en donde dicho ácido nucleico heterólogo es de codón optimizado para producción de la proteína codificada en un mamífero, preferiblemente un humano.

28. Un método para vacunar un animal contra una infección por paludismo usando un kit de partes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

29. Un método para vacunar un mamífero de acuerdo con la reivindicación 28, en donde el refuerzo es seguido por uno o más refuerzos posteriores.

50

# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |                                                                                                                                                |  |                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|----------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br>0116WO00ORD                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |  | <b>FOR FURTHER ACTION</b>                                                                                                                      |  | See Form PCT/PEA/416                         |
| International application No.<br>PCT/EP2005/055209                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |  | International filing date (day/month/year)<br>13.10.2005                                                                                       |  | Priority date (day/month/year)<br>14.10.2004 |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>INV. A61K39/015                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |                                                                                                                                                |  |                                              |
| Applicant<br>CRUCCELL HOLLAND B.V. et al.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |                                                                                                                                                |  |                                              |
| <p>1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.</p> <p>3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> sent to the applicant and to the International Bureau) a total of 4 sheets, as follows:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions).</p> <p><input type="checkbox"/> sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in Item 4 of Box No. I and the Supplemental Box.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).</p> |  |                                                                                                                                                |  |                                              |
| <p>4. This report contains indications relating to the following items:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. I Basis of the report</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. II Priority</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. IV Lack of unity of invention</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VI Certain documents cited</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VII Certain defects in the international application</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. VIII Certain observations on the international application</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |                                                                                                                                                |  |                                              |
| Date of submission of the demand<br>27.07.2006                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  | Date of completion of this report<br>05.10.2006                                                                                                |  |                                              |
| Name and mailing address of the international preliminary examining authority:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  | Authorized officer                                                                                                                             |  |                                              |
|  <p>European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2<br/>NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas<br/>Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl<br/>Fax: +31 70 340 - 3018</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  | <p>Hix, Rebecca</p> <p>Telephone No. +31 70 340-3898</p>  |  |                                              |

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT  
ON PATENTABILITY**

International application No.  
PCT/EP2005/055209

**Box No. I Basis of the report**

1. With regard to the language, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
  - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
    - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
    - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
    - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))
2. With regard to the elements\* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

**Description, Pages**

1-61 as originally filed

**Claims, Numbers**

30, 31 as originally filed

1-29 filed with the demand

**Drawings, Figures**

1-12 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☒ the claims, Nos. 30, 31
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify):*
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify):*

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify):*
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify):*

\* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT  
ON PATENTABILITY**

International application No.  
PCT/EP2005/055209

**Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,  
☒ claims Nos. 21-29

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 21-29 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):  
**see separate sheet**
- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ no international search report has been established for the said claims Nos.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b) and 13ter.2.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

54

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT  
ON PATENTABILITY

International application No.  
PCT/EP2005/055209

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

|                               |             |      |
|-------------------------------|-------------|------|
| Novelty (N)                   | Yes: Claims | 1-29 |
|                               | No: Claims  |      |
| Inventive step (IS)           | Yes: Claims | 1-29 |
|                               | No: Claims  |      |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | 1-20 |
|                               | No: Claims  |      |

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**Re Item III**

**Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

Claims 21 to 29 relate to a method of vaccinating a mammal. The subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

**Re Item V**

**Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

- 1 For the assessment of the present claims 21 to 29 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.
- 2 The following documents are referred to in this communication; the numbering will be adhered to in the rest of the procedure:  
D1: Stoute et al. The Journal of Infectious Diseases, 1998, vol. 178: pages 1139-44  
D2: Garçon et al. Expert review of vaccines, April 2003, vol. 2, no. 2, pg. 231-238.  
D3: WO 2004/055187 A (CRUCCELL HOLLAND B.V; 1 July 2004)
- 3 **NOVELTY** (Art. 33 (2) PCT)
  - 3.1 D1 and D2 involve the malaria vaccine RTS,S which is a hybrid protein of the

circumsporozoite (CS) antigen of the *Plasmodium falciparum* fused to the hepatitis B virus surface antigen (HbsAg) and comprising the adjuvants QS21 and 3D-MPL, termed AS02®, see D1, page 232, column 2. The vaccine disclosed in D1 and D2 was the only vaccine candidate that was demonstrated to elicit protection in man in artificial challenge as well as in natural field trials, where the adjuvant system was capable of eliciting high antibody titres with a strong cell-mediated immunity, see D1, Figure 1

- 3.2 The prior art does not disclose the combination of a malaria vaccine such as RTS,S and a replication-defective recombinant adenovirus.
- 3.3 In view of the prior art cited, claims 1 to 29 appear to be novel and meet therefore the requirements of Art. 33 (2) PCT.

#### **4 INVENTIVE STEP (Art. 33 (3) PCT)**

- 4.1 Document D1 is considered to represent the most relevant state of the art. In the light of the difference defined above point 3.2, the problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as providing an alternative means of treating malaria.
- 4.2 The proposed solution is the combination of the known RTS,S and adjuvant system with a replication-defective recombinant adenovirus comprising a heterologous nucleic acid encoding a circumsporozoite (CS) antigen from a malaria-causing parasite, where the replication-defective recombinant adenovirus is a priming composition and the adjuvanted proteinaceous antigen is the boosting composition.
- 4.3 D3 discloses replication-defective recombinant adenovirus comprising a heterologous nucleic acid encoding a circumsporozoite (CS) antigen from *Plasmodium*. The recombinant adenoviruses used are from Adenovirus serotype 5 (Ad5CS) and Adenovirus serotype 35 (Ad35CS) and where the vaccines administered are demonstrated as eliciting a strong immune response as either a single vaccine or as boosters.

- 4.4 The two most effective malaria vaccine systems available in the state of the art involve the RTS,S vaccine comprising the adjuvants QS21 and 3D-MPL, disclosed in D1 and D2, and the replication-defective recombinant adenovirus comprising a heterologous nucleic acid encoding a circumsporozoite (CS) antigen from *Plasmodium* and Adenovirus serotypes 5 and 35 (Ad5CS and Ad35CS), D3.
- 4.5 The recombinant adenovirus vector expressing the *P. falciparum* antigen in a priming composition in combination with a boosting composition comprising RTS,S appears to result in a significant increase in the cellular immune response. Figures 1 and 2 indicate an increase in the T cell response at 2 weeks and 3 months after boost where the combination of Ad35, RTS, RTS results in a stronger response compared with RTS, RTS, Ad35.
- 4.6 The results also indicate that a higher T cell response is obtained when Ad35, RTS, RTS is administered as prime, boost, boost, Figure 5 compared with RTS, RTS, Ad35 (prime, boost, boost), Figure 7. Figures 11 and 12 also illustrate the difference in T cell response with different orders of priming.
- 4.7 Consequently, the replication-defective recombinant adenovirus (Ad35) comprising a heterologous nucleic acid encoding a circumsporozoite CS antigen from a malaria causing parasite, used as a priming composition and the adjuvated proteinaceous antigen RTS, S, used as a boosting composition unexpectedly results in a stronger T cell response. Such an effect is neither suggested nor expected from the malaria vaccines of the state of the art and therefore is considered to involve an inventive step according to Article 33(3) PCT.
- 4.8 In view of the above, the subject-matter of claims 1 to 29 is considered to involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

**Re Item VIII**

**Certain observations on the international application**

**CLARITY (Art.6 PCT)**

1. Independent claim 1 involves recombinant adenovirus selected from the group of human adenovirus serotypes 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 and 50 and claim 11 involves recombinant simian, canine or bovine adenoviruses, claim 14 includes both definitions, however the examples in the description have been demonstrated as resulting in a surprising effect only involving the replication defective adenoviruses Ad5CS and Ad35CS, comprising a heterologous nucleic acid encoding a circumsporozoite (CS) antigen from *Plasmodium falciparum*. In addition, claims 1, 11, 14 and 21 define "an adjuvated proteinaceous antigen" whereas the examples only use RTS,S with the adjuvants QS21 and 3D-MPL.
2. An independent claim must specify clearly all the essential technical features necessary to define the invention. In the present case the particular combination Ad35, RTS, RTS, administered as prime, boost, boost have been shown to result in the surprising technical effect upon which an inventive step may be acknowledged. Therefore said essential technical features must be incorporated into the said independent claims 1, 11, 14 and 21 in order to satisfy the requirements of clarity according to Article 6 PCT.
3. In addition, the independent claims 1, 11, 14 and 21 appear not to be supported in the description across the whole of the scope claimed and involve subject-matter which is purely speculative and not based upon technical facts according to Article 6 PCT, since no other combination of features have been demonstrated as resulting in the surprising technical effect.
3. The terms "adjuvated proteinaceous antigen" claims 1 and 11, "immunogenic fragment thereof", claims 3, 4, 15, 17 and 21 and "codon optimized", claims 9, 11, 20 and 27 are vague and indefinite and as such render the scope of the claims unclear (Article 6 PCT).

Date: July 27, 2006  
Our ref.: 0116 WO 00 ORD  
Page: 3

#### New set of Claims

1. A kit of parts comprising:

- a replication-defective recombinant adenovirus in a pharmaceutically acceptable excipient, said adenovirus comprising a heterologous nucleic acid encoding a circumsporozoite (CS) antigen from a malaria-causing parasite; and
- an adjuvated proteinaceous antigen;

wherein said recombinant adenovirus is selected from the group consisting of human adenovirus serotype 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 and 50, and wherein said replication-defective recombinant adenovirus is a priming composition and said adjuvated proteinaceous antigen is a boosting composition.

2. A kit of parts according to claim 1, wherein said recombinant adenovirus is human adenovirus serotype 35.

3. A kit of parts according to claim 1 or 2, wherein said proteinaceous antigen comprises a CS protein, or an immunogenic fragment thereof, from a malaria-causing parasite.

4. A kit of parts according to claim 3, wherein said proteinaceous antigen comprises a hybrid protein of CS protein or an immunogenic fragment thereof fused to the surface antigen from hepatitis B virus (HBsAg), in the form of lipoprotein particles with HBsAg.

5. A kit of parts according to claim 4 wherein the proteinaceous antigen comprises RTS,S.

6. A kit of parts according to any one of claims 1-5, wherein said proteinaceous antigen is adjuvated with an adjuvant comprising QS21 and 3D-MPL.

7. A kit of parts according to claim 6, wherein the adjuvant further comprises cholesterol-containing liposomes.

8. A kit of parts according to any one of claims 1-7, wherein said malaria-causing parasite is *Plasmodium falciparum*.

received at the EPO on Jul 27, 2006 14:21:17. Fax: AMENDED SHEET

Date: July 27, 2006  
Our ref.: 0116 WO 00 ORD  
Page: 4

60

9. A kit of parts according to any one of claims 1-8, wherein said heterologous nucleic acid is codon-optimized for increased production of the encoded protein in a mammal, preferably a human.
10. A kit of parts according to any one of claims 1-9, wherein said recombinant adenovirus is present in a mixture with an adjuvant.
11. A kit of parts comprising:
  - a replication-defective recombinant simian, canine or bovine adenovirus in a pharmaceutically acceptable excipient, said adenovirus comprising a heterologous nucleic acid encoding a codon-optimized circumsporozoite (CS) antigen from *Plasmodium falciparum*; and
  - an adjuvated proteinaceous antigen comprising RTS,S;wherein said replication-defective recombinant adenovirus is a priming composition and said adjuvated proteinaceous antigen is a boosting composition..
12. A kit of parts according to claim 11, wherein said proteinaceous antigen is adjuvated with an adjuvant comprising QS21 and 3D-MPL.
13. A kit of parts according to claim 12, wherein the adjuvant further comprises cholesterol-containing liposomes.
14. Use of a replication-defective recombinant adenovirus comprising a heterologous nucleic acid encoding a CS antigen from a malaria-causing parasite, and an adjuvated proteinaceous antigen in the manufacture of a medicament for the treatment or prevention of malaria, wherein said recombinant adenovirus is a simian, a canine, a bovine adenovirus or a human adenovirus serotype 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 or 50, and wherein said replication-defective recombinant adenovirus is used as a priming composition and said adjuvated proteinaceous antigen is used as a boosting composition.
15. Use according to claim 14, wherein said proteinaceous antigen comprises a CS protein, or an immunogenic fragment thereof, from a malaria-causing parasite.
16. Use according to claim 14 or 15, wherein said malaria-causing parasite is *Plasmodium falciparum*.

Date: July 27, 2006  
Our ref.: 0116 WO 00 ORD  
Page: 5

17. Use according to any one of claims 14-16, wherein said proteinaceous antigen comprises a hybrid protein of CS protein or an immunogenic fragment thereof fused to the surface antigen from hepatitis B virus (HBsAg), in the form of lipoprotein particles with HBsAg.
18. Use according to claim 17, wherein said adjuvated proteinaceous antigen comprises RTS,S.
19. Use according to any one of claims 14-18, wherein said proteinaceous antigen is adjuvated with QS21 and 3D-MPL.
20. Use according to any one of claims 14-19, wherein said heterologous nucleic acid is codon-optimized for increased production of the encoded protein in a mammal, preferably a human.
21. A method of vaccinating a mammal for a malaria infection comprising the steps of:
  - priming said mammal with a replication-defective recombinant adenovirus in a pharmaceutically acceptable excipient, said adenovirus comprising a heterologous nucleic acid encoding a CS antigen from a malaria-causing parasite; and
  - boosting said mammal with an adjuvated proteinaceous antigen comprising a hybrid protein of CS protein or an immunogenic fragment thereof fused to the surface antigen from hepatitis B virus (HBsAg), in the form of lipoprotein particles with HBsAg.
22. A method according to claim 21, wherein said proteinaceous antigen comprises RTS,S.
23. A method according to claim 21 or 23, wherein said recombinant adenovirus is a human, a simian, a canine or a bovine adenovirus.
24. A method according to claim 23, wherein said recombinant adenovirus is a human adenovirus selected from the group consisting of human adenovirus serotype 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 and 50.
25. A method according to any one of claims 21-24, wherein said proteinaceous antigen is adjuvated with QS21 and 3D-MPL.

27-07-2006

Date: July 27, 2006  
Our ref.: 0116 WO 00 ORD  
Page: 6

EP2005055209

62

26. A method according to any one of claims 21-25, wherein said malaria-causing parasite is *Plasmodium falciparum*.
27. A method according to any one of claims 21-26, wherein said heterologous nucleic acid is codon-optimized for increased production of the encoded protein in a mammal, preferably a human.
28. A method of vaccinating a mammal for a malaria infection using a kit of parts according to any one of claims 1-13.
29. A method of vaccinating a mammal according to claim 28, wherein the boost is followed by one or more subsequent boosts.

## **ANEXO EXPLICATIVO DE MODIFICACIONES A LAS REIVINDICACIONES**

En ejercicio del derecho conferido por el Artículo 28 numeral 1 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes PCT, atentamente me permito informar a ese Despacho que el capítulo reivindicatorio tal como fue presentado originalmente en Fase Internacional ha sido modificado.

Las modificaciones realizadas se encuentran plenamente sustentadas en la descripción de la presente invención y en este sentido, no configuran una ampliación del invento o de la divulgación contenida en la solicitud presentada.

VACUNAS DE CEBADO/REFUERZO CONTRA EL PALUDISMO

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La invención se refiere a nuevos regímenes de  
5 vacunación en los cuales se aplican regímenes específicos de  
cebado/refuerzo usando vectores adenovirales recombinantes de  
baja neutralización que portan ácidos nucleicos que codifican  
para antígenos de *Plasmodium falciparum* y vacunas de  
proteínas recombinantes purificadas tales como RTS,S, en el  
10 contexto de adyuvantes adecuados.

15

20

25

## VACUNAS DE CEBADO/REFUERZO CONTRA EL PALUDISMO

### Campo de la invención

La invención se refiere al campo de la medicina. Específicamente, la invención se refiere a nuevas estrategias  
5 de vacunas de cebado/refuerzo usando vectores adenovirales producidos de manera recombinante y proteínas purificadas en el contexto de un adyuvante para la prevención del paludismo causado por *P. falciparum*.

### Antecedentes de la invención

10 El paludismo representa actualmente una de las infecciones más frecuentes en áreas tropicales y subtropicales a lo largo del mundo. Al año, las infecciones por paludismo matan hasta 2.7 millones de personas en países en desarrollo y emergentes. La ocurrencia ampliamente  
15 difundida e incidencia elevada del paludismo son una consecuencia de los números cada vez más altos de parásitos resistentes a fármacos y vectores parásitos resistentes a insecticidas. Otros factores incluyen cambios ambientales y climáticos, revueltas civiles y movilidad incrementada de  
20 poblaciones.

El paludismo es causado por parásitos hematoprotzoarios originados en mosquitos que pertenecen al género *Plasmodium*. Cuatro especies de protozoarios de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*)  
25 son responsables de la enfermedad en el hombre; muchos otros

REF.: 180895

causan enfermedad en animales, tales como *P. yoelii* y *P. berghei*. *P. falciparum* tiene que ver con la mayoría de las infecciones en humanos y es el tipo más letal. Los parásitos del paludismo tienen un ciclo de vida que consiste en cuatro etapas separadas. Cada una de estas etapas es capaz de inducir respuestas inmunes específicas dirigidas contra el parásito y los antígenos específicos de etapa que ocurren de manera correspondiente, pero el paludismo inducido naturalmente no protege contra reinfección.

10 Los parásitos del paludismo son transmitidos al hombre por varias especies de mosquitos *Anopheles* hembra. Los mosquitos infectados inyectan la forma esporozoita del parásito del paludismo en el torrente sanguíneo de los mamíferos. Los esporozoitos permanecen durante pocos minutos en la circulación antes de invadir hepatocitos. En esta etapa el parásito se localiza en el ambiente extracelular y está expuesto al ataque de anticuerpos, dirigidos principalmente a la proteína circumsporozoito (CS), un gran componente de la superficie de los esporozoitos. Una vez en el hígado, el parásito se replica y se desarrolla para crear un schizonte. Durante esta etapa, el parásito invasor sufrirá multiplicación asexual, produciendo hasta 20,000 merozoitos hijos por célula infectada. Durante esta etapa intracelular del parásito, los principales actores de la respuesta inmunológica del huésped son los linfocitos T,

25

especialmente linfocitos T CD8+ (Romero et al. 1989). Después de aproximadamente una semana de infección en el hígado, miles de merozoitos son liberados en el torrente sanguíneo y entran en los glóbulos rojos (RBC's), volviéndose  
5 objetivos de la respuesta inmunológica mediada por anticuerpos y citocinas secretadas por células T. Luego de invadir los eritrocitos, los merozoitos sufren varias etapas de replicación, transformándose en trofozoitos, y schizontes, los cuales se rompen para producir una nueva generación de  
10 merozoitos que posteriormente infectan nuevos glóbulos rojos. La etapa eritrocítica está asociada con enfermedad clínica declarada. Un número más pequeño de trofozoitos pueden desarrollarse en gametocitos macho o hembra, las cuales son la etapa sexual del parásito. Cuando los mosquitos  
15 susceptibles ingieren gametocitos, la fertilización de estos gametos lleva a la formación de cigotos y a su posterior transformación en oocinetes, después en oocistos y finalmente en esporozoitos, los cuales migran a las glándulas salivares para completar el ciclo.

20 Los dos principales brazos de la respuesta inmunológica específica de patógenos que ocurren luego de la entrada del parásito en el cuerpo son celulares y humorales. Un brazo, la respuesta celular, se refiere a células T CD8+ y CD4+ que participan en la respuesta inmune. Los linfocitos T  
25 citotóxicos (CTL's, por sus siglas en inglés) expresan CD8 y

son capaces de matar específicamente células infectadas que expresan antígenos patógenos sobre su superficie. Las células T CD4+ o células T auxiliares soportan el desarrollo de CTL's, producen varias citocinas y también ayudan a  
5 inducir células B al dividirse y producir anticuerpos específicos para los antígenos. Durante la respuesta humoral, las células B específicas para un antígeno particular son activadas, se replican, diferencian y producen anticuerpos específicos de antígenos.

