

REIAL ACADÈMIA DE FARMÀCIA DE CATALUNYA

VACUNACIÓ CONTRA LA MALÀRIA. PERSPECTIVA HISTÒRICA, IMMUNOGENICITAT I REPTES DE FUTUR

DISCURS

Llegit en l'acte de recepció de l'Acadèmica corresponent

Dra. Carlota Dobaño Lázaro

Celebrat el dia 27 de gener de 2014

Barcelona 2014

ÍNDEX

Preàmbul: agraïments i introducció.....	3
OBJECTIUS.....	5
ETIOLOGIA, CICLE VITAL i COMPLEXITAT DE LA MALÀRIA	5
EVIDÈNCIES QUE INDUIR IMMUNITAT CONTRA LA MALÀRIA ÉS POSSIBLE	9
FASES INICIALS DEL DESENVOLUPAMENT DE VACUNES CONTRA LA MALÀRIA.....	10
VACUNES PER A PREVENIR LA INVASIÓ CEL·LULAR DEL PARÀSIT DE LA MALÀRIA	12
Antígens pre-eritrocítics: PfCSP, PfTRAP	12
Antígens eritrocítics del merozoït: PfMSP-1, PfMSP-3, PfAMA-1	13
VACUNES PER A PREVENIR L'ADHESIÓ A CÈL·LULES DIANA I LA PATOLOGIA DE LA MALÀRIA	15
Antígens eritrocítics de la superfície de l'eritrocit infectat: PfEMP-1	15
Toxines: glicosil fosfatidil inositol (GPI).....	15
VACUNES PER A PREVENIR LA TRANSMISSIÓ DE LA MALARIA	16
Antígens de fases sexuals: Pf230, Pf45/48.....	16
DESENVOLUPAMENT CLÍNIC DE LA VACUNA EXPERIMENTAL DE LA MALÀRIA RTS,S	16
Assaigs clínics de fase II a l'Àfrica.....	17
Assaigs clínics de fase III a l'Àfrica	17
ESTUDIS D'IMMUNOGENICITAT DE LES VACUNES EXPERIMENTALS DE LA MALÀRIA	19
VACUNOLOGIA: FORMULACIONS I ADJUVANTS.....	21
VACUNAR CONTRA LA MALÀRIA AMB PARÀSITS SENCERS	22
Esporozoïts atenuats per irradiació.....	22
Paràsits atenuats genèticament (GAP)	23
Infecció amb esporozoïts sota quimioprofilaxi amb cloroquina (CPS)	23
Infecció amb dosis ultra-baixes de paràsits	24
SITUACIÓ ACTUAL I PRESPECTIVES DE FUTUR	24
Bibliografia.....	25

VACUNACIÓ CONTRA LA MALÀRIA. PERSPECTIVA HISTÒRICA, IMMUNOGENICITAT I REPTES DE FUTUR

Preàmbul: agraïments i introducció

**Excel·lentíssim Senyor President,
Molt il·lustres Senyores i Senyors Acadèmics,
Senyores i Senyors
Estimats familiars, amigues i amics,**

Vull que les meves primeres paraules siguin d'expressió sincera del meu profund reconeixement a la Junta de Govern de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya en haver acceptat el meu nomenament com a Acadèmica Corresponent d'aquesta docta Corporació. Agraïment que faig extensiu als Doctors Àngel Lázaro i Porta, Oriol Valls i Planells i Ramon Canela i Arqués, membres numeraris d'aquesta Acadèmia, que, al seu moment, varen signar la proposta de concessió d'aquest títol a la meva persona.

Abans d'entrar en matèria m'agradaria situar d'on va sorgir el meu interès per la recerca en malària, quines han estat les motivacions per la meva carrera professional, i fer un breu repàs de la trajectòria que m'ha dut fins aquí.

Des de la meva infantesa al col·legi Lestonnac sempre m'havia cridat molt l'atenció quan les religioses de l'escola explicaven les seves experiències com a missioneres a l'Àfrica. Recordo mirar i escoltar amb força interès les diapositives on mostraven la seva feina solidària, tot i que en aquell moment no em plantejava escollir una professió que tingués relació amb aquesta temàtica. De fet, durant molts anys no vaig tenir gens clar què volia ser de gran.

Al batxillerat, sempre em van agradar més les assignatures de biologia, química i biomedicina, i em va semblar que la carrera de Farmàcia aglutinava d'una manera molt aplicada aquestes ciències. Un cop a la universitat de seguida em va atreure molt l'assignatura de parasitologia, tot i que els primers anys no em plantejava precisament dedicar-me a la investigació.

El punt d'inflexió va venir arrel d'una experiència de voluntariat a un camp de treball a Guinea Equatorial organitzat per les Carmelites Missioneres, un cop acabat el tercer curs de la carrera. Aquell estiu a l'oest de l'Àfrica vaig viure de primera mà el gran impacte que suposava la malària per a la gent amb qui vivíem. Vam veure en directe els estralls que causava el paludisme a l'hospital de Bioko. Vam comprovar com els nens sovint estaven amb febre i no venien a escola, i com els pares no anaven a treballar per patir aquesta malaltia. Em va sobtar el contrast tan gran que hi havia entre la magnitud del problema, el desconeixement a casa nostra, i el poc accent que s'hi posava a les carreres biomèdiques.

Durant els últims anys a la universitat, em vaig anar interessant progressivament pel tema de la medicina tropical, seguint àvidament a la premsa les notícies que s'anaven publicant

de metges i científics com el Dr. Manel Corachan a l'hospital Clínic, el Dr. Manuel Patarroyo i un jove Dr. Pedro Alonso durant els primers assaigs de la vacuna contra la malària SPf66, de la que tant es va parlar uns anys, abans de ser abandonada. En aquells darrers anys de carrera ja vaig tenir clar que la meua vocació estaria lligada a combatre aquesta malaltia tan letal i de la que encara coneixíem tan poc. Al cinquè curs vaig escollir les especialitzacions que permetien seguir estudiant parasitologia i també biologia molecular mentre anava rumiant la idea de dedicar-me a la recerca en aquest àmbit.

Un cop llicenciada vaig estar un any col·laborant a la secció de Parasitologia de la Facultat de Farmàcia en el grup de la Dra. Montserrat Portús dintre d'un projecte de recerca en leishmaniosi. Durant aquest temps vaig estar sol·licitant beques i buscant finançament per sortir a l'estranger a estudiar un Màster que em donés no només una formació més especialitzada de la que rebíem a la carrera sinó també la possibilitat de fer un doctorat en temes de malària, especialment en vacunes.

Al 1993 vaig iniciar una carrera de 9 anys a l'estranger aprenent a fer recerca i endinsant-me en la comunitat científica de la malària. Primer completant un Màster de biologia molecular de les malalties infeccioses a la *London School of Hygiene and Tropical Medicine*, la qual cosa em va permetre establir moltes connexions amb el món de la Salut Internacional i tanmateix em va obrir les portes per a treballar a d'altres institucions.

Seguidament a Edinburgh, Escòcia, fins al 1999, fent el doctorat amb la Dra. Jana McBride en l'estudi de respostes immunes contra la malària, amb estades de camp inoblidables a Malawi. Allà vaig tenir l'oportunitat de treballar amb investigadors i pediatres molt compromesos en la recerca dels mecanismes fisiopatològics de la malària.

I finalment vaig a anar a parar a Maryland, als Estats Units, fins el 2002, amb una estada postdoctoral amb la Dra. Denise Doolan als laboratoris del Programa de Malària de la *US Navy*, que em va permetre treballar en models animals i aprendre sobre el desenvolupament de vacunes contra la malària.

Vaig tornar a Barcelona i al gener del 2003 em vaig incorporar a l'equip del Dr. Pedro Alonso, al Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB), on hi treballa des de llavors en recerca en malària, fent estades periòdiques al centre col·laborador de Moçambic, on desenvolupem la majoria dels nostres projectes de recerca.

OBJECTIUS

La malària o paludisme és una de les malalties infeccioses més devastadores i antigues de la humanitat. Durant aquesta presentació coneixerem millor perquè és una malaltia tan difícil de controlar i erradicar. Destacaré alguns dels principals reptes i dificultats per a desenvolupar una vacuna, repassaré els esforços i avenços que s'han anat assolint, i les perspectives de futur.

Aprofundiré especialment en allò que constitueix la meua àrea de recerca, centrada en la comprensió dels mecanismes immunes induïts pel paràsit durant una infecció natural, i dels mecanismes immunes induïts per les vacunes experimentals, fent un repàs de la feina que fem al CRESIB. Acabaré la presentació delineant quines serien les prioritats i els plans d'investigació pels propers anys.

ETIOLOGIA, CICLE VITAL i COMPLEXITAT DE LA MALÀRIA

La malària als humans pot ser causada per cinc espècies diferents de protozous del gènere *Plasmodium*. Les dues espècies més importants són el *Plasmodium falciparum* i el *Plasmodium vivax*. El primer paràsit predomina a l'Àfrica subsahariana i és el que provoca més mortalitat; el segon paràsit, el *P. vivax*, és el més estès a nivell global, i responsable d'una gran morbiditat al sud-oest asiàtic, Amèrica Llatina i Oceania. En aquesta presentació ens centrarem fonamentalment en el *P. falciparum*.