10           Ambos brazos de la respuesta inmunológica son relevantes para la protección contra una infección palúdica. Cuando los esporozoitos infecciosos viajan al hígado y entran en los hepatocitos, los esporozoitos se vuelven patógenos intracelulares, pasando muy poco tiempo fuera de las células  
15 infectadas. En esta etapa, las células T CD8+ y células T CD4+ son especialmente importantes toda vez que estas células T y sus productos citocinas, tales como interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), contribuyen a la eliminación de hepatocitos huésped infectados. Se ha encontrado que la eliminación de los  
20 parásitos hepáticos intracelulares en el modelo de paludismo en murino depende de respuestas de células T CD8+ dirigidas contra péptidos expresados por parásitos en etapa hepática (Hoffman y Doolan, 2000). El agotamiento de células T CD8+ abroga la protección contra el ataque por esporozoitos, y la  
25 transferencia adoptiva de células T CD8+ animales naives

confiere protección.

Cuando una infección palúdica alcanza la etapa eritrocítica en la cual los merozoitos se replican en glóbulos rojos, los merozoitos se encuentran también  
5 circulando libremente en el torrente sanguíneo. Debido a que el eritrocito no expresa moléculas MHC clase I o II requeridas para la interacción cognada con células T, se cree que las respuestas a anticuerpo son más relevantes en esta etapa. En conclusión, un posible enfoque de vacuna contra el  
10 paludismo sería muy benéfico si pudiera inducir una fuerte respuesta inmune celular así como una fuerte respuesta inmune humoral para atacar las diferentes etapas en las cuales el parásito ocurre en el cuerpo humano.

Los enfoques actuales en el desarrollo de vacunas  
15 contra el paludismo pueden clasificarse de acuerdo con diferentes etapas de desarrollo del parásito, como las descritas arriba. Tres tipos de vacunas posibles pueden distinguirse:

- Vacunas pre-eritrocíticas, las cuales están  
20 dirigidas contra esporozoitos y/o hepatocitos infectados por schizontes. Históricamente, este enfoque ha sido dominado por estrategias a base de (CS). Ya que la fase de infección pre-eritrocítica es asintomática, una vacuna pre-eritrocítica idealmente debería conferir inmunidad estéril, mediada por  
25 una respuesta inmune humoral y celular, y prevenir

completamente una infección de paludismo latente.

- Vacunas de etapa sanguínea asexual, las cuales están dirigidas contra ya sea el glóbulo rojo infectado o el propio merozoito, son diseñadas para minimizar la severidad  
5 clínica. Estas vacunas pueden reducir la morbilidad y mortalidad e intentan prevenir que el parásito ingrese y/o se desarrolle en los eritrocitos.

- Vacunas de bloqueo de transmisión, las cuales están diseñadas para dificultar el desarrollo del parásito en  
10 el huésped mosquito. Este tipo de vacuna debería favorecer la reducción de los índices de infección de paludismo de amplias poblaciones.

Finalmente, la viabilidad de desarrollar vacunas contra el paludismo en combinación que se enfoquen en varias  
15 etapas del ciclo de vida del parásito se está buscando en las llamadas vacunas de varios componentes y/o varias etapas.

Actualmente ninguna vacuna disponible comercialmente contra el paludismo está disponible, aunque el desarrollo de las vacunas contra el paludismo fue iniciado  
20 hace más de 30 años. La inmunización de roedores, primates no humanos y humanos con esporozoitos atenuados por radiación confirió protección contra un ataque subsecuente con esporozoitos viables (Nussenzweig et al. 1967; Clyde et al. 1973). Sin embargo, hasta el momento el costo y la falta de  
25 un sistema de cultivo a gran escala viable para la producción

de esporozoitos irradiados ha evitado la aplicación ampliamente difundida de estas vacunas (Luke et al. 2003).

Hasta la fecha los candidatos a vacunas más promisorios probados en humanos se han basado en un número 5 pequeño de antígenos de superficie de esporozoitos. La proteína CS es el único antígeno de *P. falciparum* que demostró prevenir de manera consistente el paludismo cuando se usó como la base de inmunización activa en humanos contra infección causada por mosquitos, aunque a niveles que 10 comúnmente son insuficientes. Análisis teórico ha indicado que la cobertura de la vacuna así como la eficiencia de la misma debe ser de más del 85%, o de otra manera mutantes que sean más virulentos pueden escapar en áreas endémicas (Gandon et al. 2001).

15 Una forma de inducir una respuesta inmune en un mamífero es mediante la administración en un vector infeccioso, el cual porta un ácido nucleico que codifica para el antígeno en su genoma. Uno de estos vehículos es un adenovirus recombinante, el cual se ha hecho de replicación 20 defectuosa mediante la remoción de regiones dentro del genoma que normalmente son esenciales para la replicación, tales como la región E1. Ejemplos de adenovirus recombinantes que comprenden genes que codifican para antígenos se conocen en la técnica (WO 96/39178). Por ejemplo, los componentes 25 antigénicos derivados de VIH han demostrado producir una

respuesta inmune si son suministrados mediante adenovirus recombinantes (WO 10/02607; WO 02/22080; US 6,733,993). En el paludismo, se han desarrollado vacunas a base de adenovirus recombinantes. Estos vectores expresan la  
5 proteína CS completa de *P. yoelii*, uno de los modelos de paludismo en ratón, y estos vectores han demostrado ser capaces de inducir inmunidad estéril en ratones en respuesta a una sola dosis de inmunización (Bruña-Romero et al. 2001). Se ha demostrado que las células T CD8+ median principalmente  
10 esta protección inducida por adenovirus.

Ya que un alto porcentaje de individuos tienen inmunidad preexistente contra los vectores adenovirales generalmente usados tales como el adenovirus serotipo 5 (Ad5), se desarrollaron nuevas tecnologías en la técnica, en  
15 las que adenovirus recombinantes defectuosos en replicación se basaron en serotipos que encontraron inmunidad preexistente en forma de anticuerpos neutralizantes sólo en un pequeño porcentaje de individuos saludables. Estos serotipos son generalmente conocidos como serotipos de baja  
20 neutralización, o serotipos raros. Se encontró que Ad11, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad48, Ad49 y Ad50 eran particularmente útiles (WO 00/70071; WO 02/40665; WO 2004/037294; WO 2004/083418; Vogels et al. 2003).

Una vacuna a base de ADN que contiene un plásmido  
25 que expresa la proteína CS de *P. falciparum* fue desarrollada

por Vical, Inc. San Diego, CA, E.U.A. y el Centro Naval de Investigación Médica (Horn et al. 1995). Estudios en un modelo de ratón demostraron inducción de CTL específica de antígeno y respuestas de anticuerpo luego de la inmunización  
5 con ADN plasmídico (Doolan et al. 1998). Sin embargo, hasta la fecha el único uso de vacunas de ADN ha probado ser menos que óptimo para la inducción de respuestas inmunes protectoras en humanos. Usando la vacuna de ADN se encontró que voluntarios vacunados no desarrollaron anticuerpos contra  
10 la proteína CS como se evalúa mediante una prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT) contra esporozoitos secados al aire y ELISA contra péptidos recombinantes y sintéticos (Wang et al. 2001), aunque sus respuestas a CTL fueron significativas.

15 En contraste, el enfoque de vacuna contra el paludismo RTS,S (proteína purificada) (Gordon et al. 1995; US 6,306,625; WO 93/10152) es capaz de inducir una robusta respuesta de anticuerpos a la proteína CS (Kester et al. 2001; Stoute et al. 1997 y 1998), mientras que también es un  
20 potente inductor de la inmunidad celular y humoral tipo Th1. Lo que es más importante, esta vacuna protege repetidamente a alrededor de la mitad de los receptores. Sin embargo, la protección desarrollada por RTS,S es de corta duración (Stoute et al. 1998). La inmunización con RTS,S induce  
25 anticuerpos anti-CS y respuestas IFN- $\gamma$  dependientes de

células T CD4+, pero deficientes respuestas CTL o IFN- $\gamma$  dependientes de células T CD8+ (Lalvani et al. 1999). Sin embargo, estas respuestas CD8+ mínimas que se producen han demostrado correlacionarse con la protección en pruebas en 5 humanos (Sun et al. 2003). Así, una mejora racional se enfocaría en el incremento de la inducción de respuestas de células T CD8+ a CS inducida por RTS,S.

El reto de desarrollar una vacuna contra paludismo por *P. falciparum* que tenga una eficacia protectora de al 10 menos 85% aún no ha sido satisfecho. La tarea es particularmente difícil toda vez que, a diferencia de otras enfermedades comúnmente fatales tales como sarampión o viruela, una exposición a paludismo anterior y el desarrollo de inmunidad natural no protege contra una infección de 15 paludismo subsecuente. De todos los candidatos a vacuna y las estrategias de suministro de vacunas probadas hasta la fecha, sólo RTS,S ha proporcionado de manera consistente cierto nivel de protección. Otros candidatos probados han sido ya sea inadecuadamente inmunogénicos, o inmunogénicos 20 pero inadecuadamente protectores. Esta solicitud describe una combinación estratégica de formulaciones de vacuna diseñadas para sacar ventaja de la inmunogenicidad serológica óptima del enfoque proteína/adjuvante junto con una excelente inducción de respuestas celulares proporcionadas por vectores 25 adenovirales recombinantes defectuosos en replicación.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1. Regímenes heterólogos de vacunación de  
cebado/refuerzo, seguidos al medir la respuesta de células T  
5 en análisis ELISPOT IFN- $\gamma$  relacionados con el C terminal de  
CS. La respuesta se midió dos semanas después del refuerzo  
final. Las barras horizontales representan medias  
geométricas.

Figura 2. Respuesta de células T medida en  
10 análisis IFN- $\gamma$  ELISPOT relacionadas con el C terminal de CS.  
La respuesta se midió tres meses después del refuerzo final.  
Las barras horizontales representan medias geométricas.

Figura 3. Respuesta de anticuerpo medida en un  
ELISA, relacionada con la región de repetición de CS, dos  
15 semanas después del refuerzo. Las barras horizontales  
representan medias geométricas.

Figura 4. Respuesta de anticuerpo medida en ELISA,  
relacionada con la región de repetición de CS, tres meses  
después del refuerzo. Las barras horizontales representan  
20 medias geométricas.

Figura 5. Respuesta de células T, en experimentos  
de cebado con un vector Ad35-CS recombinante y refuerzo con  
RTS,S o Ad35-CS, medida mediante IFN- $\gamma$  ELISPOT después de dos  
semanas (izquierda) o después de tres meses (derecha). El  
25 régimen homólogo cebado/refuerzo/refuerzo RTS,S/RTS,S/RTS,S

se usó como una referencia.

Figura 6. Respuesta de anticuerpo, en experimentos de cebado con un vector Ad35-CS recombinante y reforzando con RTS,S o Ad35-CS, medida por ELISA después de dos semanas (izquierda) o después de tres meses (derecha). El régimen homólogo cebado/refuerzo/refuerzo RTS,S/RTS,S/RTS,S se usó como una referencia.

Figura 7. Respuesta de células.T, en experimentos de refuerzo con un vector Ad35-CS recombinante y cebando con RTS,S o Ad5-CS, medida después de dos semanas (izquierda) o después de tres meses (derecha). El régimen homólogo cebado/refuerzo/refuerzo RTS,S/RTS,S/RTS,S se usó como una referencia.

Figura 8. Respuesta de anticuerpo, en experimentos de refuerzo con un vector Ad35-CS recombinante y cebando con RTS,S o Ad5-CS, medida después de dos semanas (izquierda) o después de tres meses (derecha). Se usó como una referencia el régimen homólogo cebado/refuerzo/refuerzo RTS,S/RTS,S/RTS,S.

Figura 9. Respuesta de células T medida en análisis IFN- $\gamma$  ELISPOT relacionada con el N terminal N de CS, dos semanas después del refuerzo. Las barras horizontales representan medias geométricas.

Figura 10. Respuesta de células T medida en análisis IFN- $\gamma$  ELISPOT relacionada con el N terminal de CS,

tres veces después de refuerzo. Las barras horizontales representan medias geométricas.

Figura 11. Respuesta de células T en el N terminal, en experimentos cebando con un vector Ad35-CS recombina-  
5 te y reforzando con RTS,S o Ad35-CS, medida después de dos semanas (izquierda) o después de tres meses (derecha). Se usó el régimen homólogo cebado/refuerzo/refuerzo (RTS,S/RTS,S/RTS,S como una referencia.

Figura 12. Respuesta de células T en el N terminal, en experimentos de refuerzo con un vector Ad35-CS recombina-  
10 te y cebando con RTS,S o Ad5-CS, medida después de dos semanas (izquierda) o después de tres meses (derecha). Se usó el régimen homólogo cebado/refuerzo/refuerzo RTS,S (RTS,S/RTS,S como una referencia.

15 **Breve descripción de la invención**

La invención se refiere a un kit de partes que comprende un adenovirus recombinante de replicación defectuosa en un excipiente adecuado, el adenovirus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica para un antígeno de  
20 circumsporozoito (CS) de un parásito causante de paludismo; y un antígeno proteináceo adyuvado, de preferencia también de un parásito causante de paludismo; en donde el adenovirus recombinante se selecciona del grupo que consiste en adenovirus humano serotipo 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 y 50.  
25 Un antígeno proteináceo que se prefiere comprende RTS,S. El

parásito causante de paludismo que se prefiere es *Plasmodium falciparum*.

En otra modalidad la invención se refiere también al uso de un adenovirus recombinante de replicación defectuosa que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica para un antígeno CS de un parásito causante de paludismo, y un antígeno proteínáceo adyuvado, de preferencia de un parásito causante de paludismo tal como *Plasmodium falciparum*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de paludismo, en donde el adenovirus recombinante es un adenovirus simiano o un adenovirus humano serotipo 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 ó 50.

La invención describe ciertos regímenes cebado-refuerzo preferidos, en donde se prefiere que el adenovirus recombinante de replicación defectuosa se use como una composición cebadora y el antígeno proteínáceo adyuvado se use como una composición de refuerzo.

La invención se refiere también a un método para vacunar un mamífero contra una infección de paludismo, que comprende las etapas de cebar al mamífero con un adenovirus recombinante de replicación defectuosa en un excipiente adecuado, el adenovirus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica para un antígeno CS de un parásito causante del paludismo; y reforzar al mamífero con un antígeno proteínáceo adyuvado, de preferencia RTS,S.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a un kit de partes que comprende un adenovirus recombinante de replicación defectuosa en un excipiente farmacéuticamente aceptable, el  
5 adenovirus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica para un antígeno de circunsporozoito (CS) de un parásito causante de paludismo; y un antígeno proteínico adyuvado; en donde el adenovirus recombinante se selecciona del grupo que consiste en adenovirus humano serotipo 11, 24,  
10 26, 34, 35, 48, 49 y 50. De preferencia, el adenovirus recombinante es adenovirus humano serotipo 35. Se prefiere también un kit de acuerdo con la invención en el que el antígeno proteínico comprende una proteína CS, o un fragmento inmunogénico de la misma, de un parásito causante  
15 de paludismo. El antígeno proteínico comprende de preferencia una proteína híbrida de proteína CS o un fragmento inmunogénico de la misma fusionado al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), en forma de partículas de lipoproteína con HBsAg. En una modalidad  
20 preferida más, el antígeno proteínico comprende RTS,S. Se prefiere también que el antígeno proteínico sea adyuvado con QS21 y 3D-MPL, de preferencia en una formulación con liposomas que contengan colesterol.

Aunque se sabe en la técnica que diferentes  
25 parásitos causan paludismo en humanos, una modalidad de la

presente invención es un kit de partes de acuerdo con la invención, en el que el parásito causante de paludismo es *Plasmodium falciparum*.

Para respuestas inmunes adecuadas se prefiere que  
5 el ácido nucleico heterólogo sea optimizado en codones para una producción incrementada de la proteína codificada en un mamífero, de preferencia un humano. El adenovirus recombinante puede estar presente en una mezcla con un adyuvante.

10 La aplicabilidad de adenovirus simios para usarse en terapia génica humana o vacunas es bien apreciada por aquellos de capacidad ordinaria en la técnica. Aparte de esto, se encontró que otros adenovirus no humanos tales como adenovirus caninos y bovinos infectaban células humanas *in*  
15 *vitro* y son por lo tanto también aplicables para uso humano ya que su seroprevalencia es baja en muestras humanas. Así, la invención se refiere también a un kit de partes que comprende un adenovirus simio, canino o bovino recombinante y de replicación defectuosa en un excipiente farmacéuticamente  
20 aceptable, el adenovirus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica para un antígeno de circumsporozoito (CS) de *Plasmodium falciparum* optimizado en codones; y un antígeno proteinácec adyuvado que comprende RTS,S, en donde se prefiere que el antígeno proteináceo sea adyuvado con QS21  
25 y 3D-MPL, de preferencia en una formulación con liposomas que

contengan colesterol.

La presente invención describe que ciertos regímenes de cebado-refuerzo proporcionan un resultado inesperado y sorprendente con respecto a respuestas inmunes si los diferentes componentes del kit de partes descrito se administran en cierto orden. Así, la invención se refiere también a un kit de partes de acuerdo con la invención, en el que el adenovirus recombinante de replicación defectuosa es una composición cebadora y el antígeno proteínáceo adyuvado es una composición de refuerzo. La respuesta inmune desencadenada por una sola administración (cebado) de una vacuna comúnmente no es lo suficientemente potente y/o persistente como para proporcionar una protección efectiva. La administración repetida (refuerzo) puede incrementar de manera significativa respuestas humorales y celulares a antígenos de vacuna (por ejemplo, véase Estcourt et al. 2002).

La invención se refiere también al uso de un adenovirus recombinante de replicación defectuosa que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica para un antígeno CS de un parásito causante de paludismo, y un antígeno proteínáceo adyuvado, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de paludismo, en donde el adenovirus recombinante es un adenovirus simio, canino o bovino, o un adenovirus humano serotipo 11, 24, 26,

34, 35, 48, 49 ó 50, en donde se prefiere que el adenovirus recombinante de replicación defectuosa se use como una composición cebadora y el antígeno proteínáceo adyuvado se use como una composición de refuerzo. De acuerdo con una 5 modalidad de la invención, se refiere a un uso de acuerdo con la invención, en el que el antígeno proteínáceo comprende una proteína CS, o un fragmento inmunogénico de la misma, de un parásito causante de paludismo, de preferencia *Plasmodium falciparum*. El antígeno proteínáceo comprende de preferencia 10 una proteína híbrida de proteína CS o un fragmento inmunogénico de la misma fusionado al antígeno superficial del virus de la hepatitis B (HBsAg), en forma de partículas de lipoproteína con HBsAg. RTS,S es un antígeno proteínáceo adyuvado que se prefiere, aunque un adyuvante que se prefiere 15 es QS21 y 3D-MPL, de preferencia en una formulación con liposomas que contengan colesterol.

Para una expresión óptima seguida por respuesta inmune óptima en mamíferos, de preferencia humanos, el ácido nucleico heterólogo usado en la presente invención es 20 optimizado en codones para una producción incrementada de la proteína codificada en un mamífero, de preferencia un humano.

En otra modalidad más, la presente invención se refiere a un método para vacunar un mamífero contra una infección de paludismo, que comprende las etapas de cebar al 25 animal con un adenovirus recombinante de replicación

defectuosa en un excipiente farmacéuticamente aceptable, el adenovirus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica para un antígeno CS de un parásito causante de paludismo, y reforzar al mamífero con un antígeno proteínáceo  
5 adyuvado que comprenda una proteína híbrida de proteína CS o un fragmento inmunogénico de la misma fusionado a HBsAg, en forma de partículas de lipoproteína con HBsAg. El antígeno proteínáceo comprende de preferencia RTS,S, en donde el adyuvante que se prefiere es QS21 y 3D-MPL, de preferencia en  
10 una formulación con liposomas que contengan colesterol, mientras que el parásito causante del paludismo que se prefiere es *Plasmodium falciparum*.

Los adenovirus preferidos que se usan para producir adenovirus recombinantes y usados en los métodos de la  
15 presente invención pueden ser adenovirus humanos o no humanos tales como adenovirus simios, caninos y bovinos, toda vez que se prefiere altamente usar adenovirus que no encuentren inmunidad preexistente en el huésped (humano) al cual se vaya a administrar el virus recombinante. Los adenovirus simios y  
20 ciertos serotipos de adenovirus humanos son altamente adecuados para esto, como se describe en la presente. Los adenovirus humanos que se prefieren que se usan para los métodos, usos y kit de partes de acuerdo con la invención son los adenovirus humanos serotipos 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 y  
25 50.

La invención se refiere también a un método para vacunar un mamífero contra una infección de paludismo usando un kit de partes de acuerdo con la invención. Si se usa un kit de partes de acuerdo con la invención para vacunar un  
5 mamífero contra una infección de paludismo usando un régimen de cebado-refuerzo preferido como el descrito en la presente, el refuerzo es seguido preferiblemente por uno o más refuerzos subsecuentes.

La presente invención se refiere al uso de  
10 adenovirus recombinantes como un vehículo de al menos un antígeno de paludismo y usados en combinación heteróloga con una proteína adyuvada en un régimen de cebado/refuerzo. Se ha encontrado sorprendentemente que la combinación de un vector viral y una proteína adyuvada en un régimen heterólogo  
15 de cebado/refuerzo proporciona una respuesta inmune superior en primates en términos de respuestas de células T iniciales y longevidad de las respuestas inmunes. En particular, se ha encontrado que cebar un mamífero con un vector viral que porte un ácido nucleico que codifique para un antígeno  
20 seguido por un refuerzo subsecuente, ya sea mediante una inyección individual o múltiple de antígeno proteínico adyuvado, proporciona resultados superiores en términos de respuestas inmunes cualitativas y/o cuantitativas. Los vectores virales que se prefieren son vectores adenovirales,  
25 muy preferiblemente vectores adenovirales humanos, y todavía

más preferiblemente vectores adenovirales humanos que encuentran bajos niveles de actividad neutralizante en el huésped mamífero al cual son administrados. Los serotipos altamente preferidos son los adenovirus 11, 24, 26, 34, 35, 5 48, 49 y 50.

De acuerdo con una modalidad preferida, el antígeno proteináceo y el antígeno codificado por el vector viral son antígenos de paludismo, muy preferiblemente la proteína circumsporozoito (CS) de *Plasmodium falciparum*, o derivados 10 inmunogénicos y/o fragmentos de la misma. Como un ejemplo de este concepto, el polipéptido codificado por el vector viral comprende el ácido nucleico que codifica para la proteína CS de *P. falciparum*, incluyendo la parte N-terminal, la región de repetición de la parte central y la parte C-terminal (con 15 una supresión de los 14 aminoácidos más C-terminales: la secuencia de ancla GPI), mientras que el antígeno proteináceo comprende la construcción RTS,S, la cual carece de la región N-terminal.

El antígeno proteináceo adyuvado para usarse en 20 cualquiera o todos los aspectos de la invención puede comprender la proteína CS de *P. falciparum*, o un fragmento inmunogénico de la misma, la cual puede estar en forma de una proteína de fusión. Por ejemplo, el antígeno puede comprender una proteína híbrida de la proteína CS o un 25 fragmento inmunogénico fusionado al antígeno superficial del

virus de la hepatitis B (HBsAg), proteína híbrida que puede ser expresada en células huésped procarióticas o eucarióticas y puede tener la forma de partículas de lipoproteína. La proteína de fusión puede comprender por ejemplo  
5 sustancialmente toda la porción C-terminal de la proteína CS, cuatro o más repeticiones tándem de la región inmunodominante, y el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg). Por ejemplo, la proteína híbrida que comprende una secuencia que contiene al menos 160 aminoácidos  
10 que es sustancialmente homóloga a la porción C-terminal de la proteína CS y puede estar libre de los aminoácidos finales del C terminal de la proteína CS, por ejemplo los últimos 10 a 12 aminoácidos. La proteína híbrida puede estar en forma de partículas de lipoproteína mezcladas, por ejemplo con  
15 HBsAg.

En particular, se proporciona una proteína híbrida como la descrita en WO 93/10152, designada ahí "RTS\*" pero referida en la presente como "RTS", la cual puede estar en forma de partículas de lipoproteína mezcladas con HBsAg, designada en  
20 la presente RTS,S. La relación de proteína híbrida:antígeno S en estas partículas mixtas es por ejemplo de 1:4.

La proteína híbrida designada "RTS" en la presente se generó usando la secuencia génica de la proteína CS de *P. falciparum* NF54 (Clone 3D7; Caspers et al. 1989) y que  
25 comprende sustancialmente la región completa 207 a 395 de la

proteína CS de *P. falciparum* NF54. La porción de la secuencia de proteínas CS NF54 (3D7) que está incluida en RTS es la siguiente secuencia de 189 aminoácidos:

DPNANPNANP    NANPNANPNA    NPNANPNANP    NANPNANPNA    NPNANPNANP  
5    NANPNANPNA    NPNANPNANP    NANPNKNNQG    NGQGHNMPND    PNRNVDENAN  
ANSAVKNNNN    EEP SDKHKE    YLNKIQNSLS    TEWSPCSVTC    GNGIQVRIKP  
GSANKPKDEL DYANKIEKKI CKMEKCSSVF NVVNSSIGL (SEQ ID NO: 1).

En particular, RTS es:

• Un residuo de metionina codificado por los  
10    nucleótidos 1059-1061 derivado de la secuencia génica TDH3 de *Sacchromyces cerevisiae* (los nucleótidos 1-1058 en este marco de lectura constituyen el propio promotor TDH3). (Musti et al. 1983).

• Tres aminoácidos: Met, Ala, Pro, derivados de una  
15    secuencia de nucleótidos (1062-1070) creada por el procedimiento de clonación usado para construir el gen híbrido).

• Un tramo de 189 aminoácidos (dado arriba, SEQ ID NO:1) codificado por 1071-1637 aminoácidos representantes 207  
20    a 395 de la proteína CS de la cepa NF54 de *P. falciparum* (clon 3D7; Caspers et al. 1989).

• Un aminoácido (Gly) codificado por nucleótidos 1638 a 1640, creado por el procedimiento de clonación usado para construir el gen híbrido.

25    • Cuatro aminoácidos, Pro, Val, Thr, Asn,

codificados por los nucleótidos 1641 a 1652, y que representan los cuatro residuos carboxi terminales de la proteína preS2 del virus de la hepatitis B (serotipo adw) (Valenzuela et al. 1979).

- 5           • Un tramo de 226 aminoácidos, codificado por los nucleótidos 1653 a 2330, y que especifica la proteína S del virus de la hepatitis B (serotipo adw) (Valenzuela et al. 1979).

RTS puede estar en forma de partículas mixtas,  
10 RTS,S, en donde la relación de RTS:S es por ejemplo de 1:4.

Aunque la invención por ningún motivo está limitada a antígenos palúdicos, la invención se explicará en gran detalle usando vectores virales que codifican para un antígeno palúdico en combinación con antígeno palúdico  
15 proteináceo adyuvado. Los expertos en la técnica serán capaces de modificar la enseñanza general provista en la presente usando diferentes insertos antigénicos y antígenos proteináceos correspondientes de otros agentes patógenos, incluyendo parásitos, bacterias, virus, levaduras o incluso  
20 auto-antígenos, incluyendo pero no limitados a, antígenos tumorales (por ejemplo, PSA, gp100, CEA, MUC1, Her2/neu) y similares.

La presente invención se refiere a un vector adenoviral recombinante de replicación defectuosa que  
25 comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga que

codifica para un antígeno de *Plasmodium falciparum*. En una modalidad preferida el vector viral es un adenovirus derivado de un serotipo seleccionado del grupo que consiste en: Ad11, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad48, Ad49 y Ad50. La razón para esta selección de adenovirus humanos es debido a que el uso de adenovirus en general como vectores de vacuna es típicamente dificultado por el hecho de que los humanos son infectados regularmente con adenovirus tipo silvestre, los cuales causan enfermedades leves o no aparentes como el resfriado común. Las respuestas inmunes desarrolladas durante esta infección con un serotipo tipo silvestre progenitor pueden impactar negativamente la eficacia del serotipo de adenovirus recombinante cuando se usen con un vector de vacunas recombinante subsecuente, tal como una vacuna contra el paludismo en la cual se apliquen adenovirus. La dispersión de los diferentes serotipos de adenovirus en la población mundial humana difiere de un área geográfica a otra. Generalmente, los serotipos preferidos encuentran una baja actividad neutralizante en huéspedes en la mayoría de las partes del mundo, como se detalla en varios reportes en la técnica.

Los inventores de la presente invención han hecho ahora una nueva combinación entre un adenovirus recombinante y una proteína purificada en un esquema de vacunación secuencial, conocido como cebado/refuerzo heterólogo, esquema

que hace uso de las diferentes respuestas inmunes inducidas por los diferentes componentes de vacuna de cebado/refuerzo. La elección del factor recombinante es influenciada por aquellos que encuentran actividad neutralizante en un bajo  
5 porcentaje de la población humana en necesidad de la vacunación. Sorprendentemente, la combinación de antígeno vectorizado por adenovirus y antígeno de proteína adyuvado proporciona una mejora significativa en respuestas inmunes sobre aquellas observadas usando cada vacuna sola. El  
10 incremento inmune se ilustra por la detección *in vitro* de respuestas inmunes dadas *in vivo* a macacos rhesus como las descritas en la presente.

En otra modalidad, el adenovirus recombinante de replicación defectuosa es un adenovirus simio, tal como  
15 aquellos aislados de chimpancés. Ejemplos que son adecuados incluyen C68 (también conocido como Pan 9; US 6,083,716) y Pan 5, 6 y 7 (WO 03/046124).

En un aspecto particular de la invención el vector viral recombinante de replicación defectuosa comprende una  
20 secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína CS, o una parte inmunogénica o fragmento de la misma. De preferencia, la secuencia de ácido nucleico heteróloga es optimizada en codones para una expresión elevada en un mamífero, de preferencia un humano. La optimización en  
25 codones se basa en el contenido de aminoácidos requerido, el

97

uso de codones óptimos general en el mamífero de interés y un número de aspectos que deben evitarse para asegurar una expresión adecuada. Estos aspectos pueden ser sitios de empalme de donador receptor, codones de detención, sitios Chi, tramos poly(A), secuencias ricas en GC y AT, cajas TATA internas, etc. Los métodos de optimización en codones para huéspedes mamíferos se conocen bien por la persona capacitada y pueden encontrarse en varios lugares en la literatura de biología molecular.

10           En una modalidad preferida, la invención se refiere a un vector adenoviral recombinante de replicación defectuosa de acuerdo con la invención, en el que el contenido de adenina más timina en el ácido nucleico heterólogo, en comparación con el contenido de citocina más guanina, es 15 menos del 87%, de preferencia menos de 80%, muy preferiblemente menos de 59% y más preferiblemente igual a alrededor de 45%. La invención proporciona, en una modalidad, un vector adenoviral recombinante de replicación defectuosa, en el que la proteína CS es cualquiera de las 20 proteínas CS como las descritas en WO 2004/055187, muy preferiblemente la proteína CS de *P. falciparum* o un fragmento inmunogénico de la misma.

La producción de vectores adenovirales recombinantes que portan genes heterólogos se conoce bien en 25 la técnica e implica típicamente el uso de una línea de

91

células de empaque, construcciones adaptadoras y cósmidos y la supresión de al menos una parte funcional de la región E1 del genoma adenoviral (véase también abajo para sistemas de empaque y líneas de células preferidas).

5           La invención se refiere también a kits que comprenden como componentes por un lado un vector adenoviral recombinante que encuentra baja actividad neutralizante en el huésped y por otro lado una proteína purificada, en donde se prefiere que la proteína purificada se proporcione en mezcla  
10 con un adyuvante. Un adyuvante que se prefiere es QS21 y 3D-MPL, de preferencia en una formulación con liposomas que contienen colesterol. Los componentes se usan en una estrategia de suministro de vacuna heteróloga cebado/refuerzo en la cual se prefiere administrar primero el vector  
15 adenoviral recombinante como un agente de cebado y después la proteína purificada como un agente de refuerzo, refuerzo que puede ser repetido más de una vez. Los componentes se mantienen típicamente en vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se  
20 conocen bien en la técnica y se usan extensamente en una amplia gama de productos terapéuticos. De preferencia, se aplican vehículos que funcionan bien en vacunas. Se prefieren más las vacunas que comprenden además un adyuvante. Se sabe en la técnica que los adyuvantes incrementan más la  
25 respuesta inmune a un antígeno aplicado. La invención se

refiere también al uso de un kit de acuerdo con la invención en el tratamiento terapéutico, profiláctico o diagnóstico del paludismo.

La presente invención se refiere a un método para  
5 tratar un mamífero para una infección de paludismo o para prevenir una infección de paludismo en un mamífero, el método comprende (en cada orden, o simultáneamente) las etapas de administrar un adenovirus recombinante que porta un antígeno de *P. falciparum*; y administrar al menos una proteína de *P.*  
10 *falciparum* purificada, la proteína está mezclada con un adyuvante. De preferencia el adenovirus recombinante se selecciona del grupo que consiste en Ad11, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad48, Ad49 y Ad50, aunque se prefiere también que el adenovirus recombinante porte el gen que codifica para la  
15 proteína CS, o un fragmento inmunogénico del mismo. La proteína purificada que se prefiere y se usa en combinación con el adenovirus recombinante es RTS,S, aunque un adyuvante que se prefiere es QS21 y 3D-MPL, de preferencia en una formulación con liposomas que contengan colesterol.

20 La fuerza impulsora detrás del desarrollo de la respuesta inmune es, las citocinas, un número de mensajeros proteínicos identificados que sirven para ayudar a las células del sistema inmunológico y dirigir la respuesta inmune eventual a una respuesta ya sea Th1 o Th2. Así, altos  
25 niveles de citocinas tipo th1 tienden a favorecer la

inducción de respuestas inmunes mediadas por células al antígeno dado, mientras que altos niveles de citocinas tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales a antígeno. Es importante recordar que la  
5 distinción de las respuestas inmunes tipo Th1 y Th2 no es absoluta. En realidad, un individuo soportará una respuesta inmune que se describa como siendo predominantemente Th1 o predominantemente Th2. Sin embargo, comúnmente es conveniente considerar las familias de citocinas en términos  
10 de aquellas descritas en clones de células T CD4+ de murino por Mosmann y Coiffman (1989). Tradicionalmente, las respuestas tipo Th1 están asociadas con la producción de las citocinas INF- $\gamma$  e IL-2 por linfocitos T. Otras citocinas comúnmente directamente asociadas con la inducción de  
15 respuestas inmunes tipo Th1 no son producidas por células T, tales como IL-12. En contraste, las respuestas tipo Th2 están asociadas con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ).

Los adyuvantes adecuados para usarse en la  
20 invención incluyen una sal aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio, pero también pueden ser una sal de calcio, hierro o zinc, o pueden ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos derivados catiónica o aniónicamente,  
25 polifosfacenos o liposomas de montanuro.

En la formulación de vacunas para usarse en la invención, en el contexto del vector de adenovirus, un adyuvante puede o no ser administrado. En el caso del componente proteínico de la combinación, la composición  
5 adyuvante puede seleccionarse para inducir una respuesta a Th1 preferencial. Más aún, también se pueden inducir otras respuestas, incluyendo otras respuestas humorales.

Ciertos adyuvantes de vacuna son particularmente adecuados para la estimulación de respuestas de citocinas ya  
10 sea tipo Th1 o Th2. Tradicionalmente, los mejores indicadores del equilibrio Th1:Th2 de la respuesta inmune después de una vacunación o infección incluye una medición directa de la producción de citocinas Th1 o Th2 por linfocitos T *in vitro* después de la re-estimulación con  
15 antígeno, y/o la medición de la relación IgG1:IgG2a de respuestas de anticuerpo específicas para antígenos. Así, un adyuvante tipo Th1 es uno que estimula poblaciones de células T aisladas a producir altos niveles de citocinas tipo Th1 cuando son re-estimuladas con antígeno *in vitro* e inducen  
20 respuestas de inmunoglobulina específicas de antígeno asociadas con el isotipo Th1. Por ejemplo, los inmunoestimulantes tipo Th1 que pueden formularse para producir adyuvantes adecuados para usarse en la presente invención pueden incluir lípido A de monofosforilo, en  
25 particular lípido A de monofosforilo 3-des-O-acilado (3D-

96

MPL). 3D-MPL es un adyuvante bien conocido fabricado por Ribi Immunochem, Montana. Químicamente es comúnmente suministrado como una mezcla del lípido A de monofosforilo 3-des-O-acilado con ya sea 4,5 ó 6 cadenas aciladas. Puede ser  
5 purificado y preparado mediante los métodos enseñados en GB 2122204B, referencia que también describe la preparación del lípido A de difosforilo, y variantes 3-O-desacetiladas de los mismos. Otros lipopolisacáridos purificados y sintéticos han sido descritos (patente de E.U.A. N6,005,099, EP 0729473 B1,  
10 EP 0549074 B1). En una modalidad, 3D-MPL está en forma de una formulación en partículas que tiene un pequeño tamaño de partícula de menos de 0.2  $\mu$ m de diámetro, y su método de fabricación se describe en EP 0689454.

Las saponinas son otro ejemplo de los  
15 inmuoestimulantes Th1 que pueden usarse con la invención. Las saponinas son adyuvantes bien conocidos. Por ejemplo, Quil A (derivado de la corteza del árbol Sudamericano *Quillaja Saponria* Molina), y sus fracciones del mismo, se describen en la patente de E.U.A. 5,057,540 y EP 0362279 B1.  
20 Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas por HPLC de Quil A) han sido descritas como potentes adyuvantes sistémicos, y el método de su preparación se describe en la patente de E.U.A. 5,057,540 y EP 0362279 B1. También se describe en estas referencias el uso de QS7 (una  
25 fracción no hemolítica de Quil-A), la cual actúa como un

96

potente adyuvante para vacunas sistémicas. Combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina también se conocen (WO 99/10008). Sistemas adyuvantes en partículas que comprenden fracciones de Qila, tales como QS21 y QS7 se describen en WO 5 96/33739 y WO 96/11711.

Otro ejemplo más de un inmunoestimulante es un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene dinucleótidos CpG no metilados ("CpG"). CpG es una abreviatura para motivos de dinucleótido de citocina/guanisina presentes en 10 ADN. CpG se conoce en la técnica como siendo un adyuvante cuando se administra tanto por rutas sistémicas como mucosas (WO 96/02555, EP 0468520). Históricamente, se observó que la fracción de ADN del bacilo de Calmette-Guerin (BCG) podría ejercer efecto anti-tumoral. En estudios adicionales, 15 oligonucleótidos sintéticos derivados de secuencias de genes de CG mostraron ser capaces de inducir efectos inmunoestimuladores (tanto *in vitro* como *in vivo*). Los autores de estos estudios concluyeron que ciertas secuencias palindrómicas, incluyendo un motivo CG central, portaban esta 20 actividad. Un análisis detallado ha demostrado que el motivo CG tienen que estar en cierto contexto de secuencia, y que estas secuencias son comunes en ADN bacteriano pero son raras en ADN de vertebrado. La secuencia inmunoestimuladores como: purifina, purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en donde el 25 motivo CG no está metilado, pero otra secuencia CPG se sabe

97

que son inmunoestimuladoras y pueden usarse en la presente invención.