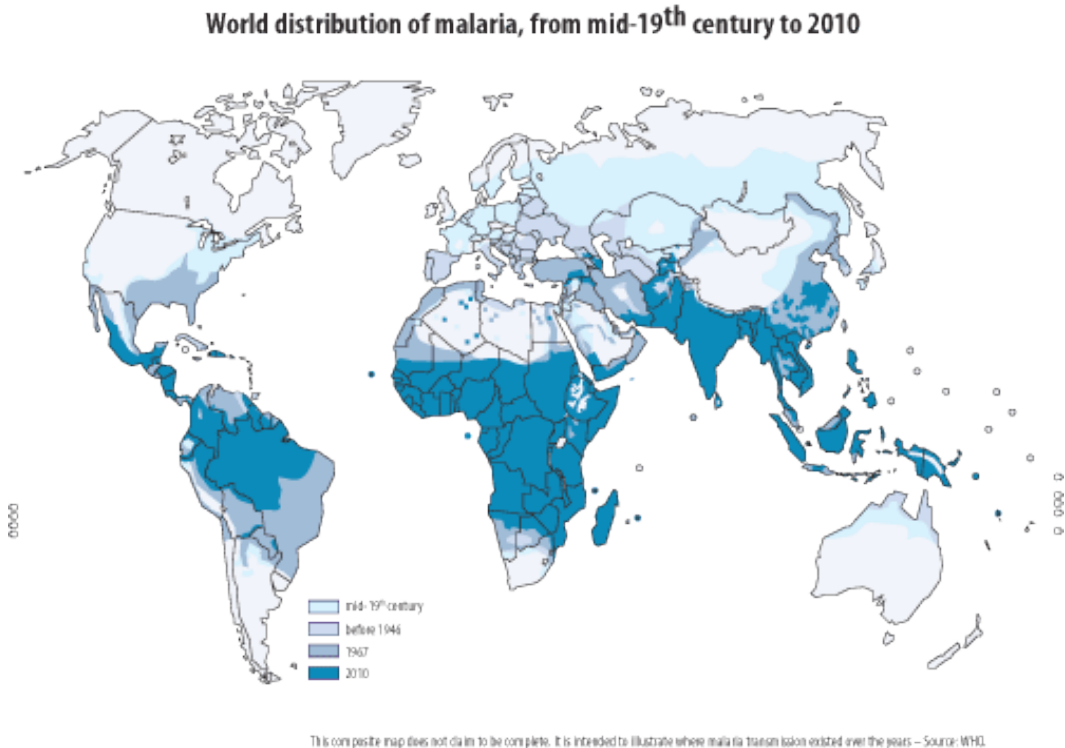


Figura 1. Mapa de distribució de la malària (Font: Organització Mundial de la Salut)

Tot i que la càrrega real de la malaltia és molt difícil de quantificar, i que la tendència a nivell global és a disminuir, els informes anuals de la Organització Mundial de la Salut (OMS) permeten fer-nos una idea de la magnitud del problema. En l'actualitat, la meitat de la població mundial segueix estant a risc de contraure la malària, a un total de 106 països considerats com a endèmics (Figura 1). La OMS estima que al 2010 van haver-hi uns 216 milions de casos de malària i uns 655.000 morts, 91% de les quals a l'Àfrica, i 86% en nens menors de 5 anys (*World Malaria Report 2011*). Un altre grup especialment susceptible és el de les dones embarassades, en les quals la malària provoca conseqüències adverses per la salut materna i infantil, podent arribar fins a la mort.

L'impacte de la malaltia a nivell socioeconòmic també és molt significatiu. S'estima que la malària requereix una despesa en salut del 15% del pressupost nacional als països endèmics, i el seu cost econòmic resulta en una pèrdua del 1,3% del creixement del producte interior brut per any a l'Àfrica. Mentre no es disposi d'una vacuna eficaç per a prevenir la malària, el seu control es basa actualment en accelerar el diagnòstic (darrerament millorat per l'ús de proves de diagnòstic ràpid), els tractaments basats en combinacions de fàrmacs d'artemisinines, l'ús de xarxes mosquiteres impregnades i el ruixat intra domiciliari amb insecticides contra el mosquit transmissor. Malgrat aquestes intervencions, els paràsits i mosquits desenvolupen resistències als fàrmacs i insecticides, respectivament. Per tant és necessari produir contínuament noves teràpies i mesures per a controlar i eventualment erradicar la infecció palúdica, incloses les vacunes.

La primera complexitat associada al paràsit radica en la seva gran plasticitat. El *Plasmodium* passa per múltiples fases de desenvolupament segons el teixit parasitat, transformant successivament la seva morfologia i composició molecular. Per completar el seu cicle vital, el paràsit necessita infectar dos hostes, un vertebrat (en aquest cas l'home) i un invertebrat (el mosquit vector). La femella del mosquit *Anopheles* injecta el paràsit al torrent sanguini en forma d'esporezoït durant la picada (Figura 2). Després d'uns minuts en circulació sanguínia l'esporezoït envaeix les cèl·lules hepàtiques, on es multiplica de manera asexual formant uns cossos multinuclears anomenats esquizonts, que posteriorment es lisen i lliuren milers de merozoïts a la sang. La **fase hepàtica o pre-eritrocítica** és asimptomàtica i dura entre 5 i 10 dies segons l'espècie de plasmodi.

Els merozoïts ràpidament envaeixen els glòbuls vermells i inicien una altra fase de maduració i replicació anomenada **fase eritrocítica asexual**. Durant aquesta fase, els paràsits es transformen des d'unes formes joves anomenades anells, creixen a trofozoïts i finalment se divideixen fins a unes formes madures o esquizonts. Un cop lisats, els eritròcits infectats lliuren desenes de merozoïts a la sang. En aquest moment es produeix la primera simptomatologia de la malària, caracteritzada per un intens pic de febre, tremolors, dolors musculars, etc, i es poden observar al microscopi òptic les formes característiques en gotes grosses de sang que permeten el diagnòstic etiològic. En mostres de sang perifèrica només són visibles les formes immadures (anells) doncs les madures (trofozoïts i esquizonts) es troben segregades als òrgans profunds mitjançant mecanismes moleculars d'adhesió que impedeixen que els paràsits siguin eliminats a la melsa. L'adherència dels paràsits madurs a capil·lars sanguinis de les vísceres està associada a patologies perilloses com ara el coma i la malària cerebral que és la manifestació més letal de la malària greu (Figura 3). Si la infecció no es controla a nivell immunològic o amb tractament

farmacològic, els merozoïts envaeixen nous eritròcits i perpetuen el cicle, i això pot portar a una anèmia greu i a d'altres complicacions vitals (respiratòries, renals, hepàtiques), fins i tot a la mort.

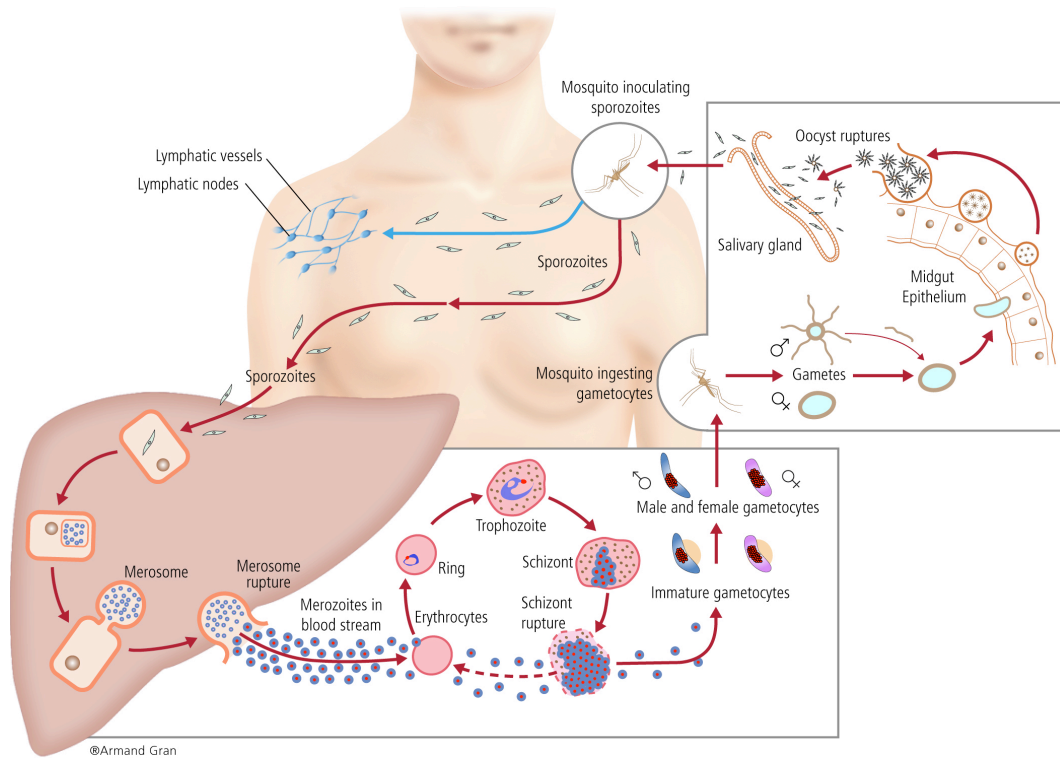


Figura 2. Cicle vital del paràsit *Plasmodium falciparum* (Font: CRESIB)

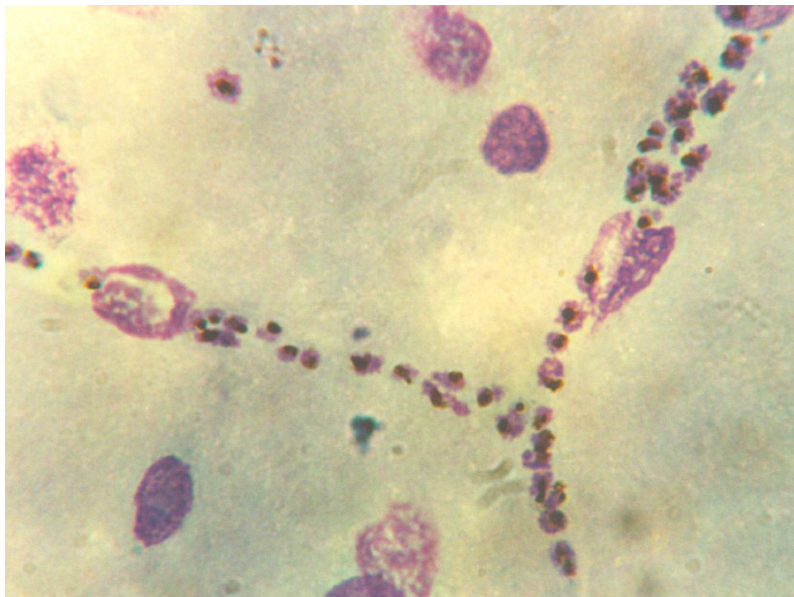


Figura 3. Paràsits madurs a capil·lars sanguinis en teixits cerebrals *post mortem*. (Font: C. Dobaño, Malawi)

Durant el desenvolupament i multiplicació sanguinis, alguns paràsits es diferencien en **formes sexuades** (gametòcits masculins i femenins) que constitueixen les formes infectives pel mosquit i que permeten la seva transmissió en ser ingerits durant una altra picada. Un cop al mosquit es produeix la fecundació i el zigot resultant evoluciona i es desplaça fins a convertir-se en l'esporezoït que envaeix les glàndules salivaries, des d'on podrà infectar una altra persona durant la propera picada.

Aquesta metamorfosi continua del paràsit de la malària condiciona la capacitat del sistema immune humà per a poder controlar la infecció. Una infecció presenta milers de proteïnes al sistema immune, que són diferents a cada fase del cicle vital del protozou. Més encara, els fàrmacs i les vacunes actuen de manera específica a cadascuna d'aquestes fases. Això vol dir que si, per exemple, una proteïna a la superfície de l'esporezoït fos una diana d'anticossos protectors, aquests anticossos en general no reconeixrien les proteïnes expressades posteriorment a la fase sanguínia asexual del cicle vital del paràsit, fins i tot si aquells anticossos fossin induïts a nivells molt elevats mitjançant la vacunació.

La segona complexitat associada al *Plasmodium* radica en el seu gran tamany. Es tracta d'un patògen molt més complex que un virus, un bacteri o un fong. De fet, encara no ha estat possible desenvolupar cap vacuna contra paràsits humans d'aquestes característiques. La seqüència del genoma de 26-30 megabases del *P. falciparum*, publicada al 2002 a la prestigiosa revista *Nature* (Gardner *et al.* 2002), consta de fins a 6.000 gens en 14 cromosomes. Una complicació addicional és que moltes de les proteïnes produïdes per aquests gens són polimòrfiques o variants. Això vol dir que la majoria dels antígens exposats al sistema immune són diversos entre soques diferents del paràsit, i/o tenen la capacitat de variar durant el curs d'una infecció clonal. D'aquesta manera, el paràsit evadeix la resposta immune a través de la presentació d'epítops diversos. Aquesta diversitat antigènica constitueix sens dubte un dels reptes més importants pel desenvolupament de vacunes per a prevenir la malària.

Una altra raó per la qual ha estat molt difícil desenvolupar vacunes contra el plasmodi és la complexitat de la pròpia resposta immune humana. Aquesta resposta és en gran part un reflex de la genètica humana, l'edat de l'hoste i la dinàmica de transmissió del paràsit. El paràsit i l'home han conviscut durant molts segles i certament la infecció palúdica ha modelat el genoma humà. Una prova d'això és que l'espècie humana ha retingut al·lèls deletaris a alguns dels seus gens perquè al llarg de l'evolució han protegit contra la malària. Per exemple, poblacions africanes que viuen en zones endèmiques de malària tenen una freqüència més elevada d'individus heterozigots per a hemoglobinopaties com l'anèmia falciforme o les talassèmies, perquè aquests trets evolutius els hi ha proporcionat una avantatge per estar associats a un menor risc de malària (tot i que els mecanismes fisiològics són desconeguts). Finalment, la epidemiologia de la malària, que depèn de la intensitat i estacionalitat de la transmissió del paràsit, condiciona el patró d'adquisició d'immunitat natural enfront del paràsit i es desenvolupa d'una manera diferencial segons el patró d'exposició a la infecció palúdica. Aquest fet té implicacions a l'hora d'entendre quins mecanismes poden ser responsables de l'adquisició d'immunitat.

EVIDÈNCIES QUE INDUIR IMMUNITAT CONTRA LA MALÀRIA ÉS POSSIBLE

Fins ara he assenyalat quines són les principals dificultats per a lluitar contra el paràsit de la malària i desenvolupar mesures de control eficaces. Ara em centraré en quins són els motius per tenir esperances que aquesta infecció es pot prevenir i curar. Malgrat totes les complexitats esmentades, dues observacions fonamentals recolzen el concepte que és factible induir una immunitat contra el *Plasmodium* i per tant és factible desenvolupar una vacuna.

En primer lloc, les persones que viuen en àrees on la malaltia és endèmica i estan exposades a repetides infeccions per *P. falciparum* des del naixement desenvolupen una immunitat clínica. Aquesta immunitat consisteix en una disminució amb l'edat de la incidència de la malària acompanyada normalment d'una disminució important de la densitat parasitària als individus infectats. D'això se'n diu **immunitat natural adquirida**. Aquesta immunitat en primer lloc protegeix de la mort i la malària greu, seguidament de la simptomatologia i finalment de la infecció, encara que mai completament, per això s'anomena "no esterilitzant". Com a resultat, en zones de transmissió estable de malària, la gravetat de la infecció es concentra en els dos primers anys de vida, disminueix després dels 5-10 anys d'edat i pot portar als nens més grans i als adults a períodes amb infecció parasitària, sovint submicroscòpica, però sense símptomes clínics. En aquests casos, la presència de paràsits sovint es pot detectar només per tècniques moleculars més sensibles com la reacció en cadena de la polimerasa o "PCR". No deixa de ser sorprenent com una infecció que en certes circumstàncies pot ser tan letal, en altres circumstàncies pot esdevenir asimptomàtica i perdurar en sang sense aparentment conseqüències clíniques per a l'individu. En zones de baixa endemicitat, però, on la transmissió de la malària és inestable o epidèmica, aquest patró canvia completament, de manera que la immunitat natural no s'adquireix d'una manera tan eficaç i la infecció per *Plasmodium* pot desencadenar conseqüències greus també en adults.

Malgrat conèixer-se les característiques epidemiològiques d'aquesta immunitat protectora (Doolan, Dobaño & Baird 2009), encara no se sap amb certesa quins són els seus principals determinants. De què depèn que s'adquireixi aquesta immunitat? Depèn fonamentalment del patró i freqüència d'exposició a la infecció? Hi ha soques de *Plasmodium* més virulentes que d'altres? O depèn de factors intrínsecs de l'hoste, com l'edat i la maduresa del sistema immune? Fins ara no ha sigut possible destriar entre aquestes possibilitats i s'han proposat hipòtesis en totes direccions.

De manera similar, es desconeixen els mecanismes immunes subjacents a l'adquisició d'immunitat natural i aquesta ignorància ha estat el principal impediment per al desenvolupament racional d'una vacuna per la malària. Després de nombrosos estudis sobre la resposta immune humana contra *P. falciparum*, no ha estat possible definir amb certesa quins dels 5000-6000 antigens contribueixen principalment a la immunitat, ni identificar les respostes de l'hoste que es correlacionin amb aquesta immunitat. Donada la complexitat del paràsit i la quantitat de respostes immunes que poden estar involucrades, és probable que múltiples mecanismes efectors dirigits contra múltiples antigens expressats en múltiples fases del cicle vital siguin rellevants en la protecció. Trobar aquestes "signatures" de

protecció és matèria d'intensa recerca, sobretot actualment que disposem de les noves eines que ens proporciona les tecnologies de les òmiques.