En ciertas combinaciones de los seis nucleótidos, una secuencia palindrómica puede estar presente. Varios de  
5 estos motivos, ya sea como repeticiones de un motivo o una combinación de motivos diferentes, pueden estar presentes en el mismo oligonucleótido. La presencia de una o más de estas secuencias estimuladoras que contienen oligonucleótidos puede activar varios subconjuntos inmunes, incluyendo células  
10 asesinas naturales (las cuales producen interferón  $\gamma$  y tienen actividad citolítica) y macrófagos. Otras secuencias que contienen CPG no metilado que no tienen esta secuencia de consenso también han demostrado ser inmunomoduladoras. Cuando se formulan en vacunas, CpG se administra generalmente  
15 en solución libre junto con antígeno libre (WO 96/02555, 68) o conjugado covalentemente a un antígeno (WO 98/16247), o formulado con un vehículo tal como hidróxido de aluminio (antígeno de superficie de hepatitis).

Estos inmunoestimulantes como los descritos arriba  
20 pueden formularse junto con vehículos, tales como, por ejemplo, liposomas, emulsiones de aceite en agua y/o sales metálicas, incluyendo sales de aluminio (tales como hidróxido de aluminio). Por ejemplo, 3D-MPL puede formularse con hidróxido de aluminio (EP 689454) o emulsiones de aceite en  
25 agua (WO 95/17210); QS21 puede formularse adecuadamente con

liposomas que contengan colesterol (WO 96/33739), emulsiones de aceite en agua (WO 95/17210) o alumbre (WO 98/15287); CpG puede formularse con alumbre o con otros vehículos catiónicos.

5 También pueden usarse combinaciones de inmunoestimulantes, tales como una combinación de un lípido A de monofosforilo y un derivado de saponina (WO 94/00153; WO 95/17210; WO 96/33739; WO 98/56414; WO 98/05355; WO 99/12565; WO 99/11241) o una combinación de QS21 y 3D-MPL como la  
10 descrita en WO 94/00153. Como alternativa, también se puede usar en la presente invención una combinación de CpG más una saponina tal como QS21. Así, los sistemas adyuvantes adecuados incluyen, por ejemplo, una combinación de lípido A de monofosforilo, tal como 3D-MPL, junto con una sal  
15 aluminio. Otra modalidad combina un lípido A de monofosforilo y un derivado de saponina, tal como la combinación de QS21 y 3D-MPL como la descrita en WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en donde QS21 es extinguido en liposomas que contienen colesterol (DQ como la  
20 descrita en WO 96/33739. Otra formulación adyuvante más que incluye QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en WO 95/17210. En otra modalidad, se usan oligonucleótidos CpG solos o junto con una sal aluminio.

Un adyuvante adecuado para usarse en la presente  
25 invención es un adyuvante estimulador Th1 preferente, por

ejemplo un adyuvante que comprende una saponina tal como QS21 o un derivado de lípido A de monofosforilo tal como 3D-MPL, o un adyuvante que comprende ambos de estos opcionalmente junto con liposomas que contienen colesterol. Una combinación de  
5 QS21 y 3D-MPL en una formulación de liposomas que contiene colesterol se describe por ejemplo en WO 96/33739.

Las ventajas de la presente invención son múltiples. Virus recombinantes, tales como adenovirus recombinantes, pueden producirse a muy altos títulos usando  
10 células que se consideren seguras, y que pueden crecer en suspensión a niveles muy altos, usando medio que no contenga ningún componente derivado de animales o humanos. Asimismo, se sabe que los adenovirus recombinantes desarrollan una dramática respuesta inmune contra la proteína codificada por  
15 la secuencia de ácido nucleico heteróloga en el genoma adenoviral. La presente invención combina estas características en un vector que porta el gen de circumsporozoito de *P. falciparum* con el uso de proteína adyuvada para reforzar respuestas. Más aún, el gen ha sido  
20 optimizado en codones para dar un nivel de expresión que sea adecuado para dar una adecuada respuesta inmune en humanos. La presente invención proporciona vacuna contra infecciones de paludismo, haciendo uso de adenovirus que no encuentran altos títulos de anticuerpos neutralizantes. Los adenovirus  
25 altamente preferidos para este propósito son serotipo 11 y 35

(Ad11 y Ad35, véase WO 00/70071 yWO /40665).

El contenido de ácido nucleico entre el patógeno causante de paludismo, tal como *P. falciparum* y el huésped de interés, tal como *Homo sapiens* es muy diferente. La  
5 invención proporciona ácidos nucleicos optimizados en codones que proporcionan niveles de expresión más altos en mamíferos, tales como humanos.

El uso de diferentes entidades para regímenes de cebado/refuerzo como los descritos en la presente proporciona  
10 un método de vacunación que ofrece respuestas inmunes adecuadas de brazos tanto celulares como molares del sistema inmunológico. Implica células T CD8+, células T CD4+ y anticuerpos. Ninguna de estas vacunas sola establece una respuesta inmune sostenible que invoque niveles óptimos de  
15 células T CD8+, células T CD4+ y anticuerpos específicos de antígenos. Más aún, el orden en el cual los diferentes componentes se administran puede alterar estas respuestas inmunes y puede dar origen a diferentes periodos de protección posible contra infecciones futuras. Los métodos y  
20 kits de la presente invención hacen posible desarrollar una respuesta inmune que maneje todas las etapas diferentes del ciclo de vida del parásito en humanos, a partir de esporozoitos y merozoitos de circulación libre a hepatocitos infectados y glóbulos rojos. Más aún, proporciona una  
25 protección sostenida contra infección de paludismo durante un

periodo de tiempo prolongado.

En una modalidad preferida, la invención se refiere al uso de adenovirus recombinantes que son defectuosos en replicación a través de la remoción de al menos parte de la  
5 región E1 del genoma adenoviral, ya que la región E1 se requiere para los procesos de replicación, transcripción, traducción y empaque de adenovirus recién hechos. Los vectores suprimidos en E1 generalmente se producen en líneas de células que complementan las funciones E1 suprimidas.  
10 Estas líneas de células y el uso de las mismas en la producción de virus recombinantes han sido descritas extensamente y se les conoce bien en la técnica. De preferencia, células PER.C6<sup>®</sup>, como las representadas por las células depositadas en ECACC No. 96022940 en la Colección  
15 Europea de Cultivos de Células Animales (ECACC) en el Centro para Microbiología e investigación Aplicada (CAMR, Reino Unido), o derivados de las mismas están siendo usadas para prevenir la producción de adenovirus competentes en replicación (rca). En otra modalidad, se están aplicando  
20 células que soportan el crecimiento de adenovirus recombinantes que no son aquellos derivados para el adenovirus serotipo 5 (Ad5). Hágase referencia a publicaciones WO 97/00326, WO 01/05945, WO 01/07571, WO 00/70071, WO 02/40665 y 29 99/55132, para métodos y medios  
25 para obtener fondos adenovirales libres de rca para Ad5 así

como para otros serotipos de adenovirus, tales como el Ad35 recombinate de replicación defectuosa el cual puede ser producido sobre células HER inmortalizadas con E1 a partir de Ad35, o células PER.C6® que comprenden además genes E1 de Ad35 para proporcionar una complementación adecuada de los adenovirus tipo B.

Se debe notar aquí que en los documentos publicados WO 00/03029, WO 02/24730, WO 00/70071 y WO 02/40665, Ad50 se llamó erróneamente Ad51. El serotipo Ad51 que fue mencionado en las publicaciones anteriores es el mismo que el serotipo Ad50 en una publicación por De Jong et al. (1999), en donde fue indicado como un adenovirus del grupo B. Por motivos de claridad, Ad50 como se usa en la presente, es el serotipo Ad50 del grupo B como el mencionado por De Jong et al. (1999).

Las vacunas de la presente invención se usan típicamente en escenario de cebado/refuerzo, por ejemplo Ad/proteína; proteína/Ad; proteína/Ad/Ad; Ad/proteína/Ad; Ad/Ad/proteína, Ad/proteína/proteína/proteína, Ad/proteína/vector viral/proteína, etc., etc. Se puede vislumbrar que una combinación con otro kit más de vacuna (tal como ADN desnudo o un vector viral recombinante diferente de adenovirus (pudieron aplicarse en combinación con los agentes de cebado/refuerzo de la presente invención. También se pueden usar antígenos palúdicos adicionales o

polipéptidos.

Una secuencia es 'derivada' según se usa en la presente, si un ácido nucleico puede obtenerse a través de clonación directa a partir de secuencias tipo silvestre  
5 obtenidas de virus tipo silvestre, mientras que pueden por ejemplo también obtenerse a partir de PCR usando diferentes piezas de ADN como una plantilla. Esto significa también que estas secuencias pueden estar en la forma tipo silvestre así como en forma alterada. Otra opción para alcanzar el mismo  
10 resultado es a través de combinar ADN sintético. Se debe entender que 'derivado' no significa exclusivamente una clonación directa del ADN tipo silvestre. Una persona capacitada en la técnica también estará consiente de las posibilidades de biología molecular para obtener formas  
15 mutantes de cierta pieza de ácido nucleico. Los términos 'parte funcional, derivado y/o análogo de la misma' se deben entender como equivalentes de la secuencia de ácido nucleico con la que están emparentados. Una persona capacitada en la técnica apreciará el hecho de que ciertas eliminaciones,  
20 cambios, mutaciones (por punto), adiciones, etc., pueden aún dar como resultado una secuencia de ácido nucleico que tenga una función similar a la secuencia de ácido nucleico original, y deben producir un polipéptido similar o incluso idéntico una vez traducidas. Por lo tanto se debe entender  
25 que estas alteraciones que no alteran significativamente la

funcionalidad de las secuencias de ácido nucleico están dentro del alcance de la presente invención. Si cierto vector adenoviral se deriva de cierto serotipo adenoviral de elección, también se debe entender que el producto final  
5 puede obtenerse a través de vías indirectas, tal como la clonación directa y la sintetización de ciertas piezas de ADN genómico, usando metodología bien conocida en la técnica. Ciertas eliminaciones, mutaciones y otras alteraciones del contenido genómico que no alteren los aspectos específicos de  
10 la invención se consideran aún parte de la misma.

Ejemplos de estas alteraciones son por ejemplo eliminaciones en la estructura de base viral para hacer posible la clonación de piezas más grandes de ácidos nucleicos heterólogos. Ejemplos de estas mutaciones son por  
15 ejemplo eliminaciones o supresiones E3 y/o alteraciones en las regiones que codifican para las proteínas E2 y/o E4 del adenovirus. Estos cambios aplicados a la estructura de base adenoviral se conocen en la técnica y se aplican comúnmente, ya que espacio es un factor indicativo para que el adenovirus  
20 sea empacado; ésta es una razón principal para eliminar ciertas partes del genoma adenoviral. Otras razones para alterar las regiones E2, E2 y/o E4 del genoma pueden estar relacionadas con la estabilidad e integridad del vector adenoviral, como por ejemplo se describe en WO 03/104467 y WO  
25 2004/001032). Estas solicitudes se refieren entre otras

cosas al uso de un gen E4orf6 de un serotipo de un subgrupo de estructura de base de un adenovirus de otro subgrupo, para asegurar compatibilidad entre la actividad de E4orf6 y la actividad E1B-55K durante la replicación y empaque en una  
5 línea de células de empaque. Se refieren además al uso de un promotor pIX de funcionamiento adecuado para obtener niveles de expresión de PIX más altos y un vector adenoviral recombinante más estable.

'De replicación defectuosa' según se usa en la  
10 presente significa que los vectores virales no se replican en células no complementarias. En células complementarias, la función es requerida para la aplicación, y de esta manera la producción del vector viral, se proporcionan por la célula complementaria. Los vectores virales defectuosos en  
15 replicación de la presente invención no portan todos los elementos que hacen posible la replicación en cualquier célula huésped que no se una a célula de complementación.

'Heterólogo' según se usa en la presente en conjunto con ácidos nucleicos significa que la secuencia de  
20 ácido nucleico se deriva de una fuente original diferente a las versiones tipo silvestre de los vectores virales en los cuales se clona el ácido nucleico heterólogo. Por ejemplo en el caso de adenovirus, el ácido nucleico heterólogo que es clonado en el vector adenoviral de replicación defectuosa no  
25 es una secuencia de ácido nucleico adenoviral, sino que

proviene de cierto otro agente patógeno de interés.

'Heterólogo' según se usa en la presente en conjunto con las estrategias de vacunación de cebado-refuerzo significa que dos o más componentes separados, ejemplificados  
5 por un vector de adenovirus no replicante recombinante y una proteína adyuvada se usan en una combinación deliberada, en lugar de que un componente se administre varias veces, como es usual en la industria hasta la fecha.

'Antígeno', según se usa en la presente, significa  
10 cualquier antígeno derivado de una fuente que desarrolle una respuesta inmune en un huésped al cual se le suministre (administre) el determinante. El antígeno puede provenir de una fuente externa, por ejemplo, un patógeno, un parásito o incluso ser un auto-antígeno. Ejemplos de antígenos de  
15 *Plasmodium* que pueden suministrarse usando los virus recombinantes defectuosos en replicación de la presente invención son la proteína circumsporozoito (CS), el polipéptido SE36, polipéptido C-terminal de 19 kDa de la proteína 1 de superficie de merozoito (MSP-1p19), MSP-1, MPS-  
20 1p42, Antígeno 1 de Merozoito Apical (AMA-1), Antígeno 1 de Etapa Hepática (LSA-19) o antígeno 3 de Etapa Hepática (LSA-3), o un fragmento de cualquier de los mencionados arriba. En un aspecto preferido la invención se refiere a la proteína circumsporozoito (CS) de *P. falciparum*.

25 'Optimizado en codones' según se usa en la presente

significa que el contenido de ácido nucleico de una secuencia ha sido alterado para soportar niveles de expresión suficientemente altos de la proteína de interés en un huésped de interés al cual se le suministre el gen que codifique para la proteína. Niveles de expresión suficientemente altos en este contexto significa que los niveles de proteínas deben ser lo suficientemente altos como para desarrollar una respuesta inmune en el huésped para de esta manera protegerlo contra infección o contra enfermedades. Se sabe en la técnica que ciertas vacunas dan una respuesta inmune en humanos, a través de la cual aproximadamente 60% de los individuos vacunados son protegidos contra enfermedades inducidas por ataques subsecuentes con el patógeno (por ejemplo, esporozoitos). Por lo tanto, los niveles de expresión se considera que son suficientes si 60% o más de los individuos tratados son protegidos contra infecciones subsecuentes. Se cree que con las combinaciones de aspectos adenovirales que pueden aplicarse y la elección de antígeno como se describe en la presente, estos porcentajes pueden ser alcanzados. De preferencia, el 85% de los individuos son protegidos, aunque se prefiere más tener una protección a un ataque subsecuente en más del 90% de huéspedes vacunados. Los ácidos nucleicos descritos en la presente invención son optimizados en codones para su expresión en humanos. De acuerdo con Narum et al. (2001), el contenido de adenina más

timina (A+T) en ADN de *Homo sapiens* es de alrededor de 59%, en comparación con el porcentaje de citocina más guanina (C+G). El contenido de adenina más timina en *P. falciparum* total es de aproximadamente 80%. El contenido de adenina más timina en el gen CS de *P. falciparum* es de alrededor de 87%. Para obtener una protección suficiente se cree que es necesario mejorar los niveles de producción en el huésped. Una forma de lograr esto es el uso de codones para mantener la misma secuencia de aminoácidos final, pero usar secuencias más típicas de la expresión en mamíferos. Para esto, los vectores virales recombinantes defectuosos en replicación de acuerdo con la invención tienen un contenido de adenina más timina en los ácidos nucleicos heterólogos de la presente invención de menos 87%, de preferencia menos de 80% y muy preferiblemente menos de o igual a aproximadamente 59%. Con base en el uso de codones en humano y el contenido de aminoácidos de los genes CS de *P. falciparum* y *yoelii*, los porcentajes de los genes optimizados en codones fueron todavía más bajos, alcanzando alrededor de 45% para el contenido de aminoácidos como el descrito por la presente invención. Por lo tanto, en cuanto a los genes CS involucra se prefiere tener un contenido de adenina más timina de aproximadamente 45%. Se debe entender que si otras especies no humanas van a ser tratadas, las cuales pueden tener una concentración diferente de adenina más timina (menos o más de

59%), y/o un uso de codones diferentes, que los genes que codifican para la proteína CS de la presente invención pueden ser ajustados para adaptarse al contenido requerido y dar origen a niveles de expresión adecuados para un huésped particular. Por ejemplo, no se puede excluir tampoco que ligeros ataques en contenido pudieran resultar en cambios a nivel de expresión ligeros en diferentes áreas geográficas alrededor del mundo. Se debe entender también que los ligeros cambios en el número de repeticiones incluidas en la secuencia de aminoácidos de las proteínas, qué porcentajes pueden diferir en consecuencia. Otros antígenos de interés pueden modificarse similarmente. Todos estos contenidos ajustados forman parte de la presente invención.

La proteína designada RTS,S es una proteína de fusión que consiste en la mitad C-terminal de la proteína CS de *P. falciparum* (17 de las repeticiones NANP centrales más la mayoría de la porción C-terminal) expresada como una proteína de fusión con el antígeno de superficie de la hepatitis B.

Una de las diferentes ventajas ofrecidas por vectores adenovirales incompetentes a replicación es la menor patogenicidad de los virus progenitores y la falta documentada de enfermedad significativa causada por estos vectores en cualquier individuo, incluyendo aquellos que no sean inmunosuprimidos. El trabajo en el modelo de paludismo

en ratón, *P. yoelii*, indicó que construcciones de adenovirus recombinante que expresaban la proteína CS no sólo engendran sorprendentes respuestas inmunes celulares, sino que también proporcionan una excelente protección contra infecciones.

5 Por lo tanto, en un esfuerzo por mejorar la intensidad de la respuesta a células T y la longevidad de la respuesta inmune total a CS, los inventores de la presente invención decidieron combinar un enfoque adenoviral con el enfoque de proteína recombinante en una nueva estrategia heteróloga de  
10 cebado-refuerzo.

Desafortunadamente, el ratón no es el modelo ideal para predecir respuestas en humanos. Esto es particularmente cierto para el adenovirus 35 (Ad35). El vector incompetente en replicación estándares del adenovirus 5 (Ad5), el cual ha  
15 demostrado ciertos problemas con optimizar sus capacidades vectoras debido al carácter endémico ampliamente difundido de este virus y al hecho de que una proporción sustancial de la mayoría de las poblaciones humanas virales tienen inmunidad preexistente al virus progenitor. Ad35 obtiene el potencial  
20 de demostrar utilidad incrementada con un vector de vacuna. La disponibilidad de construcciones que porten tanto Ad5 como Ad35 CS permitió la evaluación de inmunizaciones adenovirales heterólogas secuenciales con diferentes construcciones específicamente para la cuestión de inmunidad de CS.

25 Las células dendríticas (DC) son las células

presentadoras de antígenos más potentes en el cuerpo, y el hecho de que tanto AD5 como Ad35 se dirijan a DC humano, es uno de los aspectos de su biología que los hace tan excelentes vectores de vacuna. Sin embargo, sólo Ad5 infecte eficientemente DC de murino; Ad35 sólo infecta confiablemente DC de primate. Así, aunque las preguntas de potencia básica acerca de las construcciones de Ad35 pueden contestarse en modelos de animales pequeños, las preguntas de inmunogenicidad reales que implican Ad35 sólo pueden preguntarse en primates no humanos.

Los inventores decidieron examinar las combinaciones cebado-refuerzo de RTS,S con vectores adenovirales que contenían el gen CS para determinar si las respuestas celulares y/o humorales contra el paludismo serían una mejora sobre las respuestas observadas en RTS,S solo. Además, se optimizó un régimen para dos dosis de vacuna de adenovirus sola.