L'única evidència clara de la importància d'un component del sistema immune en la protecció contra la malària prové dels estudis clàssics de transferència passiva d'anticossos conduïts per metges anglesos a principis dels anys seixanta (Cohen, McGregor & Carrington 1961). Així, el tractament de nens tailandesos amb una infecció aguda per *P. falciparum* amb **immunoglobulines** (Ig) purificades a partir de sang d'adults immunes d'Àfrica de l'oest va resultar en una disminució dràstica de la parasitemia i la curació d'aquest nens. Aquests experiments van ser reproduïts als anys noranta per investigadors francesos (Sabchareon *et al.* 1991), que van proposar que anticossos citofílics (IgG1, IgG3) específics de proteïnes de superfície del merozoït són mecanismes efectors antiparasitaris que intervenen en aquesta protecció. Encara que no es coneix l'especificitat d'aquestes Ig protectores, es creu que les activitats fagocítiques i fixadores del complement, així com acció aglutinadora d'antígens variables de superfície d'eritròcits infectats, estarien associades al control de la infecció en fases sanguínies. Estudis immunoepidemiològics van mostrar una certa correlació entre l'activitat aglutinadora del sèrum *in vitro* i un menor risc prospectiu de malària clínica (Marsh *et al.* 1989).

En contraposició a les respostes humorals, no hi ha evidències sòlides del paper de les respostes cel·lulars en el desenvolupament de la immunitat en humans, en part per les limitacions a l'hora d'estudiar-les en poblacions infantils africanes. Es creu que l'acció combinada de diverses cèl·lules leucocitàries (monòcits/macròfags, *natural killers*, linfòcits) i la producció de certes citocines i quimiocines, determinen l'equilibri entre resposta protectora i patogènica.

La segona evidència de que és possible induir una immunitat contra la malària, en aquest cas d'una manera experimental, deriva de la prova de concepte duta a terme als Estats Units d'Amèrica a finals dels anys seixanta. Els insignes malariòlegs Nussenzweig van demostrar que la immunització de ratolins amb picadures de mosquits amb esporozoïts atenuats per irradiació protegia enfront una infecció per *Plasmodium* (Nussenzweig *et al.* 1967). Aquest fet, primer demostrat en models animals, inclosos simis, es va reproduir posteriorment en humans i va obrir la via per al desenvolupament de les primeres vacunes experimentals contra la malària, inicialment enfocades en atacar les fases pre-eritròcítiques de la infecció.

FASES INICIALS DEL DESENVOLUPAMENT DE VACUNES CONTRA LA MALÀRIA

Un cop establert el principi que la immunització experimental amb el plasmodi atenuat era capaç d'induir una protecció immune enfront infeccions experimentals amb plasmodi, es va iniciar la cursa per a desenvolupar la primera vacuna. En aquestes fases inicials i durant 3 dècades es va treballar sota la premissa que la immunització amb esporozoïts sencers irradiats generada per picada de mosquit, tot i ser altament eficaç, no era lògicament factible per produir-se industrialment ni implementar-se a gran escala. Per tant, els esforços es van centrar en identificar antígens específics del *P. falciparum* que poguessin induir una immunitat similar a l'observada amb el paràsit sencer. Aquesta assumpció ha estat

recentment qüestionada, obrint una de les àrees de recerca en vacunes de malària més engrescadores en l'actualitat. Aquest capítol, però, el reprendrem cap al final de la presentació.

Durant els anys setanta, doncs, el primer gran repte al que s'enfrontaven els vacunòlegs era definir quin(s) antígen(s) del paràsit, entre els milers possibles que s'intuïen, era el més rellevant i podria esdevenir la base d'una primera vacuna sub-unitària. De cara a seleccionar proteïnes candidates a formar part de futures vacunes, es van seguir una sèrie de criteris racionals:

- Les proteïnes havien de ser abundantment expressades al paràsit.
- Les proteïnes havien de ser preferentment expressades a la superfície del paràsit, de manera que serien accessibles al sistema immune.
- Les proteïnes havien de ser essencials per a propagar el cicle vital del paràsit, per exemple intervenint en mecanismes d'invasió o d'adhesió a cèl·lules diana, o d'evasió del sistema immune.
- El bloqueig d'aquestes proteïnes mitjançant mecanismes immunes efectors idealment havia de mitigar els efectes patològics de la infecció, com l'anèmia greu, la malària cerebral, o la malària placentària durant l'embaràs.

Donades les múltiples fases del cicle vital del paràsit, el resultat de la vacunació variaria en funció de la fase en que s'expressés la proteïna seleccionada com a candidata a vacuna:

- Si la proteïna s'expressa en fase pre-eritrocítica, la resposta immune induïda estarà encaminada a frenar el desenvolupament del paràsit al fetge, i per tant a interrompre la infecció posterior en sang. Aquestes són les anomenades **vacunes pre-eritrocítiques** que sí són eficaces poden prevenir la malaltia.
- Si la proteïna s'expressa en fase eritrocítica asexual, la resposta immune induïda estarà encaminada a frenar la multiplicació del paràsit als eritròcits, i per tant a disminuir la densitat parasitària i mitigar la simptomatologia i patogènia. Aquestes són les anomenades **vacunes eritrocítiques** que tot i no prevenir la infecció sanguínia, si són eficaces poden prevenir la morbiditat i la mort.
- Si la proteïna s'expressa en fase eritrocítica sexual o al mosquit, la resposta immune induïda estarà encaminada a frenar la transmissió del paràsit al mosquit o el seu desenvolupament a dins del mosquit. Aquestes van ser anomenades **vacunes bloquejadores de la transmissió**, i tot i no prevenir la infecció sanguínia i la morbiditat a l'individu vacunat, sí són eficaces poden tenir un impacte a nivell poblacional en reduir la transmissió del paràsit (per això també es van anomenar "vacunes altruístiques").

Abans d'endinsar-nos en quins han estat els antígens més investigats i testats com a vacunes experimentals a cadascuna d'aquestes estratègies, cal esmentar que els avenços assolits durant els anys setanta i vuitanta van ser possibles per dues fites científiques fonamentals:

- L'establiment del cultiu *in vitro* del *P. falciparum* per Trager i Jensen (1976), un punt d'inflexió en la recerca de la malària que ha permès estudiar el paràsit a nivell molecular. Fins a dia d'avui, però, i malgrat els esforços de molts investigadors, encara no ha estat possible trobar les condicions idònies per a mantenir en cultiu l'altre paràsit humà rellevant des del punt de vista sanitari, el *P. vivax*. Això constitueix un gran coll d'ampolla que en gran mesura explica perquè la recerca en *P. vivax* està més endarrerida que la recerca en *P. falciparum*.
- El *boom* de la biologia molecular i l'era del clonatge genètic, que va permetre descobrir i expressar la majoria dels gens que codifiquen les proteïnes que van ser posteriorment explotades com a possibles vacunes

VACUNES PER A PREVENIR LA INVASIÓ CEL·LULAR DEL PARÀSIT DE LA MALÀRIA

Les vacunes candidates capdavanteres han estat aquelles que inclouen antigens involucrats en la invasió de les formes pre-eritrocítiques o eritrocítiques del *P. falciparum* a cèl·lules diana de l'hoste. La invasió cel·lular és un procés complex on hi participen seqüencialment múltiples proteïnes, moltes d'elles redundants. És improbable que una vacuna basada en una sola proteïna pugui ser suficient per a frenar el cicle vital, per tant la majoria d'estratègies es basen en vacunes multi-antigèniques.

Antigens pre-eritrocítics: PfCSP, PfTRAP

Arrel del descobriment que els esporozoïts atenuats eren capaços d'induir una immunitat estèril, els primers investigadors es van centrar en identificar els antigens expressats a aquest estadi. El primer antigen identificat va ser la *circumsporozoïte surface protein* (CSP), la principal proteïna de la superfície de l'esporozoït, implicada en la invasió de les glàndules salivals del mosquit, la mobilitat del paràsit i la invasió dels hepatòcits. A més a més, CSP és diana de respostes immunes humanes després de l'exposició a la infecció natural. CSP té una mida molecular de 58 kD i conté una regió central de repetició de seqüències d'aminoàcids flanquejada a cada costat per una regió no repetitiva. La regió central conté aproximadament 41 repeticions d'aminoàcids de seqüències NANP (asparagina, alanina, asparagina, prolina) i un nombre menor de seqüències NVDP (asparagina, valina, àcid aspàrtic, prolina). La funció de la regió de repetició central és encara desconeguda, però probablement ofereix un avantatge adaptatiu significatiu al paràsit, ja que està altament conservada entre diferents soques de *P. falciparum*. Aquesta regió és immunodominant i conté epítops de limfòcits B que són la principal diana dels anticossos induïts per CSP. La regió N-terminal de CSP està millor conservada entre les soques de *P. falciparum* i conté un motiu de 5 aminoàcids involucrat en la unió i invasió cel·lulars. La regió C-terminal també està implicada en la invasió i la mobilitat, però a diferència de la N-terminal, és molt polimòrfica. La regió C-terminal conté tant epítops reconeguts per limfòcits B com per limfòcits T (denominats T_H2R i T_H3R) que mostren un alt nivell de polimorfisme als aminoàcids. Això teòricament podria derivar en la selecció de paràsits amb seqüències de CSP divergents a les seqüències del serotip de la vacuna, que podrien escapar la seva acció i eventualment portar a una menor eficàcia, tot i que els estudis que hem dut a terme fins ara no han mostrat evidències d'aquesta mena de selecció

(Enosse, Dobaño *et al.* 2006). CSP és la base de la vacuna més avançada i que tractarem després en un capítol separat.

Un altre antigen de fase pre-eritrocítica desenvolupat com a vacuna per investigadors de la Universitat d'Oxford és la *thrombospondin related adhesive protein* (TRAP), una proteïna essencial per a la mobilitat de l'esporezoït, i que a diferència de la CSP presenta una sèrie d'epítops amb seqüències conservades reconegudes per limfòcits T d'individus africans exposats a malària.

Antígens eritrocítics del merozoït: PfMSP-1, PfMSP-3, PfAMA-1

En paral·lel als avenços de les vacunes pre-eritrocítiques, als anys vuitanta es va obrir una línia de recerca per desenvolupar vacunes eritrocítiques adreçades a prevenir la malaltia. Els antígens escollits com a candidats a vacuna estaven expressats als merozoïts (formes infectives dels hematies) i complien una sèrie de requisits:

- Els individus de zones endèmiques de malària tenen alts nivells d'anticossos IgG al seu plasma contra aquestes proteïnes. Aquests anticossos, normalment dels isotips citofílics IgG1 i IgG3, s'adquireixen amb un patró característic dependent de l'edat en paral·lel a l'adquisició de la immunitat protectora (Figura 4)

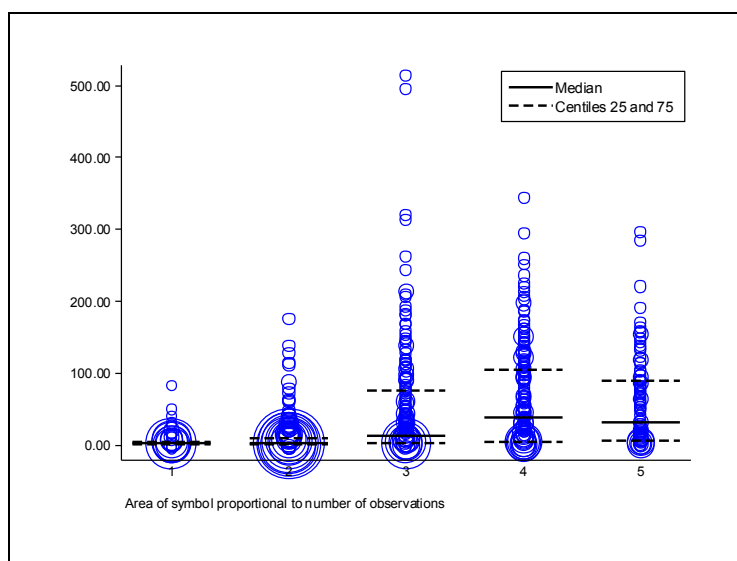


Figura 4. Patró característic de nivells d'anticossos IgG contra antígens de *P. falciparum* de fase sanguínia adquirits durant els primers 5 anys de vida en nens africans (Font: J.J. Campo & C. Dobaño, CRESIB).

- Anticossos que reconeixen aquests antígens bloquegen la invasió dels merozoïts als eritròcits i/o la multiplicació intracel·lular *in vitro*.
- Immunització de models animals (ratolins i micos) amb vacunes basades en aquests antígens protegeix enfront una infecció experimental amb *P. falciparum*.

Dintre d'aquest grup d'antígens, la família més extensa està constituïda per les proteïnes de la superfície del merozoït (*merozoite surface proteins*, MSP). La més abundant i estudiada és la PfMSP-1, que cobreix tota la superfície del merozoït. Aquesta proteïna és molt gran i presenta múltiples dominis, alguns conservats i altres polimòrfics. El desenvolupament de vacunes s'ha centrat en el fragment C-terminal, molt immunogènic en poblacions endèmiques i únic tros que persisteix al merozoït després de la invasió de l'eritrocit. Una vacuna basada en aquesta proteïna va ser portada a assajos clínics a l'est d'Àfrica però malgrat les fortes expectatives creades, no va resultar eficaç. Un possible motiu del fracàs d'aquesta vacuna és que el serotip inclòs en la formulació no coincidia amb el principal serotip dels paràsits circulants a la població on es va testar. Ara per ara, el futur de vacunes basades en aquest antigen és dubtós.

Un cas especial és el de la proteïna PfMSP-3. Aquest antigen va ser descobert per científics de l'Institut Pasteur durant els experiments de transferència passiva d'anticossos dels anys noranta, esmentats anteriorment. Els investigadors francesos van establir que l'activitat anti-parasitària observada *in vivo* correlacionava amb la capacitat d'anticossos específics de PfMSP-3 d'inhibir el creixement *in vitro* del *P. falciparum*, en cooperació amb monòcits. Aquest mecanisme anomenat *antibody dependent cellular inhibition* (ADCI) depenia de l'activitat citofíllica dels anticossos IgG1 i IgG3 contra PfMSP-3 i es va proposar com a mecanisme responsable de l'adquisició d'immunitat contra la malària. El problema és que aquests experiments *in vitro* no han estat reproduïts a d'altres laboratoris i per tant no és un model universalment acceptat per la comunitat científica. Malgrat aquests dubtes, PfMSP-3 ha estat desenvolupada com a vacuna i testada a assajos clínics a l'oest d'Àfrica amb resultats preliminars prometedors.

El darrer antigen d'aquest bloc s'anomena *apical membrane antigen* (PfAMA-1). Es tracta d'una proteïna essencial per a la invasió de l'eritrocit i que indueix els títols d'anticossos específics més elevats coneguts durant infeccions naturals (Campo, Dobaño *et al.* 2009). La seqüència d'aminoàcids de PfAMA-1 conté un número elevat de mutacions puntuals que genera una diversitat serològica important. Una vacuna basada en un serotip d'aquesta proteïna va estar portada a assaigs clínics a l'oest d'Àfrica. Malgrat no resultar eficaç a l'anàlisi primari, un sub-anàlisi centrat en individus infectats amb paràsits del mateix serotip que l'antigen de la vacuna va mostrar una certa protecció contra la malària. Per tant, com la resposta induïda per aquesta vacuna és específica de soca, s'ha proposat que la vacuna PfAMA-1 només serà eficaç si inclou una combinació dels principals serotips presents a les poblacions del paràsit. Estudis recents han definit que es necessita un mínim de 3-4 serotips de PfAMA-1 per induir una immunitat eficaç que cobreixi totes les soques de paràsit circulant, i aquesta és la formulació de la segona generació de vacunes PfAMA-1 que properament serà testada en assaigs clínics.

Finalment, una nova proteïna ha estat proposada recentment com el possible taló d'Aquil·les del *P. falciparum*. Es tracta de la proteïna del merozoït PfRH5, que s'uneix al seu receptor *basigin* a l'eritrocit, i és essencial per a la invasió. Segons un treball publicat al 2011 a la revista *Nature* (Crosnier *et al.* 2011), el bloqueig d'aquestes molècules impedeix completament la invasió i el paràsit no mostra mecanismes d'infecció alternatius, contràriament al que s'ha observat amb d'altres antígens. Tot i que aquesta proteïna no

sembla estar exposada al sistema immune en condicions naturals, ara per ara constitueix el candidat més esperançador per a una futura vacuna de fase eritrocitària.

VACUNES PER A PREVENIR L'ADHESIÓ A CÈL·LULES DIANA I LA PATOLOGIA DE LA MALÀRIA

Antígens eritrocítics de la superfície de l'eritròcit infectat: PfEMP-1

Als anys noranta es va obrir una nova línia de recerca en vacunes de la malària arran del clonatge de l'anomenada *erythrocyte membrane protein* (PfEMP-1), expressada a la superfície dels eritròcits infectats. Aquesta proteïna, altament complexa i de gran mida, està codificada per una família de gens variants (*var genes*) amb 50-60 còpies al genoma del *P. falciparum* de les que en un moment donat només s'expressa una variant. La seva estructura es divideix en diversos dominis anomenats *duffy binding domains* (DBL), cadascun dels quals té afinitat d'unió a receptors cel·lulars específics de l'hoste com l'ICAM-1, el CD36 o el CSA. PfEMP-1 és un antígen molt atractiu com a diana d'estratègies d'immunització experimental per dos motius:

- PfEMP-1 és la principal responsable de l'adherència dels paràsits madurs a receptors cel·lulars de l'hoste, i per tant la seva expressió està associada al segrest de paràsits als òrgans profunds. Com he esmentat, l'acumulació de paràsits en teixits vitals és un dels principals mecanismes fisiopatològics de la malària cerebral i la malària placentària durant l'embaràs.
- PfEMP-1 és també la responsable del fenomen de la variació antigènica, que propicia l'evasió del sistema immune i la perpetuació de les infeccions palúdiques, d'una manera similar al que s'ha descrit pel protozou de la tripanosomiasi africana.