#### Ejemplo

#### Vacunación heteróloga de cebado/refuerzo usando vectores adenovirales recombinantes y proteína adyuvada purificada en monos rhesus

Los objetivos del experimento fueron evaluar RTS,S, seguido por Ad35, y Ad35 seguido por RTS,S, en una comparación directa con un régimen de inmunización estándar de RTS,S de tres dosis y un régimen de Ad35 de dos dosis

estándar. Un objetivo secundario fue optimizar el régimen de adenovirus de dos dosis. Las respuestas inmunes serológicas y celulares durante y después de varios regímenes diferentes de estas construcciones en combinación fueron estudiadas.

5 El mono rhesus (*Marca mulata*) es un excelente modelo para la respuesta inmune humana debido a su relación filogenética mucho más cercana. Alelos MHC clase II son particularmente bien conservados; la generación de algunos alelos compartidos se calcula de hace 25 millones de años,  
10 antes de la fecha de determinación de especie de humano y rhesus. Así, existe un uso de epítopes similares en presentación de antígeno a células Th, lo cual incrementa ampliamente el valor predictivo del modelo. Más importantemente, en el modelo de mono Rhesus en el pasado ha  
15 probado ser altamente productivo de las respuestas inmunogenicidad humanas tanto para antígenos de paludismo como para VIH, otra enfermedad humana para la cual el desarrollo de una vacuna ha sido obstaculizado por la complejidad de la respuesta inmune.

20 Experimentos preliminares ya han sido llevados a cabo con construcciones adenovirales-CS de *P. yoelii* de paludismo en ratón que demostraron excelente inmunogenicidad y eficacia protectora. Sin embargo, el largo historial de intentos no exitosos por extrapolar directamente a partir del  
25 modelo de paludismo en ratón a humanos en la búsqueda del

desarrollo de vacunas contra paludismo por *P. falciparum* obliga a una etapa intermedia en un modelo de primate no humano. El macaco rhesus representa la mejor elección de especie toda vez que tiene una extensa base de datos de  
5 información anterior sobre estas vacunas en esta especie, gracias a la proximidad filogenética a los humanos, debido a que su tamaño permite muestras de sangre de suficiente volumen para asegurar una evaluación adecuada de respuestas inmunes y debido a que los reactivos y ensayos existen que  
10 están ya optimizados para esta especie y de esa forma no requieren protocolos auxiliares y muchos años de desarrollo. Además, las construcciones 35 de adenovirus sólo pueden probarse adecuadamente en primates no humanos, debido la incapacidad de este virus para invadir eficientemente en las  
15 células dendríticas de otros mamíferos.

Las construcciones y la producción de los adenovirus recombinantes de replicación defectuosa que portan el gen que codifica para CS de *P. falciparum* (Ad5Cs y Ad35CS) usadas en este estudio han sido descritas en gran detalle en  
20 los ejemplos de WO 2004/055187 (clon 02-659; véase figura 2 en el mismo). Brevemente, estos adenovectores comprenden un gen heterólogo que codifica para la proteína CS con una secuencia de aminoácidos que es similar a la proteína CS de la cepa NF54, clon 3D7, que tiene entre otros, una secuencia  
25 de señal N-terminal, 27 repeticiones NANP, un racimo de 3

repeticiones NVDP y una repetición NVDP separada, el epítotope universal (Lockyer et al. 1989; Zevering et al. 1994; Nardin et al. 2001) y una eliminación de los últimos 14 aminoácidos (en el C terminal). La diferencia con la proteína de RTS,S es que RTS,S carece de la secuencia de señal N-terminal, y una gran población de la región de repetición, así como la mayoría de la secuencia de señal de ancla GPI localizada C-terminalmente la cual también está ausente en las construcciones adenovirales.

10 El experimento fue un estudio de seguridad e inmunogenicidad ciego y clasificado aleatoriamente de varias combinaciones y estrategias de regulación de tiempo para la optimización de estrategias de cebado-refuerzo de RTS,S con construcciones que portaban CS de Ad5 y Ad35 (Ad5CS y Ad35CS) 15 y para la optimización de Ad5CS y AD35CS solo. El mejor régimen anterior contra el cual las nuevas estrategias se compararon fueron las tres dosis intramusculares de 50 µg de RTS,S con adyuvante dado a 0, 1 y 3 meses. Esto fue el grupo 1, el grupo de control positivo. Todos los grupos se 20 detallan en la tabla 1A. En todos los casos el adyuvante estuvo formado de 50 µg de 3D-MPL, 50 µg de QS21, en una formulación con liposomas que contenían colesterol como la descrita en WO 96/33739.

El grupo 2 recibió dos dosis de RTS,S/adyuvante en 25 el mes 0 y 1 seguida por una dosis de Ad35CS luego de 3

meses. El grupo 3 recibió una dosis de Ad35CS el mes 0 seguida por dos dosis de RTS,S/adyuvante luego de 1 y 3 meses. Los grupos 4, 5 y 6 sólo recibieron construcciones adenovirales. Experiencia anterior con dos dosis de 5 construcciones de adenovirus 5 en diferentes enfermedades indicaron que las respuestas inmunes serológicas y celulares óptimas se obtienen cuando el intervalo entre las inmunizaciones es de al menos 6 meses. Debido a la necesidad de evaluar construcciones Ad35 en humanos o primates no 10 humanos, el tiempo óptimo entre dosis para este vector aún no fue establecido. Así, el grupo 4 recibió dos dosis de Ad35CS en un programa de 0, 3 meses (para un control directo a los grupos de proteínas) y el grupo 5 recibió dos dosis en un programa de 0, 6 meses. Para poder evaluar la pregunta de si 15 dos dosis de la misma construcción de adenovirus eran inferiores a la alternancia de construcciones para la proteína CS, el grupo 5 se comparó con el grupo 6, el cual recibió Ad5CS seguido por Ad35CS en el programa de meses 0, 6. Finalmente, el grupo de control 7 obtuvo dos dosis de 20 Ad35 simple (sin inserto de gen de paludismo) en los meses 0 y 3 para servir como un grupo de control de inmunización para evaluaciones de inmunogenicidad.

Los sitios de inyección fueron sujetos y claramente marcados para facilitar la observación de la 25 reactogenicidad de la vacuna. Además, los animales fueron

sedados y el sitio de inyección se examinó directamente para señales de induración, hinchazón, calor, enrojecimiento u otra anormalidad 24, 48 y 72 horas y 7 y 14 días luego de la inyección. Aunque las señales de toxicidad sistémica no  
5 fueron esperadas, los animales también fueron sedados y examinados en estos puntos de tiempo para linfadenopatía, celulitis, abscesación, artritis, anorexia y pérdida de peso, y sus valores de química hematológica y clínica fueron monitoreados para alteraciones. Se tomó sangre en el momento  
10 de la inyección y 24, 48, 72 horas y 7 y 14 días después de cada inyección para un conteo hemático completo (CBC) y para un panel de ensayos de química clínica que incluía (pero no necesariamente limitado a) determinación de BUN, creatinina, AST, ALT, GT y CK. Muestras fecales para confirmar la  
15 ausencia de un derrame de vectores no replicativos se tomaron y guardaron a -70°C cada uno de los días 0-10 para cada inyección de adenovirus, para pruebas de adenovirus subsecuentes.

Uno a tres mililitros de suero se recogieron en el  
20 momento de y 1, 2 y 4 semanas después de cada inyección, y al menos una vez al mes posteriormente para determinar la naturaleza y magnitud de la respuesta de anticuerpo de CS R32 (la región de repetición de la proteína CS usada para desarrollar el ensayo ELISA estandarizado a la proteína CS,  
25 véase abajo) mediante ELISA. Las muestras de suero se

)

117

almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta usarse, y las muestras se procesaron por lotes cerca del final del experimento para minimizar la variabilidad entre ensayos. Volúmenes de suero tomados fueron adecuados por lo que por cada inyección de 5 adenovirus, 0.5-1.0 ml de suero a partir del día 0, 1, 7 y 14, y al menos cada 4 semanas posteriormente pueden usarse para la determinación del título de anticuerpos anti-adenovirus. Grandes volúmenes (20-40 ml) de sangre anti-coagulada con EDTA o heparina se tomaron para cosechas de 10 células antes de la primera inmunización, 4 semanas después de la segunda inmunización (si las demandas de volumen lo permiten), 4 semanas después de la tercera inmunización y 6 meses después de la tercera inmunización. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron concentradas 15 a partir de estas muestras usando métodos estándares por separación de centrifugación de densidad. Aunque los rendimientos de células pueden ser altamente variables de un animal a otro, en general entre más grande el volumen de la muestra, mayor el número de células recuperadas. Debido a 20 que es imposible predecir la exacta recuperación de células, se prefiere tomar una muestra más grande cuando sea posible de tal forma que suficientes células se obtengan para repetir ensayos con motivos de validez estadística. Las células fueron congeladas para permitir el procesamiento intermitente 25 en un punto de tiempo posterior y de esta manera mejorar el

control de calidad. Las células fueron congeladas en suero autólogo con 10% de DMSO a una velocidad de reducción de temperatura controlada y se almacenaron en nitrógeno líquido en fase de vapor durante al menos una semana antes de usar.

- 5 De los animales más grandes cuyos datos CBC indicaron que hubieran tolerado bien, una muestra adicional para cosecha de células se tomó después del cebado, pero antes del refuerzo. Ya que hubieron 14 monos (dos grupos) que recibieron dos dosis de RTS,S/adyuvante y 14 monos que
- 10 recibieron una sola dosis de Ad35CS antes de la 8ª semana, se esperó muestrear al menos la mitad y de esta manera mantener significatividad estadística. Las cosechas de células ocurrirían no antes de 4 semanas después de una inyección. Ya que los grupos que sólo obtenían construcciones de
- 15 adenovirus recibieron sólo dos inyecciones, y de esta manera tienen un programa de sangrado menos demandante que los monos que recibieron tres inyecciones, se esperó que una cosecha de células intermedia entre dos inyecciones no presentara problemas.
- 20 Los análisis de respuestas inmunes celulares incluyeron ensayos ELISPOT de corto plazo para la cuantificación de células productoras de IFN- $\gamma$  específico de antígeno. El análisis citométrico de flujo de células estimuladas por antígeno no sólo confirma los datos
- 25 acumulados en los análisis ELISPOT, sino proporciona también

información adicional acerca del fenotipo de las células específicas de antígeno que están respondiendo. Así, la determinación del subconjunto de secreción de IFN- $\gamma$  de CD8+ específico de antígeno por tinción intracelular y citometría  
5 de flujo también se investiga.

Ensayos adicionales que se llevan a cabo incluyen análisis ELISPOT globales para citocinas adicionales, tinción intracelular para la enumeración de subconjunto de células T de citocinas adicionales, otros ensayos a base de citometría  
10 de flujo para cuantificación de la producción de citocinas de subconjunto de células T específicas de antígenos y RT-PCR para la correlación cuantitativa con los demás métodos.

Los monos fueron divididos en grupos que coincidían uniformemente para edad, sexo, peso y origen geográfico, y  
15 los grupos fueron después clasificados aleatoriamente. Todas las evaluaciones clínicas y determinaciones de puntos finales de seguridad se determinaron sin el conocimiento de la asignación de grupo de los monos. Similarmente, todos los ensayos inmunológicos se llevaron a cabo sin conocimiento  
20 anterior de los grupos a los cuales pertenecían las muestras individuales. La excepción a esta política de ceguera fueron los animales que recibieron inmunizaciones en un programa de mes 0 y 6 a diferencia de 0, 1 y 3; sin embargo, la ceguera se mantuvo en cuanto a la inyección específica que se estaba  
25 dando.

Un tamaño de grupo de siete animales por grupo de prueba (y cuatro en el grupo de control) es ideal para minimizar el tamaño del grupo pero para detectar aún precisamente las diferencias entre grupos, con base en datos  
5 anteriores de experimentos similares pero sólo distintamente relacionados.

La media geométrica de resultados de los ensayos ELISA se comparó paramétricamente usando análisis estándares tales como la prueba T del estudiante, asumiendo una  
10 variación igual y dos colas, y ANOVA. Los resultados de los ensayos ELISPOT, expresados en puntos por 200,000 células, fueron tratados similarmente y también se les examinó usando análisis no paramétricos tales como la prueba de Kruskal-Wallis. Cuando las comparaciones entre grupos se requieren,  
15 la prueba T del estudiante, en bruto o los datos transformados por logaritmo, se usan para determinar diferencias entre cualquier par de grupos.

Antes de la inyección, el cabello fue sujetado y la piel limpiada con alcohol de frotación al 70%, y un círculo  
20 de 2.5-3 cm se dibujó sobre la piel con tinta indeleble para facilitar la ubicación del sitio de inyección para la palpación y evaluación de reactogenicidad subsecuentes. Inyecciones de RTS,S fueron mezcladas con el adyuvante inmediatamente antes de ingresar en el corredor del mono. El  
25 volumen de inyección final fue de 0.5 ml y se suministró a

través de una aguja calibre 25-29 al interior de la musculatura del muslo. Las construcciones de adenovirus fueron preparadas como se describe en (WO 2004/055187) en solución salina de pH regulado y también se administraron en  
5 la misma ubicación intramuscular en un volumen final de 0.5 ml.

La biomuestra primaria fue sangre, ya sea para suero o células. Un programa de sangrado se delinea en la tabla 1B. El estado patológico de los animales se monitoreó;  
10 indicando la capacidad de un individuo para mantener un biomuestreo repetido o significando que el programa de biomuestreo planeado es reducido. Cada vez que se tomó sangre, un conteo hemático completo (CBC) se llevó a cabo con un contador de células hemáticas automatizado Coulter  
15 (requiriendo <50 µl de sangre no coagulada). Los lineamientos tipo GLP recomendados por el fabricante para el mantenimiento y actualización se llevaron a cabo. Hematocrito, hemoglobina, volumen corpuscular medio (MCV), conteo de glóbulos rojos (RBC) y porcentaje de reticulocitos  
20 fueron seguidos estrechamente para evaluar que los animales no se volvieran anémicos.

Sangre venosa se tomó de las venas femoral, safena o cefálica usando agujas calibre 20-24 y ya sea jeringas o tubos de vacío. En general, las venas safena o cefálica se  
25 prefirieron para las extracciones de sangre de menos de 10

ml, y las venas femorales se prefirieron para evitar hemólisis y acortar el tiempo de venipuntura total cuando volúmenes de más de 10 ml fueron removidos.

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC's, por sus siglas en inglés) se cosecharon a los animales antes de la inmunización, dos semanas después de la inmunización final y tres meses después de la inmunización final. En este protocolo, las PBMC's se separaron mediante métodos estándares de centrifugación de densidad, y se criopreservaron en suero autólogo al 45% (45% de solución salina y 10% de DMSO). Brevemente, sangre entera fue estratificada sobre medio de separación de células Ficoll-hypaque Lymphoprep® (Axis-Shield, Oslo, Noruega) y se centrifugó a 650 g durante 20 minutos. La capa de células se removi6 y se lav6 en dos lavados de dPBS (BioWhittaker, Walkersville, MD) a 400 g durante 15 minutos. Las células viables se contaron usando un hemocitómetro Coulter ACT\*10. Los gránulos se resuspendieron a  $1 \times 10^7$ /ml en 50% de dPBS, 50% de solución salina. También se aadi6 por goteo DMSO hasta un volumen final de 10%. Las células fueron congeladas en alícuotas de 0.55 ml de exactamente 5 millones de células cada una al colocarlas en un baño de isopropanol de reducción de temperatura controlado en el congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante la noche, y se almacenaron en fase de vapor de nitr6geno líquido hasta usarse.

Luego de la última vacunación, células T secretoras de interferón gama (IFN- $\gamma$ ) en muestras de sangre de los diferentes monos se identificaron con el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISpot) después de la  
5 estimulación con antígenos enteros y fondos de péptidos específicos C- y N-terminales (como los descritos en detalle abajo). Los resultados se grafican en la figura 1 (2 semanas después de la última vacunación) y figura 2 (3 meses después de la última vacunación), y se expresan en la tabla 2 y 4,  
10 respectivamente, como unidades formadoras de punto medias por millón de células (SPU); una comparación estadística se llevó a cabo usando análisis de variación (ANOVA) en datos transformados por logaritmo. Todos los grupos fueron comparados. En caso de que una significación estadística se  
15 determinara un análisis post-hoc puede llevarse a cabo para una comparación de grupo por grupo (resultados no mostrados).

Para comparar los resultados de ELISpot entre diferentes estrategias de tratamiento, relaciones de títulos geo medios fueron calculadas para estrategias con Ad35 como  
20 tratamiento de cebado. En estas relaciones el título geo medio obtenido con tratamiento con RTS,S solo (a 0, 2, 3 meses) se tomó como tratamiento de referencia (figura 5 y 6, y tabla 10). Similarmente, las relaciones se calcularon también para estrategias con Ad35 como tratamiento de  
25 refuerzo (figura 7 y 8, y tabla 11).

Análisis similares se llevaron a cabo para los resultados de los ELISpots de células T de estimulación específicas del término N. Los resultados se grafican en las figuras 9 y 10, y en las tablas 12 y 14, respectivamente.

- 5 Finalmente, se calcularon las relaciones que se presentan en la figura 11 (estrategias de cebado con Ad35) y figura 12 (estrategias de refuerzo con Ad35), y tablas 16 y 17, respectivamente.

- Se llevaron a cabo ELISpots en PBMC's  
10 criopreservadas descongeladas en placas para ELISpot MultiScreen-IP con fondo de PVDF (Millipore, Bedford, MA) usando metodología estándar. La técnica estéril se siguió estrictamente hasta que las células fueran removidas el día 2 para un desarrollo de puntos final.

- 15 Medios usados: Medio completo (cRPMI) se preparó frescamente de RPMI-1640 (BioWhittaker, Walkersville, MD) con la adición de 1:100 de penicilina/estreptomicina, 1:100 de L-glutamina, 1:200 de  $\text{NaHCO}_3$  (Sigma, St. Louis, MO), 1:100 de aminoácidos no esenciales, 1:10 de piruvato y 1:300 de 2-ME  
20 (Gibco). Suero de becerro fetal (FCS, HyClone, Logan, UT), de un lote caracterizado previamente mediante ensayo de proliferación específico para soportar un adecuado crecimiento de células de mono aún proporciona muy poco fondo estimulador, se añadió a un volumen final de 10% para Crpmi-  
25 10, 20% para Crpmi-20, ETC. Media-plus (M+) fue

complementado adicionalmente con anticuerpos CD28 anti-mono y CD49D anti-mono a 1:500 (BD Pharmingen, San José, CA).

Los siguientes estimulantes se prepararon frescos dos veces a la concentración final deseada en M+ sin suero  
5 añadido:

Con A: Concanavalina A (Sigma) a 2.5  $\mu\text{g/ml}$  (final 1.25  $\mu\text{g/ml}$ ) como un control positivo para todos los frascos.

CS-C: un fondo de polipéptidos de 15 meros, que se traslapa por 11 aminoácidos, que cubre la porción C-terminal  
10 de la molécula de PfCS (suministrado por GSK, Rixensart, Bélgica) a 2.5  $\mu\text{g/ml}$  de cada péptido (1.35  $\mu\text{g/ml}$  final).

CS-N: un grupo similar de péptidos de 15 meros, que se traslapa por 11, que cubre el N terminal de la molécula PfCS.

15 RTS,S: antígeno de complejo de proteína entera purificado RTS,S adecuado para cultivo de células (GSK) a 2  $\mu\text{g/ml}$  (1  $\mu\text{g/ml}$  final).

HEF: proteína entera de antígeno superficial de hepatitis B purificado (hbS) (el componente "S" de RTS,S),  
20 también adecuada para el cultivo de células (GSK) a 23.2  $\mu\text{g/ml}$  (11.6  $\mu\text{g/ml}$  final).

HbS-P: un fondo de péptidos HbS de 15 meros (GSK) a 2.5  $\mu\text{g/ml}$  cada péptido (1.25  $\mu\text{g/ml}$  final).

El control negativo fue M+ sin suplementación  
25 adicional.