Vacunes basades en dominis o fragments de la PfEMP-1 tenen com a objectiu principal induir anticossos que bloquegin l'adherència o aglutinació dels paràsits a cèl·lules i teixits humans i la posterior patologia. La majoria d'aquestes vacunes estan encara en fases pre-clíniques i desconeixem com funcionaran en assaigs clínics en humans. Malgrat el concepte de les vacunes basades en PfEMP-1 és força atractiu, la gran diversitat antigènica d'aquestes proteïnes pot resultar un gran handicap per a la seva definitiva implementació.

Toxines: glicosil fosfatidil inositol (GPI)

Finalment, dintre de les vacunes dirigides a les fases eritrocítiques del paràsit, existeixen les "vacunes anti-tòxiques" desenvolupades a laboratoris australians i americans (Schofield *et al.* 2002). Aquestes vacunes es basen en un concepte diferent enfocat a induir una resposta immune contra toxines del paràsit resultants de reaccions immuno-patològiques exacerbades, de manera que no controlarien la parasitemia sinó que la malaltia associada. Les dianes més estudiades són molècules no proteiques de naturalesa glicolípida, com el GPI, que tenen funció d'ancoratge d'alguns dels antígens esmentats anteriorment (com PfMSP-1) a la membrana del paràsit. L'objectiu d'aquestes vacunes és induir anticossos específics contra GPI que neutralitzin aquesta possible toxina palúdica. Una de les dificultats més grans per a desenvolupar-les a gran escala ha sigut estandarditzar la síntesi d'aquestes substàncies a nivell industrial amb la puresa requerida per grau GMP.

VACUNES PER A PREVENIR LA TRANSMISSIÓ DE LA MALÀRIA

Antígens de fases sexuals: Pf230, Pf45/48

El darrer tipus de vacunes de malària està basat en induir respostes neutralitzants mitjançant anticossos que reconeguin antígens expressats als gametòcits, les formes sexuals del paràsit que són infectives pel mosquit transmissor. Tot i que fa temps que els dos principals antígens candidats van ser identificats i clonats (Pf230 i Pf45/48), les vacunes bloquejadores de la transmissió van estar negligides durant molts anys perquè no es consideraven tan prioritàries com les anteriors. La situació ha canviat radicalment recentment arrel la iniciativa *MalERA* coordinada des del CRESIB pel Dr. Pedro Alonso.

Impulsat per la Fundació Bill i Melinda Gates i ràpidament secundada tant per l'OMS com per la comunitat científica, s'ha produït un canvi de paradigma des del *control* cap a l'*erradicació* de la malària. *MalERA* va consistir en un procés sistemàtic de consulta a experts a nivell global per a definir plegats l'agenda científica d'investigació que hauríem de desenvolupar per a erradicar la malària (Alonso *et al.* 2011). Fruit d'aquest procés de reflexió i intercanvi, una de les recomanacions més importants en l'àmbit de les vacunes ha estat que per assolir l'eliminació de la malaltia les vacunes havien d'estar dirigides a reduir la transmissió del paràsit. Aquesta recomanació ha estat adoptada per la majoria d'organismes internacionals que ara han col·locat com a prioritària la recerca en aquest tipus de vacunes, i per tant l'increment en el seu finançament resultarà ben aviat en una acceleració del desenvolupament clínic.

DESENVOLUPAMENT CLÍNIC DE LA VACUNA EXPERIMENTAL DE LA MALÀRIA RTS,S

RTS,S és el candidat de vacuna antipalúdica clínicament més avançat al món. Es tracta d'una proteïna recombinant que fusiona una part de la CSP amb l'antigen de superfície del virus de l'hepatitis B, i s'estructura en forma de partícules virals. Es tracta, doncs, d'una vacuna dual que tant podria prevenir la malària com l'hepatitis B. En combinació amb un sistema d'adjuvants (AS0) patentat per GlaxoSmithKline (GSK), RTS,S indueix la producció d'anticossos i limfòcits T contra CSP i està encaminada a disminuir la capacitat del paràsit de la malària per infectar, desenvolupar-se, i sobreviure al fetge humà. En els assaigs clínics, RTS,S va ser la primera vacuna candidata a demostrar que pot protegir els nens petits i els nadons en àrees endèmiques de malària contra la infecció i la malaltia clínica causada per *P. falciparum*.

La vacuna RTS,S va ser creada el 1987 per científics dels laboratoris de GSK en estreta col·laboració amb el *Walter Reed Army Institute of Research* dels Estats Units. Aquest institut de recerca militar americà des de fa molts anys inverteix en el desenvolupament de noves vacunes i fàrmacs per a combatre la malària, ja que durant la segona guerra mundial el plasmodi va matar més soldats americans que la pròpia batalla.

L'avaluació clínica de la RTS,S es va iniciar en soldats als Estats Units el 1992, i adults a l'Àfrica el 1998. Al 2001, GSK i *PATH Malaria Vaccine Initiative* (MVI), amb diners de la Fundació Bill i Melinda Gates, van entrar en una aliança públic-privada per al desenvolupament de la vacuna pel seu ús en nens a l'Àfrica subsahariana, en col·laboració

amb múltiples centres de recerca africans, europeus i americans. Entre ells es troben les dues institucions on hi treballa: el CRESIB a Barcelona i el *Centro de Investigaçao em Saude da Manhiça* (CISM) a Moçambic, un dels 6 països que contribueix al 60% de les morts per malària. Des de mitjans de la dècada dels noranta al centre de Manhiça es va establir un programa de recerca en les malalties de la pobresa, entre elles la malària com a causa principal de la mortalitat a la zona. Quan es van iniciar els assaigs clínics pediàtrics de fase IIB de la vacuna candidata RTS,S, GSK i PATH-MVI van escollir aquest centre per a desenvolupar l'estudi fonamental que determinaria si la vacuna progressava o no en el seu desenvolupament clínic cap el registre.

Assaigs clínics de fase II a l'Àfrica

Així doncs, al 2003 es va iniciar l'assaig clínic de fase IIB més gran dut a terme fins aleshores, amb més de 2.000 nens. Aquest estudi va demostrar la viabilitat de l'administració d'una vacuna contra la malària als nens entre 1 i 4 anys. Les troballes d'aquest estudi, publicat a la revista mèdica *The Lancet* (Alonso *et al.* 2004, 2005), van mostrar que la RTS,S va ser eficaç durant almenys 18 mesos en la reducció de la malària clínica en un 35%, i la malària greu en un 49%. Posteriorment, es van seguir els nens vacunats per 4 anys i es va mostrar que la vacuna era capaç d'induir una protecció a llarg termini contra la malària fins a 45 mesos després de la vacunació inicial (Sacarlal *et al.* 2009).

Al 2007 es va completar a Manhiça un segon assaig clínic de fase I/IIB, aquest cas en lactants (Aponte *et al.* 2007). L'estudi va mostrar que després d'un cicle complet de vacunació, RTS,S va reduir la infecció en un 65% durant un període de tres mesos de seguiment. El perfil de seguretat i tolerabilitat va ser similar al de les vacunes del programa ampliat de vacunacions (PAV) comunament administrades als nadons. L'estudi va ser el primer a establir la prova de concepte d'eficàcia de qualsevol candidat de vacuna contra la malària en nadons.

Al 2008 es van completar altres dos estudis de fase IIB a Kenya i Tanzania en lactants i nens petits, aquest cop amb una modificació a l'adjuvant de la formulació de la RTS,S (AS01 en comptes d'AS02). Els resultats dels dos assaigs clínics publicats a la revista *The New England Journal of Medicine* van demostrar que la RTS,S pot proporcionar una protecció significativa contra la infecció palúdica i la malaltia clínica. Als nens d'entre 5 i 17 mesos van mostrar que RTS,S redueix el risc d'episodis clínics de malària en un 53% en un període de seguiment de 8 mesos (Bejon *et al.* 2008). L'estudi dels nadons va demostrar per primera vegada que, quan s'administra juntament amb les vacunes del PAV, RTS,S manté els nivells d'eficàcia (Abdulla *et al.* 2008). Tots dos estudis van demostrar un perfil de seguretat prometedora.

Assaig clínic de fase III a l'Àfrica

Després d'aquests resultats positius, RTS,S va ser el primer candidat de vacuna contra la malària a arribar el 2009 a un assaig clínic de fase III, l'última etapa de desenvolupament abans del seu registre. Aquest assaig clínic multicèntric d'eficàcia a gran escala es va dissenyar per determinar addicionalment l'eficàcia i confirmar la seguretat de la vacuna candidata a la població diana. L'estudi està en marxa en 11 centres de 7 països africans

(Moçambic, Gabon, Tanzània, Ghana, Kenya, Malawi i Burkina Faso). Aquest assaig ha reclutat fins a 16.000 nadons i nens i es tancarà durant el 2014.

Els primers resultats de l'assaig de fase III en nens petits de 5 a 17 mesos d'edat es van publicar al 2011. L'eficàcia de la vacuna durant els 14 mesos després de la primera dosi es va estimar en 55,8% contra la malària clínica i 47,3% contra la malària greu (*The RTS,S Clinical Trials Partnership* 2011). Tot i l'esperançador d'aquests resultats inicials, es van trobar evidències que l'eficàcia de la vacuna disminueix amb el temps, en contrast amb els resultats de l'assaig de fase IIb de Moçambic.

Al 2012 es van publicar els resultats d'eficàcia de RTS,S per lactants de 6 a 12 setmanes d'edat, el grup més vulnerables i que més es beneficiaria d'una vacuna eficaç contra la malària. En aquests nadons, l'eficàcia de la vacuna durant els 14 mesos posteriors a la primera dosi es va estimar en un 31,3% contra la malària clínica i un 36,6% contra la malària greu (*The RTS,S Clinical Trials Partnership* 2012), més baixes del que s'esperava. A més a més, un mes després de l'administració de la tercera dosi de RTS,S, els títols d'anticossos anti-CSP mostraven uns nivells significativament inferiors als dels nens de 5 a 17 mesos d'edat.

L'estudi no s'ha acabat i fins el 2014 s'obtindran dades addicionals que acabaran de definir l'eficàcia global i específica de la vacuna RTS,S a l'assaig de fase III:

- Es publicarà quin és l'efecte de la intensitat de transmissió de la malària en l'eficàcia de la vacuna. El patró d'endemicitat de la malària és molt divers entre les poblacions on s'ha fet l'assaig. Hi ha zones de transmissió molt baixa, altres de transmissió moderada i altres de transmissió altíssima. Fins el 2013 les anàlisis s'havien fet sense diferenciar les àrees geogràfiques, però és possible que aquesta heterogeneïtat afecti diferencialment l'eficàcia i longevitat de la vacuna.
- S'avaluarà quin és l'efecte d'una quarta dosi de vacuna. Fins ara l'esquema de vacunació s'havia basat en 3 dosis separades per un mes. Per intentar allargar l'eficàcia de la vacuna, es va introduir una dosi de record 17 mesos després de la tercera immunització, i properament sabrem si això proporciona algun benefici.

Davant tots aquests resultats, una sèrie de qüestions resten obertes, algunes de les quals van ser recollides a l'editorial de la revista *The New England Journal of Medicine* que va publicar els darrers resultats de l'assaig de fase III:

- Per què la immunogenicitat i la protecció de la vacuna difereixen entre nens de 6 a 12 setmanes i nens de 5 a 17 mesos d'edat? Quin és el rol dels anticossos materns?
- Per què en certes circumstàncies la durada de l'eficàcia protectora de la vacuna és llarga (fins a 4 anys, a l'assaig de fase IIb de Moçambic) mentre que en d'altres circumstàncies la durada de l'eficàcia de la vacuna és curta (menys d'un any, a l'assaig de fase III)?
- Cóm influeix la transmissió de la malària en l'eficàcia de la vacuna i en la durada del seu efecte protector?

- Quins són els mecanismes d'acció immunològics induïts als nens protegits per la vacuna?
- Quines són les cèl·lules immunes i els mecanismes immunològics que s'han d'activar per a induir una immunitat perdurable?

Totes aquestes qüestions fonamentals són el nucli del projecte de recerca que estem duent a terme al grup d'Immunologia de la Malària del CRESIB, i pel qual hem aconseguit finançament competitiu del setè programa marc en salut de la Unió Europea (FP7) i dels instituts nacionals de salut dels Estats Units d'Amèrica (*National Institutes of Health*, NIH). Desenvoluparem un extens estudi immunològic durant els propers quatre anys en col·laboració amb set centres de recerca africans participants en l'assaig multicèntric de fase III. L'objectiu final d'aquest projecte de recerca és entendre les bases immunològiques de la protecció parcial induïda per la vacuna RTS,S i els factors determinants de la seva durabilitat, per així poder dissenyar d'una manera més racional la següent generació de vacunes millorades contra la malària.

ESTUDIS D'IMMUNOGENICITAT DE LES VACUNES EXPERIMENTALS DE LA MALÀRIA

És necessari aprofundir en l'estudi dels mecanismes immunològics induïts per la RTS,S i per les altres vacunes experimentals esmentades perquè encara no es coneix el seu mode d'acció. Encara que pugui semblar sorprenent, aquestes vacunes han estat desenvolupades d'una manera molt empírica (iteracions de prova i error) i no sabem encara perquè en alguns casos funcionen i perquè en d'altres no; es a dir, no disposem encara de correlats immunes de protecció. Part del problema ve donat perquè tampoc sabem quins són els mecanismes immunes responsables de l'adquisició de la immunitat natural contra la malària, com he esmentat anteriorment. Per això seguim investigant en paral·lel de quina manera les respostes immunes contra aquests antígens candidats a vacuna induïdes en condicions d'infecció natural contribueixen al control de la malària. Això inclou tant el mapeig més fi dels epítops de limfòcits B i T d'aquests antígens, com l'anàlisi de les cèl·lules efectores i els mediadors immunes (anticossos i citocines) que ataquen la infecció.

Sabem que la vacuna RTS,S és capaç d'induir uns títols molt elevats d'anticossos IgG contra la regió central de l'antigen CSP (Aide, Dobaño *et al.* 2009). Aquests nivells són molt superiors als que CSP indueix en condicions d'infecció natural, segurament en part per la brevetat en que el sistema immune està exposat als esporozoïts infectants. Per tant, si el mode d'acció de la vacuna fos explicat per la quantitat d'anticossos, en aquest cas el mecanisme seria diferent al que actua durant una infecció natural. Malgrat ser molt immunogènica des del punt de vista serològic, els alts nivells d'anticossos induïts per la RTS,S no correlacionen prou bé amb la protecció enfront la malària clínica. Per tant, estem investigant si la protecció ve donada per la qualitat d'aquests anticossos més que per la quantitat, es a dir, si el subtip, l'afinitat i avidesa i la seva capacitat funcional són responsables de la protecció parcial assolida. Una dificultat que ens trobem a l'hora d'estudiar la funcionalitat dels anticossos de fases pre-eritrocítiques és que no disposem encara d'assaigs *in vitro* prou estandarditzats com per analitzar d'una manera reproduïble si

els anticossos específics de CSP són capaços de neutralitzar la mobilitat de l'esporezoït o la invasió de les cèl·lules de l'hoste.

Les vacunes experimentals eritrocítiques basades en antígens com PfMSP-1, PfMSP-3 i PfAMA-1 han estat dissenyades per a induir alts nivells d'anticossos IgG, als quals s'atribueix l'acció protectora antiparasitària. Per tant la seva immunogenicitat s'avalua mitjançant tècniques estàndard d'*enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) i, quan és possible, també la seva funcionalitat. En models animals, la magnitud de la resposta d'IgG influeix en els nivells de protecció assolits per les vacunes experimentals. Malgrat això, en humans ens trobem amb una certa paradoxa. Al contrari del que passa amb els antígens pre-eritrocítics com CSP, els antígens eritrocítics com PfMSP-1 i PfAMA-1 ja són normalment molt immunogènics en condicions naturals, és a dir, els nens petits ja poden tenir alts nivells d'anticossos contra aquestes proteïnes en plasma, i malgrat això, no sempre estan protegits contra la malària. Per tant, no està tan clar quin és l'avantatge que aporta la vacunació amb aquests antígens. Per tant, actualment el que els investigadors intenten és avaluar la qualitat i funcionalitat dels anticossos induïts per la vacuna. En el cas de PfMSP-1 i PfAMA-1 disposem d'un assaig estandarditzat anomenat *Growth Inhibition Assay* (GIA) que mesura la capacitat dels IgG purificats per a reduir el creixement *in vitro* del *P. falciparum*. De tota manera, encara no hi ha un consens a la comunitat científica sobre si el GIA realment reflexa un mecanisme antiparasitari existent *in vivo*, donat que en estudis d'immunitat natural els resultats sobre la correlació entre GIA i protecció són contradictoris. En relació a PfMSP-3, ja hem esmentat que existeix un assaig anomenat ADCI que mesura la capacitat dels IgG per a disminuir el creixement *in vitro* del *P. falciparum* en cooperació amb monòcits, però aquesta prova ha estat impossible d'estandarditzar i per tant la seva significança continua sent incerta.