1577

Las placas se prepararon como sigue. Las placas se recubrieron con 50 µl/pocillo de una dilución 1:100 en dPBS estéril del anticuerpo IFN-γ anti-mono monoclonal primario (UcyTech #21-43-09, Utrecht, los Países Bajos), y se incubaron en una bolsa de plástico a 4°C durante 5-6 horas. 1 Hora antes de usar, el anticuerpo de recubrimiento se removió y la placa se bloqueó con cRPMI-10 en una incubadora de cultivo de células de humedad controlada por 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C. Inmediatamente antes de usar, se removió el medio de bloqueo.

Descongelación de PBMC crioconservadas: Frascos congelados fueron revueltos en agua de la llave caliente (37-40°C justo antes de ser casi descongelados, y los contenidos de 0.55 ml se transfirieron inmediatamente a 8 ml RPMI-20. 15 Las células fueron lavadas a 350 g durante 13 minutos, y el gránulo se resuspendió cuidadosamente en 2.0 ml de cRPMI-20. Una alícuota estéril de 40 µl se removió después para confirmar números de células viables, y el volumen se ajustó como fura necesario para producir una sola suspensión de 20 células de  $2 \times 10^6$  células/ml.

Pre-estimulación: Volúmenes iguales de suspensión de células en cRPMI-20 y estimulantes en M+ fueron mezclados en tubos de cultivos de células con polipropileno para dar la concentración deseada final de todos los reactivos. Las 25 células se almacenaron después en incubadora durante al menos

167

5 horas, con tapas flojas y en posición inclinada para facilitar el intercambio de gas.

Estimulación final: Después de 5-6 horas de incubación, las células fueron centrifugadas a 400 g durante 5 10 minutos y los sobrenadantes se descartaron. Las células fueron después inmediatamente resuspendidas de nuevo en medio cRPMI-20 y medio estimulante. Después fueron regresadas a la incubadora durante 10-20 minutos para permitir la estabilización del pH. Luego, las células se mezclaron 10 brevemente y 200  $\mu$ l (200,000 células) se pipetearon cuidadosamente en los pocillos adecuados sobre las placas bloqueadas y vacías. Se tuvo cuidado en todas las etapas de estimulantes que los pocillos no se secaran. Las placas se incubaron después sin alteración durante la noche (>16 h).

15 Desarrollo de puntos: Una dilución 1:100 de anticuerpo anti-ratón-IFN- $\gamma$  policlonal secundario (UcyTech) se hizo en dPBS con 2% de FCS. Las células y medios fueron retirados de la placa; los pocillos se lavaron 8 veces con dPBS-0.5% de Tween 20 (Sigma) y se cargaron con 50  $\mu$ l 20 mediante cuerpo secundario diluido. Las placas se incubaron sobre un panel oscilatorio durante tres horas a temperatura ambiente en una bolsa de plástico. Las placas se lavaron nuevamente 8 veces con dPBS-0.5% de Tween 20 y se cargaron con 50  $\mu$ l/pocillo de una dilución 1:1,000 de conjugado de 25 estreptavidina-fosfatasa alcalina (Southern Biotech #7100-04,

Birmingham, AL). Las placas se incubaron después durante 2 horas más a temperatura ambiente en un bolsa de plástico sobre un panel oscilante. Finalmente, las placas se lavaron 8 veces como arriba, seguidas por un solo lavado con agua 5 destilada y adición de 100 µl/pocillo de substrato NBT-BCIP cromogénico (Pierce Biotech, Rockford, IL). Se dejó que se desarrollara un color durante 10-20 minutos, hasta que el fondo fuera negro. Las placas se enjuagaron después con al menos dos lavados de 300 µl de agua destilada, y se secaron 10 al aire durante la noche antes de la lectura.

Lectura de las placas: Las placas fueron leídas en un lector AID ELHR01 Elispot usando AID ELISpot Reader v3.1.1. Todos los pocillos se examinaron visualmente, y los conteos de puntos inadecuados (pelusa u otros restos) se 15 excluyeron manualmente. Los datos se guardaron en una hoja de cálculo Excel. Pocillos duplicados o triplicados fueron promediados, y este número se multiplicó por 5 para producir los datos brutos finales en puntos/millones de células.

Control de calidad: la recuperación de células 20 viable promedio después de congelación/descongelación excedió 95%. Se repitieron las corridas si los pocillos de control de medio promediaron más de 20 puntos/millón, o si las colonias ConA eran menos de 500 puntos/millón. Asimismo, en general, la viabilidad de CD4+ y CD8+, evaluada usando 25 citometría de flujo con la exclusión de tinte 7-AAD y tinción

de superficie, tuvieron todas que exceder 90% o se repetía la corrida (datos no incluidos).

La tabla 1A muestra los resultados del régimen experimental para el régimen de cebado/refuerzo en monos 5 rhesus usando vectores adenovirales recombinantes a base de serotipos 5 y 35 que comprenden el gen que codifica para la proteína CS de *P. falciparum*, y los RTS,S adyuvados como el componente de antígeno proteínáceo.

**Tabla 1A**

10

| Grupo | Cebador    | Mes 1 | Mes 3      | Mes 6   |
|-------|------------|-------|------------|---------|
| 1     | RTS.S      | RTS.S | RTS.S      |         |
| 2     | RTS.S      | RTS.S | Ad35-CS    |         |
| 3     | Ad35-CS    | RTS.S | RTS.S      |         |
| 4     | Ad35-CS    |       | Ad35-CS    |         |
| 5     | Ad35-CS    |       |            | Ad35-CS |
| 6     | Ad5-CS     |       |            | Ad35-CS |
| 7     | Ad35-vacío |       | Ad35-vacío |         |

15

La tabla 1B muestra un programa de toma de sangre. Cosechas de CBC y células requieren de sangre entera; química y ELISA's requieren suero. Se asume que 1 ml de suero representa 2 ml de sangre entera. Sólo volúmenes de sangre entera son indicados. Las escalas indican cuando muestras 20 más grandes pueden ser tomadas de monos más grandes. En la columna CBC/Quim, "0.5" indica sólo CBC llevado a cabo en esos días. \* Indica que no todos los monos sangraron en este punto de tiempo.

25

Tabla 1B

|    |                   |          |       |         |                          |
|----|-------------------|----------|-------|---------|--------------------------|
|    | Semana-Día        | CBC/quim | ELISA | Células | Sangre entera TOTAL (ml) |
| 5  | Semana -4 (aprox) | 1-3      | 2.5-5 | 25-35   | 28-43                    |
|    | Semana -1*        | 1-3      | 2.5-5 |         | 3.5-8                    |
|    | Semana0-Día0      | 1-3      | 2.5-5 |         | 3.5-8                    |
| 10 | 0-1               | 1-3      | 2.5   |         | 3.5-5.5                  |
|    | 0-2               | 1-3      |       |         | 1-3                      |
|    | 0-3               | 1-3      |       |         | 1-3                      |
|    | 1                 | 1-3      | 2.5-5 |         | 3.5-8                    |
|    | 2                 | 1-3      | 2.5-5 |         | 3.5-8                    |
|    | 4-0               | 1-3      | 2.5-5 |         | 3.5-8                    |
|    | 4-1               | 1-3      | 2.5   |         | 3.5-5                    |
|    | 4-2               | 1-3      |       |         | 1-3                      |
|    | 4-3               | 1-3      |       |         | 1-3                      |
|    | 5                 | 1-3      | 2.5-5 |         | 3.5-8                    |
|    | 6                 | 1-3      | 2.5-5 |         | 3.5-8                    |
|    | 8                 | 0.5      | 2.5-5 | 15-35*  | 18-40                    |
| 15 | 10                | 0.5      | 2.5-5 |         | 3-5.5                    |
|    | 12-0              | 1-3      | 2.5-5 |         | 3.5-8                    |
|    | 12-1              | 1-3      | 2.5   |         | 3.5-5.5                  |
|    | 12-2              | 1-3      |       |         | 1-3                      |
|    | 12-3              | 1-3      |       |         | 1-3                      |
|    | 13                | 1-3      | 2.5-5 |         | 3.5-8                    |
|    | 14                | 1-3      | 2.5-5 |         | 3.5-8                    |
|    | 15                | 2.5      |       |         | 2.5                      |
| 20 | 16                | 1-3      | 2.5-5 | 25-35   | 28-43                    |
|    | 18                | 0.5      | 2.5-5 |         | 3-5.5                    |
|    | 20                | 0.5      | 2.5-5 |         | 3-5.5                    |
|    | 22                | 0.5      | 2.5-5 |         | 3-5.5                    |
|    | 25-0              | 1-3      | 2.5-5 |         | 3-7.5                    |
|    |                   |          |       |         |                          |
|    |                   |          |       |         |                          |
| 25 |                   |          |       |         |                          |
|    |                   |          |       |         |                          |

|    |       |         |        |        |        |
|----|-------|---------|--------|--------|--------|
| 5  | 25-1• | 1-5     |        |        | 1-5    |
|    | 25-2• | 1-5     |        |        | 1-5    |
|    | 25-3• | 1-5     |        |        | 1-5    |
|    | 26    | 2.5-7.5 |        |        | 1-5    |
|    | 27    | 0.5     | 2.5-5  | 25-35  | 28-43  |
|    | 28    | 2.5     |        |        | 2.5    |
|    | 29    | 0.5     | 5      |        | 5.5    |
|    | 31    | 0.5     | 5      |        | 5.5    |
|    | 33    | 0.5     | 5      |        | 5.5    |
|    | 35    | 0.5     | 5      |        | 5.5    |
| 10 | 38    | 0.5     | 5      | 25-35* | 5.5-43 |
|    | 39    | 0.5     | 7      |        | 7.5    |
|    | 40*   |         | 5-10*  | 20-35* | 25-43* |
|    | 41*   | 0.5*    | 7*     |        | 7.5*   |
|    | 44*   | 0.5*    | 2.5-5* |        | 3-5.5* |
|    | 48*   | 0.5*    | 5*     |        | 5.5*   |
|    | 51*   | 0.5*    | 5-10*  | 25-35* | 28-43* |
|    | 52*   | 0.5*    | 5*     |        | 5.5*   |
|    |       |         |        |        |        |
|    |       |         |        |        |        |

En las siguientes tablas, RTS,S es referido simplemente como "RTS".

La tabla 2 muestra los resultados de inmunidad de células T específicas de PfCS C-terminal dos semanas después del refuerzo: media y media geométrica IFN-γ ELISpot (en SFU/millones de células) y comparación ANOVA. Se dan 20 diferentes regímenes cebado/refuerzo (izquierda).

Tabla 2

|                      | 2 Semanas después de refuerzo |                  |
|----------------------|-------------------------------|------------------|
|                      | Media                         | Media geométrico |
| RTS, RTS, RTS        | 20                            | 31               |
| RTS, RTS, Ad35       | 233                           | 166              |
| Ad35, RTS, RTS       | 571                           | 553              |
|                      |                               |                  |
| Ad35, Ad35 (3 meses) | 85                            | 78               |
| Ad35, Ad35 (6 meses) | 47                            | 42               |
| Ad5, Ad35 (6 meses)  | 110                           | 89               |
|                      |                               |                  |
| Ad35 vacío           | 2                             | 2                |
|                      |                               |                  |
| ANOVA                |                               | P<0.0001         |

La tabla 3 es una prueba T de Student. Valores p para comparación ELISpot de IFN-γ específico de PfCS C-terminal, como se muestra en la tabla 2, dos semanas después del refuerzo (última vacunación).

Tabla 3

|    |  |                       |                   |                   |                       |                       |
|----|--|-----------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
|    |  | RTS, RTS,<br>RTS      | RTS, RTS,<br>Ad35 | Ad35, RTS,<br>RTS | Ad35, Ad35<br>3 Meses | Ad35, Ad35<br>6 Meses |
|    |  | RTS, RTS, RTS         |                   |                   |                       |                       |
| 5  |  | RTS, RTS, Ad35        | 0.05              |                   |                       |                       |
|    |  | Ad35, RTS, RTS        | 0.008             | 0.03              |                       |                       |
|    |  |                       |                   |                   |                       |                       |
|    |  | Ad35, Ad35<br>3 Meses | 0.24              | 0.20              | 0.001                 |                       |
|    |  | Ad35, Ad35<br>6 Meses | 0.70              | 0.015             | <0.0001               | 0.19                  |
| 10 |  | Ad5, Ad35             | 0.16              | 0.24              | 0.0004                | 0.80                  |
|    |  | 6 Meses               |                   |                   |                       | 0.07                  |
|    |  |                       |                   |                   |                       |                       |

La tabla 4 muestra la inmunidad de células T de IFN-γ específicas del C terminal tres meses después del refuerzo: ELISpot media y media geométrica (en SFU/millones de células) y comparación ANOVA. Se dan diferentes regímenes de cebado/refuerzo (izquierda).

Tabla 4

|    |                      |                             |                  |
|----|----------------------|-----------------------------|------------------|
| 5  |                      | 3 Meses después de refuerzo |                  |
|    |                      | Media                       | Media geométrica |
|    | RTS, RTS, RTS        | 8                           | 9                |
|    | RTS, RTS, Ad35       | 35                          | 49               |
|    | Ad35, RTS, RTS       | 128                         | 156              |
|    |                      |                             |                  |
|    | Ad35, Ad35 (3 meses) | 25                          | 25               |
|    | Ad35, Ad35 (6 meses) | 15                          | 15               |
|    | Ad5, Ad35 (6 meses)  | 77                          | 81               |
|    |                      |                             |                  |
| 10 | Ad35 vacío           | 2                           | 2                |
|    | ANOVA                |                             | P<0.0001         |

La tabla 5 es una prueba T de Student. Valores p para comparación ELISpot, como se muestra en la tabla 4, tres meses después del refuerzo (última vacunación).

Tabla 5

|    |                    |               |                |                |                    |                    |
|----|--------------------|---------------|----------------|----------------|--------------------|--------------------|
| 20 |                    | RTS, RTS, RTS | RTS, RTS, Ad35 | Ad35, RTS, RTS | Ad35, Ad35 3 Meses | Ad35, Ad35 6 Meses |
|    | RTS, RTS, RTS      |               |                |                |                    |                    |
|    | RTS, RTS, Ad3      | 0.03          |                |                |                    |                    |
|    | Ad35, RTS, RT      | 0.003         | 0.03           |                |                    |                    |
|    |                    |               |                |                |                    |                    |
|    | Ad35, Ad35 3 Meses | 0.15          | 0.26           | 0.0009         |                    |                    |
|    | Ad35, Ad35 6 Meses | 0.48          | 0.07           | 0.0009         | 0.36               |                    |
|    | Ad5, Ad35 6 Meses  | 0.006         | 0.38           | 0.12           | 0.04               | 0.009              |

La tabla 6 muestra la inmunidad de células B (título de anticuerpos anti-repetición) dos semanas después del refuerzo final: título de ELISA media y media geométrica y comparación ANOVA. Se dan diferentes regímenes 5 cebado/refuerzo (izquierda).

Tabla 6

|    |                      | 2 semanas después de refuerzo |                  |
|----|----------------------|-------------------------------|------------------|
|    |                      | Media                         | Media geométrica |
| 10 | RTS, RTS, RTS        | 3313                          | 3385             |
|    | RTS, RTS, Ad35       | 3705                          | 3400             |
|    | Ad35, RTS, RTS       | 1737                          | 2059             |
|    |                      |                               |                  |
|    | Ad35, Ad35 (3 meses) | 295                           | 336              |
|    | Ad35, Ad35 (6 meses) | 161                           | 171              |
|    | Ad5, Ad35 (6 meses)  | 339                           | 347              |
|    |                      |                               |                  |
|    | Ad35 vacío           | 1                             | 1                |
|    |                      |                               |                  |
| 15 | ANOVA                |                               | P<0.0001         |

La tabla 7 es una prueba T de Student. Valores p para comparación de anticuerpos, como se muestra en la tabla 6, dos semanas después del refuerzo (última vacunación).

Tabla 7

|    |                       |                  |                   |                   |                       |                       |
|----|-----------------------|------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
|    |                       | RTS, RTS,<br>RTS | RTS, RTS,<br>Ad35 | Ad35, RTS,<br>RTS | Ad35, Ad35<br>3 Meses | Ad35, Ad35<br>6 Meses |
|    | RTS, RTS, RTS         |                  |                   |                   |                       |                       |
| 5  | RTS, RTS, Ad3         | 0.99             |                   |                   |                       |                       |
|    | Ad35, RTS, RT         | 0.07             | 0.10              |                   |                       |                       |
|    |                       |                  |                   |                   |                       |                       |
|    | Ad35, Ad35<br>3 Meses | < 0.0001         | < 0.0001          | < 0.0001          |                       |                       |
|    | Ad35, Ad35<br>6 Meses | < 0.0001         | < 0.0001          | < 0.0001          | 0.06                  |                       |
| 10 | Ad5, Ad35<br>6 Meses  | < 0.0001         | < 0.0001          | 0.0002            | 0.93                  | 0.086                 |

La tabla 8 muestra la inmunidad de células B (título de anticuerpos) tres meses después del refuerzo relacionado con CS de *P. falciparum*: ELISA media y media geométrica (en SFU) y comparación ANOVA. Se dan diferentes regímenes cebado/refuerzo (izquierda).

Tabla 8

|    |                      |                             |                  |
|----|----------------------|-----------------------------|------------------|
|    |                      | 3 meses después de refuerzo |                  |
|    |                      | Media                       | Medio geométrica |
|    | RTS, RTS, RTS        | 528                         | 521              |
|    | RTS, RTS, Ad35       | 487                         | 357              |
| 20 | Ad35, RTS, RTS       | 288                         | 275              |
|    |                      |                             |                  |
|    | Ad35, Ad35 (3 meses) | 67                          | 78               |
|    | Ad35, Ad35 (6 meses) | 70                          | 65               |
|    | Ad5, Ad35 (6 meses)  | 92                          | 141              |
|    |                      |                             |                  |
|    | Ad35 vacío           | 0                           | 1                |
|    |                      |                             |                  |
| 25 | ANOVA                |                             | P<0.0001         |

La tabla 9 es una prueba T de Student. Valores p para comparación de anticuerpos, como se muestra en la tabla 8, tres meses después del refuerzo (última vacunación).

Tabla 9

5

|                          | RTS, RTS,<br>RTS | RTS, RTS,<br>Ad35 | Ad35, RTS,<br>RTS |  | Ad35, Ad35<br>3 Meses | Ad35, Ad35<br>6 Meses |
|--------------------------|------------------|-------------------|-------------------|--|-----------------------|-----------------------|
| RTS, RTS, RTS            |                  |                   |                   |  |                       |                       |
| RTS, RTS, Ad3            | 0.40             |                   |                   |  |                       |                       |
| Ad35, RTS, RT            | 0.12             | 0.59              |                   |  |                       |                       |
|                          |                  |                   |                   |  |                       |                       |
| 10 Ad35, Ad35<br>3 Meses | < 0.0001         | 0.005             | 0.002             |  |                       |                       |
| Ad35, Ad35<br>6 Meses    | < 0.0001         | 0.003             | 0.002             |  | 0.32                  |                       |
| Ad5, Ad35<br>6 Meses     | 0.01             | 0.088             | 0.17              |  | 0.15                  | 0.067                 |

La tabla 10 muestra la relación\* de medias geométricas. Respuestas de células T y B. Se usa Ad35 como una vacuna cebadora.

Tabla 10

20

|                         | Respuesta de células T                      |                                           | Respuesta de células B                      |                                           |
|-------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|
|                         | Relación*<br>(95% conf<br>int)<br>2 Semanas | Relación*<br>(95% conf<br>int)<br>3 Meses | Relación*<br>(95% conf<br>int)<br>2 Semanas | Relación*<br>(95% conf<br>int)<br>3 Meses |
| Ad35, RTS, RTS          | 17.7<br>(4.4-72.1)                          | 17.8<br>(5.1-61.9)                        | 0.61<br>(0.35-0.85)                         | 0.53<br>(0.23-1.22)                       |
| Ad35, Ad35<br>(3 Meses) | 2.5<br>(0.5-12.9)                           | 2.9<br>(0.7-12.5)                         | 0.10<br>(0.05-0.18)                         | 0.15<br>(0.08-0.28)                       |
| Ad35, Ad35<br>(6 Meses) | 1.3<br>(0.3-6.0)                            | 1.7<br>(0.4-7.9)                          | 0.05<br>(0.03-0.10)                         | 0.12<br>(0.07-0.22)                       |

25 \* RTS, RTS, RTS como referencia

La tabla 11 muestra la relación\* de medias geométricas. Respuestas de células T y B. Se usa Ad35 como una vacuna de refuerzo.

Tabla 11

5

|                        | Respuesta de célula T                       |                                           | Respuesta de célula B                       |                                           |
|------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|
|                        | Relación*<br>(95% conf<br>int)<br>2 Semanas | Relación*<br>(95% conf<br>int)<br>3 Meses | Relación*<br>(95% conf<br>int)<br>2 Semanas | Relación*<br>(95% conf<br>int)<br>3 Meses |
| RTS, RTS, Ad35         | 5.3<br>(1.0-29.0)                           | 5.6<br>(1.2-26.1)                         | 1.00<br>(0.54-1.87)                         | 0.69<br>(0.27-1.77)                       |
| Ad5, Ad35<br>(6 Meses) | 2.8<br>(0.6-13.2)                           | 9.2<br>(2.2-39.0)                         | 0.10<br>(0.05-0.22)                         | 0.27<br>(0.11-0.68)                       |

10

\* RTS, RTS, RTS como referencia

La tabla 12 muestra los datos de inmunidad de células T de IFN-γ específicas de PfCS N terminal dos semanas después de vacunación final: ELISpot media y media geométrica (en SFU/millones de células) y comparación ANOVA. Se dan diferentes regímenes cebado/refuerzo (izquierda).

Tabla 12

20

|                      | 2 semanas después de refuerzo |                  |
|----------------------|-------------------------------|------------------|
|                      | Media                         | Media geométrica |
| RTS, RTS, RTS        | 5                             | 4                |
| RTS, RTS, Ad35       | 17                            | 11               |
| Ad35, RTS, RTS       | 130                           | 126              |
| Ad35, Ad35 (3 meses) | 68                            | 78               |
| Ad35, Ad35 (6 meses) | 108                           | 69               |
| Ad5, Ad35 (6 meses)  | 68                            | 72               |
| Ad35 vacío           | 1                             | 2                |
| ANOVA                |                               | P<0.0001         |

25

La tabla 13 es una prueba T de Student. Valores p para comparación ELISpot, como se muestra en la tabla 12, dos semanas después del refuerzo (última vacunación).

Tabla 13

|    |  |                    |                |                |                    |                    |
|----|--|--------------------|----------------|----------------|--------------------|--------------------|
| 5  |  | RTS, RTS, RTS      | RTS, RTS, Ad35 | Ad35, RTS, RTS | Ad35, Ad35 3 Meses | Ad35, Ad35 6 Meses |
|    |  | RTS, RTS, RTS      |                |                |                    |                    |
|    |  | RTS, RTS, Ad3      | 0.12           |                |                    |                    |
|    |  | Ad35, RTS, RT      | < 0.0001       | 0.002          |                    |                    |
|    |  |                    |                |                |                    |                    |
| 10 |  | Ad35, Ad35 3 Meses | 0.0002         | 0.012          | 0.39               |                    |
|    |  | Ad35, Ad35 6 Meses | < 0.0001       | 0.011          | 0.23               | 0.84               |
|    |  | Ad5, Ad35 6 Meses  | < 0.0001       | 0.007          | 0.22               | 0.88 0.94          |

La tabla 14 muestra los datos de inmunidad de células T de IFN-γ específicas de PfCS N terminal tres meses después de vacunación final: ELISpot media y media geométrica (en SFU/millones de células) y comparación ANOVA. Se dan diferentes regímenes cebado/refuerzo (izquierda).

Tabla 14

|    |                      |                             |                  |
|----|----------------------|-----------------------------|------------------|
| 5  |                      | 3 meses después de refuerzo |                  |
|    |                      | Media                       | Media geométrica |
|    | RTS, RTS, RTS        | 3                           | 2                |
|    | RTS, RTS, Ad35       | 12                          | 10               |
|    | Ad35, RTS, RTS       | 32                          | 40               |
| 10 |                      |                             |                  |
|    | Ad35, Ad35 (3 meses) | 25                          | 32               |
|    | Ad35, Ad35 (6 meses) | 30                          | 17               |
|    | Ad5, Ad35 (6 meses)  | 63                          | 55               |
|    |                      |                             |                  |
| 10 | Ad35 vacío           | 3                           | 2                |
|    |                      |                             |                  |
|    | ANOVA                |                             | P<0.0001         |

La tabla 15 es una prueba T de Student. Valores p para comparación ELISpot, como se muestra en la tabla 14, dos semanas después del refuérzo (última vacunación).

Tabla 15

|    |  |                    |                |                |            |            |
|----|--|--------------------|----------------|----------------|------------|------------|
| 15 |  | RTS, RTS, RTS      | RTS, RTS, Ad35 | Ad35, RTS, RTS | Ad35, Ad35 | Ad35, Ad35 |
|    |  |                    |                |                | 3 Meses    | 6 Meses    |
|    |  | RTS, RTS, RTS      |                |                |            |            |
| 20 |  | RTS, RTS, Ad3      | 0.035          |                |            |            |
|    |  | Ad35, RTS, RT      | 0.0305         | 0.066          |            |            |
|    |  |                    |                |                |            |            |
|    |  | Ad35, Ad35 3 Meses | 0.0005         | 0.10           | 0.73       |            |
|    |  | Ad35, Ad35 6 Meses | 0.011          | 0.48           | 0.27       | 0.39       |
| 25 |  | Ad5, Ad35 6 Meses  | < 0.0001       | 0.01           | 0.58       | 0.31       |
|    |  |                    |                |                |            | 0.08       |

La tabla 16 muestra la relación\* de respuesta de células T media geométrica contra el N terminal de PfCS. Se usa Ad35CS como una vacuna de refuerzo.

Tabla 16

5

|                        | Respuesta de células T               |                                    |
|------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
|                        | Relación*(95% conf int)<br>2 Semanas | Relación*(95% conf int)<br>3 Meses |
| Ad35,RTS,RTS           | 32.4 (12.1-87.2)                     | 16.5 (4.7-58.3)                    |
| Ad35,Ad35<br>(3 Meses) | 20.0 (6.1-66.0)                      | 13.2 (4.1-42.3)                    |
| Ad35,Ad35<br>(6 Meses) | 17.9 (6.5-49.4)                      | 7.1 (1.7-29.3)                     |

\* RTS,RTS,RTS como referencia

La tabla 17 muestra la relación\* de respuesta de células T media geométrica contra el N terminal de CS. Se usa Ad35CS como una vacuna de refuerzo.

Tabla 17

10

20

|                    | Respuesta de células T               |                                    |
|--------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
|                    | Relación*(95% conf int)<br>2 Semanas | Relación*(95% conf int)<br>3 Meses |
| RTS,RTS, Ad35      | 2.8 (0.7-10.9)                       | 4.1 (1.1-15.2)                     |
| Ad5,Ad35 (6 Meses) | 18.5 (7.4-46.2)                      | 22.4 (9.8-51.1)                    |

\* RTS,RTS,RTS como referencia

REFERENCIAS

- Bruna-Romero O et al. (2001) Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen. Proc Natl Acad Sci USA 98:11491-11496.
- Caspers P et al. (1989) The circumsporozoite protein gene from NF54, a Plasmodium falciparum isolate used in malaria vaccine trials. Mol Biochem Parasitol 35:185-189.
- Clyde DF et al. (1973) Immunization of men against sporozoite-induced falciparum malaria. Am J Med Sci 266:169-177.
- De Jong JC et al. (1999) Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. J Clin Microbiol 37:3940-3945.
- Doolan DL et al. (1998) DNA vaccination as an approach to malaria control: current status and strategies. Curr Topic Microbiol Immunol 226:37-56.
- Estcourt MJ et al. (2002) Prime-boost immunization generates a high frequency, high-avidity CD8+ cytotoxic T lymphocyte population. Int Immunol 14:31-37.
- Gandon S et al. (2001) Imperfect vaccines and the evolution of pathogen virulence. Nature 414:751-756.
- Gordon DM et al. (1995) Safety, immunogenicity, and

efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine. *J Infect Dis* 171:1576-1585.

Hoffmann SL and Doolan DL. (2000) Malaria vaccines-  
5 targeting infected hepatocytes. *Nature Med* 6:1218-1219.

Horn NA et al. (1995) Cancer Gene Therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials. *Human Gene Therapy* 6:565-573.

Kester KE et al. (2001) RTS,S Malaria Vaccine  
10 Evaluation Group. Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 183:640-647.

Kurtis JD et al. (2001) Pre-erythrocytic immunity to *Plasmodium falciparum*: the case for an LSA-1 vaccine.  
15 *Trends in Parasitology* 17:219-223.

Lalvani A et al. (1999) Potent induction of focused Th1-type cellular and humoral immune responses by RTS.S/SBAS2, a recombinant *Plasmodium falciparum* malaria vaccine. *J Infect dis* 180:1656-1664

20 Lockyer MJ et al. (1989) Wild isolates of *Plasmodium falciparum* show extensive polymorphism in T cell epitopes of the circumsporozoite protein. *Mol Biochem Parasitol* 37:275-280.

Luke TC y Hoffman SL (2003) Rationale and plans for  
25 developing a non-replicating, metabolically active,

radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *J Exp Biol* 206:3803-3808.

Nardin EH et al. (2001) A totally synthetic polyoxime malaria vaccine containing *Plasmodium falciparum* B 5 cell and universal T cell epitopes elicits immune responses in volunteers of diverse HLA types. *J Immunol* 166:481-489.

Mosmann TR y Coffman RL. (1989) TH1 And TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev of Immunol* 7:145-173.

10 Musti AM et al. (1983) Transcriptional mapping of two yeast genes coding for glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase isolated by sequence homology with the chicken gene. *Gene* 25:133-143.

Narum DL et al. (2001) Codon optimization of gene 15 fragments encoding *Plasmodium falciparum* merzoite proteins enhances DNA vaccine protein expression and immunogenicity in mice. *Infect and Immun* 69:7250-7253.

Nussenzweig RS et al. (1967) Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of 20 *Plasmodium berghei*. *Nature* 216:160-162.

Romero P et al. (1989) Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. *Nature* 341:323-326.

Stoute JA et al. (1997) A preliminary 25 evaluation of a recombinant circumsporozoite protein

vaccine against Plasmodium falciparum malaria. N Eng J Med 336:86-91.

Stoute JA et al. (1998) Long-term efficacy and immune responses following immunization with the  
5 RTS,S malaria vaccine. J Infect Dis 178:1139-1144.

Sun PF et al. (2003) Protective immunity induced with malaria vaccine, RTS,S, is linked to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-specific CD4(+) and CD8(+) T cells producing IFN-  
10 gamma. J Immunol 171:6961-6967.

Valenzuela P et al. (1979) Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen. Nature 280:815-819.

15 Vogels R et al. (2003) Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell interaction and bypass of pre-existing adenovirus immunity. J Virol 77:8263.

20 Wang R et al. (2001) Induction of CD4+ T cell-dependent CD8+ type 1 responses in humans by a malaria DNA vaccine. Proc Natl Acad Sci USA 98:10817-10822.

25 Zevering Y et al. (1994) Effect of polymorphism of sporozoite antigens on T-cell

activation. Res Immunol 145:469-476.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el 5 que resulta claro de la presente descripción de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un kit de partes que comprende:  
un adenovirus recombinante con replicación defectuosa  
en un excipiente farmacéuticamente aceptable, dicho  
5 adenovirus comprende un ácido nucleico heterólogo que  
codifica un antígeno de circumsporozoito (CS) a  
partir de un parásito que causa el paludismo, y  
un antígeno proteínáceo coadyudado;  
en donde dicho adenovirus recombinante se selecciona  
10 del grupo que consiste de adenovirus humano serotipo  
11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 y 50, y en donde dicho  
adenovirus recombinante con replicación defectuosa es  
una composición cebadora y dicho antígeno proteínáceo  
coadyudado es una composición de refuerzo.
- 15
2. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación  
1, en donde dicho adenovirus recombinante es el  
adenovirus humano serotipo 35.
- 20
3. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación  
1 o 2, en donde dicho antígeno proteínáceo comprende  
una proteína CS, o un fragmento inmunogénico de la  
misma, de un parásito que causa el paludismo.
- 25
4. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación

- 3, en donde dicho antígeno proteínáceo comprende una proteína híbrida de la proteína CS o un fragmento inmunogénico de la misma, fusionado al antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HBsAg), en la  
5 forma de partículas de lipoproteína con HBsAg.
5. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el antígeno proteínáceo comprende RTS,S.
- 10 6. Un kit de partes de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho antígeno proteínáceo está coadyudado con un adyuvante que comprende QS21 y 3D-MPL.
- 15 7. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación 6, en donde al adyuvante comprende además liposomas que contienen colesterol.
8. Un kit de partes de acuerdo con cualquiera de las  
20 reivindicaciones 1-7, en donde dicho parásito que causa el paludismo es *Plasmodium falciparum*.
9. Un kit de partes de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho ácido nucleico  
25 heterólogo es de codón optimizado para producción

aumentada de la proteína codificada en un mamífero, preferiblemente un humano.

10. Un kit de partes de acuerdo con cualquiera de las  
5 reivindicaciones 1-9, en donde dicho adenovirus recombinante está presente en una mezcla con un adyuvante.

11. Un kit de partes que comprende:

10 un adenovirus recombinante con replicación defectuosa simio, canino o bovino, en un excipiente farmacéuticamente aceptable, dicho adenovirus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de circumsporozoito (CS) de codón  
15 optimizado de Plasmodium falciparum; y un antígeno proteínaceo coadyudado que comprende RTs, S;

en donde dicho adenovirus recombinante con  
20 replicación defectuosa es una composición cebadora y dicho antígeno proteínaceo coadyudado es una composición de refuerzo.

12. Un kit de partes de acuerdo con reivindicación  
25 11, en donde dicho antígeno proteínaceo está

coadyudado con un adyuvante que comprende QS21 y 3D-MPL.

13. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación 5 12, en donde el adyuvante comprende además liposomas que contienen colesterol.

14. Uso de un adenovirus recombinante con replicación defectuosa que comprende un ácido nucleico heterólogo 10 que codifica un antígeno de CS en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención del paludismo, en donde dicho adenovirus recombinante es un adenovirus simio, uno canino, uno bovino o un adenovirus humano serotipo 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 15 o 50, y en donde dicho adenovirus recombinante con replicación defectuosa se usa como una composición cebadora y dicho antígeno proteínaceo coadyudado se usa como una composición de refuerzo.

20 15. Uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde dicho antígeno proteínaceo comprende una proteína CS, o un fragmento inmunogénico de la misma, de un parásito de causa el paludismo.

25 16. Uso de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, en

donde dicho parásito que causa el paludismo es Plasmodium falciparum.

17. Uso de acuerdo con cualquiera de las  
5 reivindicaciones 14-16, en donde dicho antígeno  
proteínáceo comprende una proteína híbrida de la  
proteína CS o un fragmento inmunogénico de la misma  
fusionado al antígeno de superficie del virus de la  
Hepatitis B (HBsAg), en la forma de partículas de  
10 lipoproteína con HBsAg.

18. Uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde  
dicho antígeno protéináceo coadyudado comprende  
RTS,S.

15

19. Uso de acuerdo con cualquiera de las  
reivindicaciones 14-18, en donde dicho antígeno  
proteínáceo está coadyudado con QS21 y 3D-MPL.

20 20. Uso de acuerdo con cualquiera de las  
reivindicaciones 14-19, en donde dicho ácido nucleico  
heterólogo es de codón optimizado para producción  
aumentada de la proteína codificada en un mamífero,  
preferiblemente un humano

25

21. Un método para vacunar un mamífero contra una infección de paludismo, que comprende los pasos de:

- cebar dicho mamífero con un adenovirus recombinante  
5 con replicación defectuosa en un excipiente farmacéuticamente aceptable, dicho adenovirus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de CS de un parásito que causa el paludismo; y  
10 reforzar dicho mamífero con un antígeno proteínáceo coadyudado, que comprende una proteína híbrida de la proteína CS o un fragmento inmunogénico de la misma fusionado al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), en la forma de partículas de  
15 lipoproteína con HBsAg.

22. Un método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicho antígeno proteínáceo comprende RTS,S.

- 20 23. Un método de acuerdo con la reivindicación 21 o 23, en donde dicho adenovirus recombinante es un adenovirus humano, uno simio, uno canino o uno bovino.

- 25 24. Un método de acuerdo con la reivindicación 23, en

donde dicho adenovirus recombinante es un adenovirus humano seleccionado del grupo que consiste de adenovirus humano serotipo 11, 24, 26, 34, 35, 48 y 50.

5

25. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-24, en donde dicho antígeno proteínico está coadyudado con QS21 y 3D-MPL.

10 26. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-25, en donde dicho parásito que causa el paludismo es *Plasmodium falciparum*.

15 27. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-26, en donde dicho ácido nucleico heterólogo es de codón optimizado para producción de la proteína codificada en un mamífero, preferiblemente un humano.

20 28. Un método para vacunar un animal contra una infección por paludismo usando un kit de partes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

25 29. Un método para vacunar un mamífero de acuerdo con

la reivindicación 28, en donde el refuerzo es seguido por uno o más refuerzos posteriores.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Crucell Holland BV  
GlaxoSmithKline Biologicals, S.A.  
Walter Reed Army Institute of Research  
Pau, Maria Grazia  
Goudsmit, Jaap  
Cohen, Joe  
Dubois, Patrice M.  
Stewart, V. Ann  
Heppner, Donald G.

<120> vacunas de cebado/refuerzo contra el paludismo

<130> 0116 WO 00 ORD

<140> PCT/EP 2005/055209

<141> 2005-10-13

<150> US 60/619,056

<151> 2004-10-14

10 <150> EP 04105035.2

<151> 2004-10-14

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 189

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 1

15 Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala  
1 5 10 15

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala  
20 25 30

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala  
35 40 45

20 Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala  
50 55 60

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Lys Asn Asn Gln Gly  
65 70 75 80

Asn Gly Gln Gly His Asn Met Pro Asn Asp Pro Asn Arg Asn Val Asp  
85 90 95

25 Glu Asn Ala Asn Ala Asn Ser Ala Val Lys Asn Asn Asn Asn Glu Glu  
100 105 110

Pro Ser Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser  
115 120 125  
Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile  
130 135 140  
Gln Val Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp Glu Leu  
145 150 155 160  
Asp Tyr Ala Asn Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu Lys Cys  
165 170 175  
Ser Ser Val Phe Asn Val Val Asn Ser Ser Ile Gly Leu  
180 185

5

10

15

20

25

SEQUENCE LISTING

<110> Crucell Holland BV  
GlaxoSmithKline Biologicals, S.A.  
Walter Reed Army Institute of Research  
Pau, Maria Grazia  
Goudsmit, Jaap  
Cohen, Joe  
Dubois, Patrice M.  
Stewart, V. Ann  
Heppner, Donald G.

<120> Malaria prime/boost vaccines

<130> 0116 WO 00 ORD

<140> PCT/EP 2005/055209

<141> 2005-10-13

<150> US 60/619,056

<151> 2004-10-14

<150> EP 04105035.2

<151> 2004-10-14

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 189

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 1

Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala  
1 5 10 15

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala  
20 25 30

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala  
35 40 45

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala  
50 55 60

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Lys Asn Asn Gln Gly  
65 70 75 80

Asn Gly Gln Gly His Asn Met Pro Asn Asp Pro Asn Arg Asn Val Asp  
85 90 95

Glu Asn Ala Asn Ala Asn Ser Ala Val Lys Asn Asn Asn Asn Glu Glu  
100 105 110

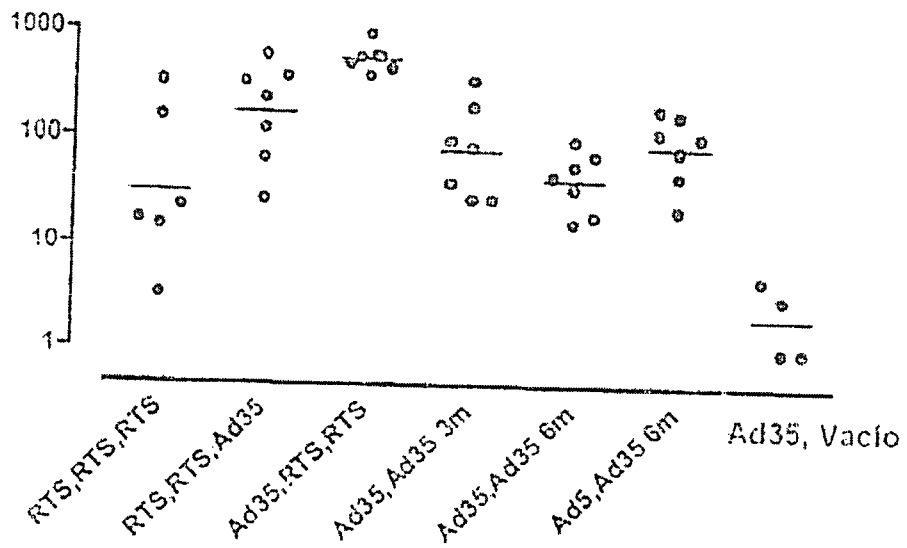
Pro Ser Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser  
115 120 125

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ser | Thr | Glu | Trp | Ser | Pro | Cys | Ser | Val | Thr | Cys | Gly | Asn | Gly | Ile |
| 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gln | Val | Arg | Ile | Lys | Pro | Gly | Ser | Ala | Asn | Lys | Pro | Lys | Asp | Glu | Leu |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Asp | Tyr | Ala | Asn | Asp | Ile | Glu | Lys | Lys | Ile | Cys | Lys | Met | Glu | Lys | Cys |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Ser | Val | Phe | Asn | Val | Val | Asn | Ser | Ser | Ile | Gly | Leu |     |     |     |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     |     |     |

1/12

Fig.1

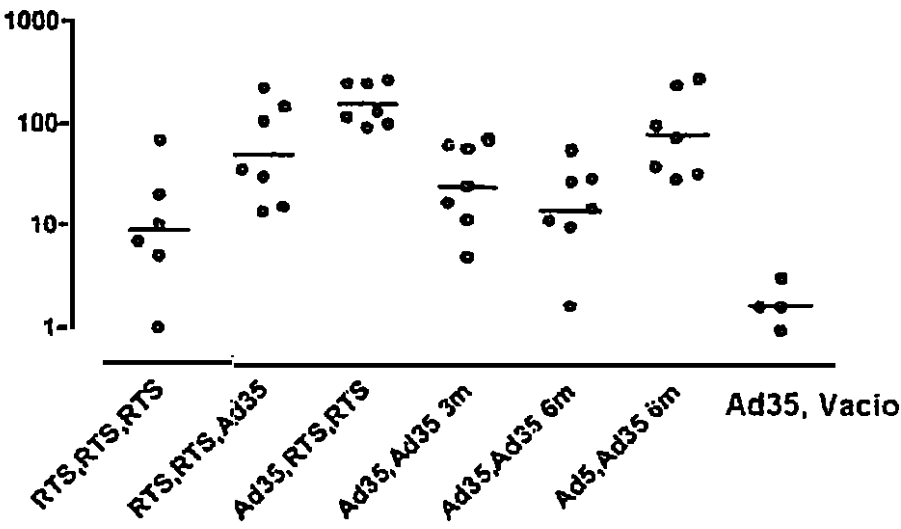
C Terminal de CS 2 Semanas después  
del Refuerzo



2/12

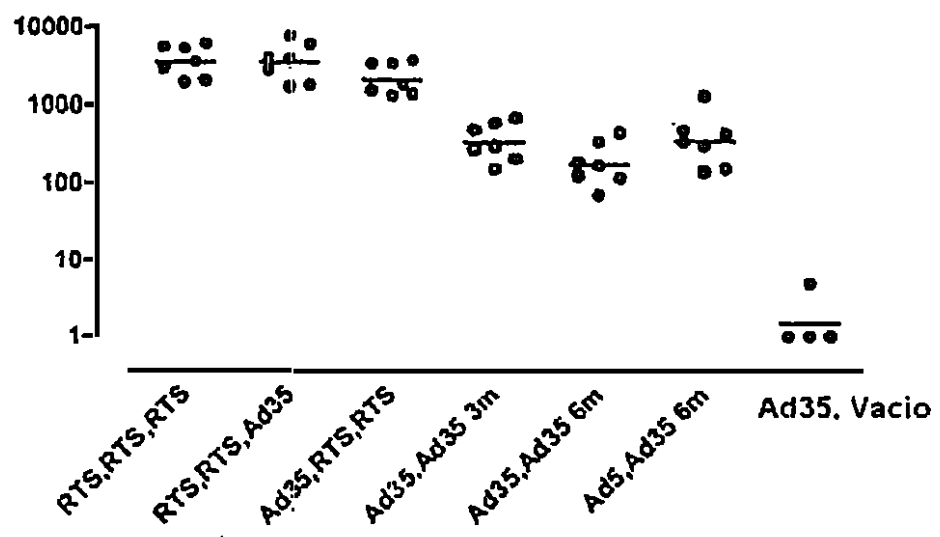
Fig. 2

C Terminal de CS 3 Meses  
Después del Refuerzo



3/12

Fig. 3 Anticuerpos CS 2 Semanas Después del Refuerzo



4/12

Fig. 4

Anticuerpos CS 3 Meses Después  
del refuerzo

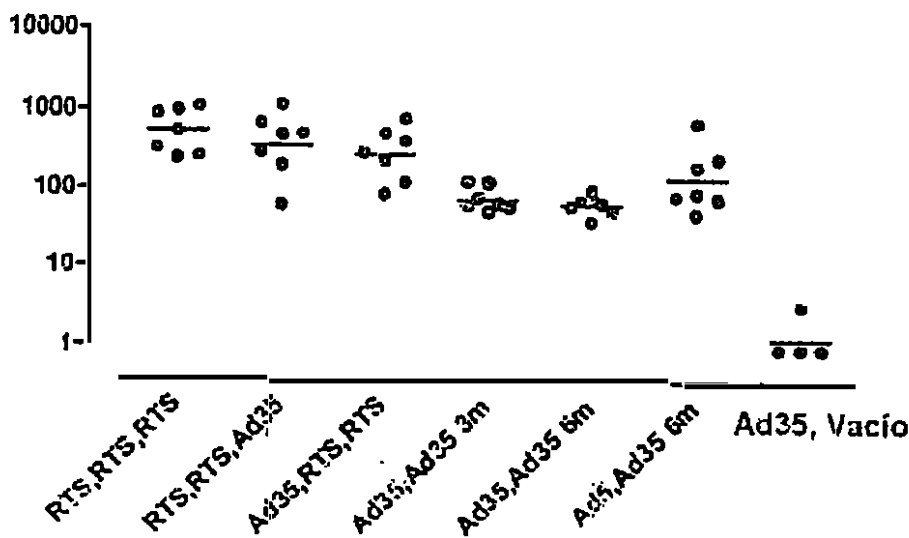
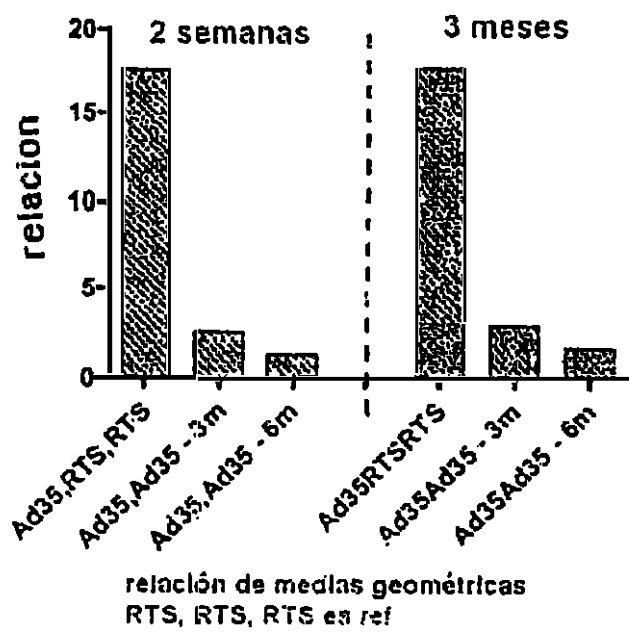


Fig. 5

Cebado con Ad3S Respuesta de  
Célula T.



6/12

Fig. 6

Cebado con Ad3S Respuesta de Célula B

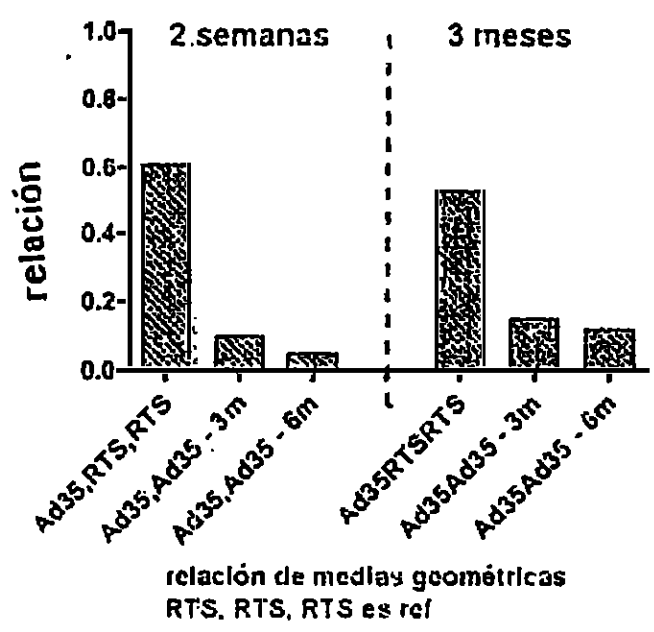


Fig. 7

Refuerzo con Ad3S Respuesta de Célula T

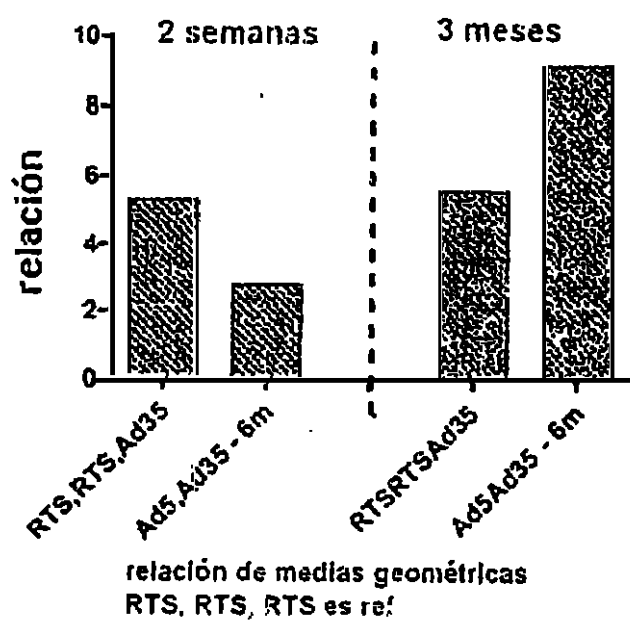


Fig. 8

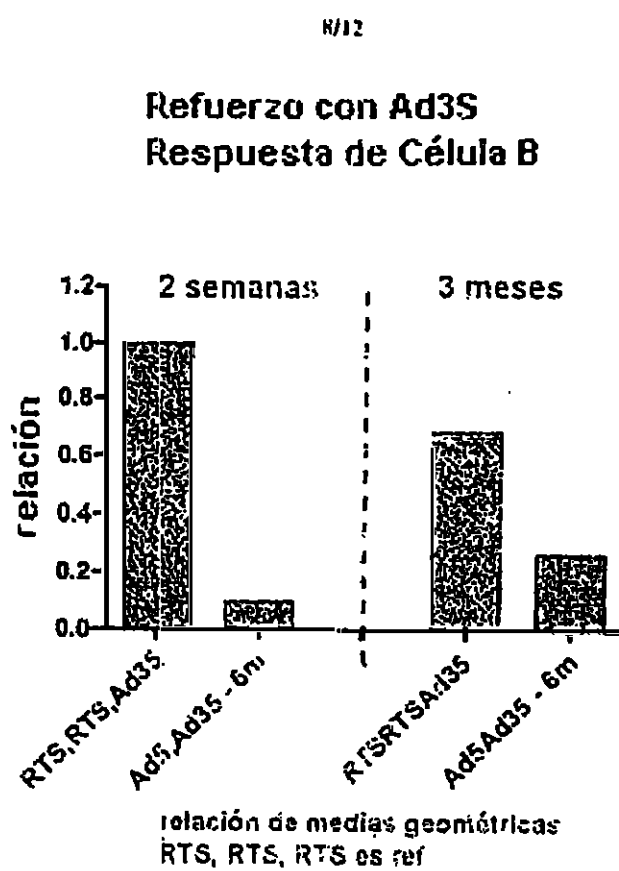
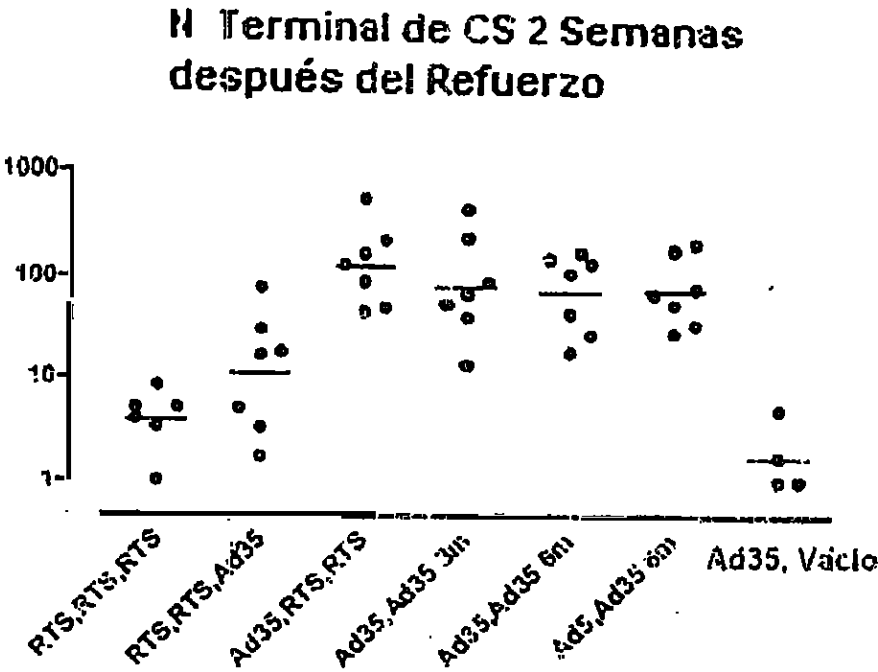


Fig. 9



10/12

Fig. 10

Terminal N de CS 3 Meses  
Después de Refuerzo

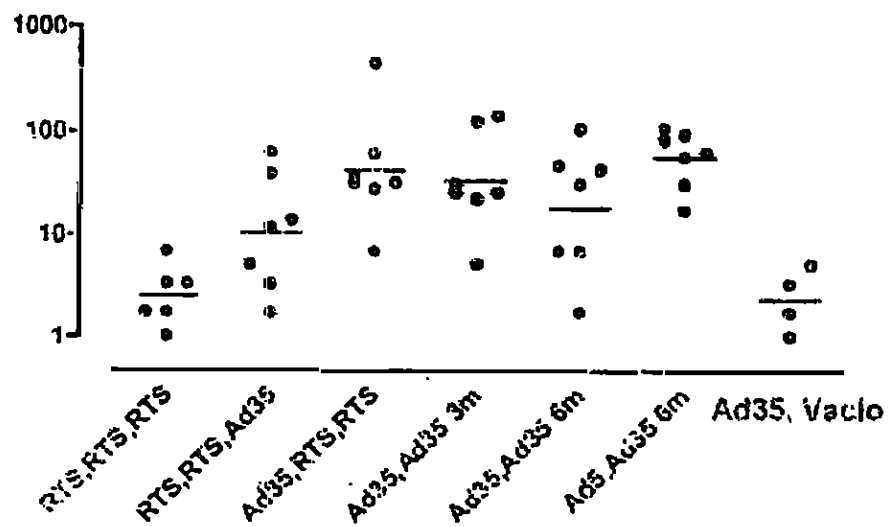
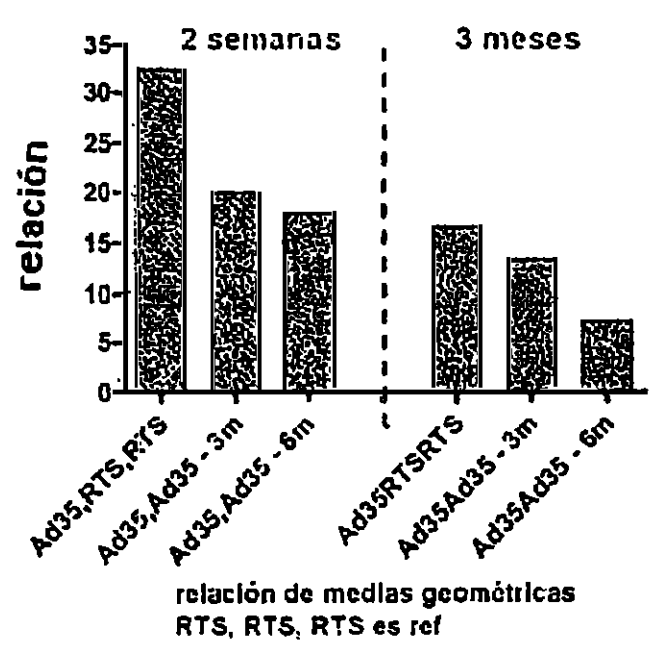


Fig. 11

Cebado con Ad3S Respuesta de Célula T en el H Terminal





No. 07-047232-00000-0000

Fecha: 2007-05-11 15:52:14 Dep. 2020 NUECREACIONES  
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 171

## REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION [ x ]

MODELO DE UTILIDAD [ ]

- ◇ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X] 1
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X] 1
- ◇ Descripción de la invención [X] 64
- ◇ Dibujos de ser estos pertinentes [X] 160
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas [X] 2

COMPLETA [ ]

INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- ◇ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- ◇ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ]

INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- ◇ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- ◇ Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ]

INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_  
Conmutador: 3 82 08 40

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Fax: 350 52 20  
E-mail: [info@sic.gov.co](mailto:info@sic.gov.co)  
[www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co)  
Bogotá, D.C., Colombia

772

**REPUBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

Bogotá,  
2020

Doctor(a)  
LLOREDA RICAURTE ALICIA

|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 7 47232           |
|            | Solicitud internacional    | PCT/EP2005/055209 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 14/05/2007        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 379               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 | 9886'             |

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, deben legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

3. Debe aclarar el nombre del solicitante, por cuanto la publicación internacional difiere del petitorio presentado en fase nacional.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA  
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

973

Radicación No.: 7 47232



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL  
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de  
fecha \_\_\_\_\_  
adpall

187 AGO 2007

12/12

Fig. 12

Refuerzo con Ad3S Respuesta de  
Célula T en el N Terminal