Les respostes cel·lulars induïdes per RTS,S i les vacunes eritrocítiques han estat molt menys estudiades. En general, s'ha descrit que la RTS,S és capaç d'induir en nens i adults respostes moderades de limfòcits T *helper* (T_H) CD4⁺ productors d'interleucines (IL)-2, interferó gamma (IFN- γ) i factor de necrosis tumoral (TNF), que són possibles mediadors o marcadors de protecció contra el paràsit. Magrat això, en humans ha estat molt difícil poder demostrar la inducció de respostes de limfòcits T CD8⁺. En models animals la protecció associada a la vacunació amb esporozoïts irradiats i amb antígens homòlegs de CSP ve donada fonamentalment per l'acció dels limfòcits T CD8⁺ mitjançant mecanismes clàssics citolítics i/o mitjançant la secreció de citocines com IFN- γ i TNF. A més a més, s'ha demostrat que la participació de les cèl·lules *natural killer* (NK) i dels limfòcits T_H CD4⁺ també són fonamentals per assolir uns nivells de protecció adequats. Un motiu pel qual no ha estat possible detectar nivells suficients de limfòcits T CD8⁺ específics d'antígens de malària és perquè en humans només podem investigar la resposta en sang perifèrica, mentre que en ratolins i micos (Epstein *et al.* 2011) s'ha pogut analitzar el que passa a nivell local del fetge, on els limfòcits migren per a exercir la seva acció anti-parasitària.

Pel paper central dels limfòcits T CD8⁺ en la vacunació amb antígens de fase pre-eritrocítica, s'han desenvolupat noves formulacions que permeten potenciar aquestes respostes, com explicarem al següent capítol. Aquestes respostes immunes són estudiades tradicionalment per tècniques de citometria de flux i per *ELISpot*, i més recentment

mitjançant la quantificació de la transcripció dels gens que codifiquen les proteïnes involucrades en la resposta immune, com les citocines. En general, el que aquestes tècniques mesuren per establir la immunogenicitat de les vacunes és la quantitat i qualitat de les respostes cel·lulars, específicament la freqüència de poblacions de limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺ productores de citocines com IL-2, IFN- γ o TNF en resposta a una estimulació *in vitro* amb l'antigen de la vacuna. L'assumpció és que la magnitud i polifuncionalitat de la resposta dels limfòcits T específics d'antigen correlacionarà amb la protecció assolida per la vacuna. Aquesta correlació s'ha pogut establir en models animals durant les fases pre-clíniques d'algunes vacunes candidates, però encara no s'ha pogut demostrar amb consistència en les fases clíniques amb vacunes humanes.

VACUNOLOGIA: FORMULACIONS I ADJUVANTS

La gran majoria dels antigens candidats a vacuna esmentats anteriorment han estat produïts com a proteïnes recombinants i formulades amb un adjuvant, seguint l'exemple de la vacuna d'hepatitis B (Engerix[®]) que va ser la primera vacuna eficaç comercialitzada per GSK amb aquesta formulació. Moltes vacunes candidates van fracassar inicialment per tenir adjuvants poc potents que no resultaven suficientment immunogèniques. En el camp de la vacunologia en general, i òbviament també en l'àmbit de les vacunes de la malària, ha estat fonamental els avenços que s'han assolit per obtenir adjuvants millorats. Durant molts anys només estava registrat per a ús en humans l'hidròxid d'alumini, i això havia frenat significativament l'avenç de moltes d'aquestes vacunes. El desenvolupament recent de nous adjuvants més potents (com la sèrie AS0 de GSK, els anàlegs de lligands dels *Toll Like Receptors* o els motius oligodesoxinucleòtids CpG) ofereixen una perspectiva més optimista per a les vacunes basades en proteïnes recombinants.

Malgrat aquests avenços amb els adjuvants, i malgrat ser formulacions òptimes per a induir respostes d'anticossos i limfòcits T CD4⁺, les vacunes basades en proteïnes recombinants pateixen una sèrie de limitacions:

- La seva producció és llarga i complexa, sobretot quan és important mantenir la configuració nativa terciària per a induir la producció d'anticossos que depenen d'epítops de limfòcits B conformacionals.
- La capacitat per a combinar múltiples proteïnes és limitada.
- No són òptimes per a induir respostes de limfòcits T CD8⁺, necessàries per a la protecció contra la infecció palúdica en fases hepàtiques.

Davant d'aquestes limitacions, en el camp de les vacunes de la malària, el VIH, la tuberculosi i d'altres infeccions, els investigadors han provat formulacions alternatives basades en vectors produïts mitjançant tècniques de recombinació genètica. Als anys noranta es van desenvolupar tota una sèrie de noves estratègies d'immunització fonamentades en plasmidis d'ADN i en virus recombinants, que permetien una major flexibilitat a l'hora d'incloure múltiples antigens o epítops basats en proteïnes del paràsit.

Aquestes vacunes estan sobretot dirigides a induir respostes immunes cel·lulars potents, tot i que també poden induir alts nivells d'anticossos. En l'àmbit de la malària han estat sobretot utilitzades amb antigens pre-eritrocítics (per exemple, CSP i TRAP) donada la

importància de les respostes dels limfòcits T (sobretot CD8⁺) per a controlar les fases hepàtiques de la infecció. Els vectors més utilitzats estan basats en adenovirus i en poxvirus recombinants. La seva aplicabilitat disminueix si els individus vacunats tenen nivells pre-existents d'anticossos contra aquests vectors virals i una manera d'evitar aquest problema és utilitzar virus recombinants de simis en comptes d'humans.

La millor estratègia fins ara per a augmentar la potència de la immunització amb aquestes formulacions és utilitzar seqüencialment dos tipus de vectors diferents expressant el mateix antigen. Per exemple, un esquema de vacunació eficaç pot consistir en una primera dosi amb una vacuna d'ADN expressant l'antigen CSP, seguida d'una o dues dosis de record basades en vacunes de poxvirus també expressant CSP. D'això se'n diu vacunació *prime boost* heteròloga. Tot i desconèixer-se el mecanisme immune que el fa tan eficaç, s'està intentant aplicar el *prime-boost* a un gran nombre d'esquemes de vacunació en fase d'assaig clínic.

Un dels avantatges més grans que aquestes noves tecnologies de vacunació ha ofert als malariòlegs ha estat la possibilitat de combinar molts antígens en una sola immunització. Com hem comentat abans, *P. falciparum* té un genoma de gairebé 6.000 proteïnes predites que podrien ser importants dianes immunològiques. L'explotació de la informació del genoma del paràsit amb les noves tecnologies de la genòmica, la transcriptòmica i la proteòmica, i la disponibilitat de les vacunes d'ADN i virals, han permès avançar més ràpidament en el descobriment de nous antígens i en l'avaluació a gran escala de vacunes multi-gen i multi-epítop que podrien esdevenir en el futur més eficaces que les sub-unitàries.

VACUNAR CONTRA LA MALÀRIA AMB PARÀSITS SENCERS

Malgrat les promeses de les noves tecnologies, el cert és que a principis del segle XXI, fruit dels múltiples fracassos de les primeres generacions de vacunes sub-unitàries testades a finals del segle XX, alguns investigadors es van replantejar la necessitat de posar de nou sobre la taula el desenvolupament de vacunes per a la malària basades en paràsits sencers, que anys enrere havien estat considerades impracticables.

Esporozoïts atenuats per irradiació

El malariòleg Dr. Steve Hoffman, amb qui vaig treballar als Estats Units, va crear al 2002 una companyia anomenada *Sanaria* per a desenvolupar una vacuna contra la malària basada en el concepte dels esporozoïts atenuats per irradiació. El seu objectiu és produir esporozoïts asèptics purificats en vials, a gran escala, i injectar-los mitjançant una agulla, en comptes de per la picada d'un mosquit. L'esperança és que aquesta vacuna assoleixi nivells de protecció estèril superiors al 90% i de suficient durada (Hoffman *et al.* 2002).

Després d'uns resultats d'eficàcia inicialment decebedors, atribuïts a que s'havia escollit la ruta d'immunització menys eficient (intradèrmica en comptes d'endovenosa), durant l'estiu del 2013 es van publicar els resultats de la primera prova de concepte exitosa obtinguts a un assaig clínic als Estats Units. Per primer cop es va aconseguir protegir completament sis individus adults naïve mitjançant la immunització intravenosa amb 5 dosis elevades d'esporozoïts irradiats (Seder *et al.* 2013).

Encara que resten grans desafiaments al davant abans de poder implementar una vacuna com aquesta a l'Àfrica, el camí recorregut per aquest grup d'investigadors i emprenedors i el que han assolit és francament impressionant. Alguns dels reptes que encara estan en fase de resolució per a aquesta vacuna són:

- Quina és la millor formulació (volum, concentració d'esporozoïts i numero de dosis) i possible alternativa a la ruta d'administració endovenosa?
- Quina serà la durada de la protecció? La protecció serà específica només de la soca injectada?
- Cóm de factible serà implementar la cadena de fred a les zones rurals d'Àfrica? La vacuna ara mateix només es pot conservar en nitrogen líquid, i això fa que la logística de distribució i emmagatzemament sigui prou complexa.

Paràsits atenuats genèticament (GAP)

De manera similar a l'estratègia anterior, investigadors de Seattle estan treballant per a produir vacunes basades en paràsits, sobretot esporozoïts, en els quals certs gens fonamentals pel cycle vital de les fases pre-eritrocítiques són manipulats genèticament (generació de *know out*) perquè el paràsit sigui capaç d'infectar el fetge però no pugui progressar a fases eritrocítiques. El concepte és similar al de l'atenuació per irradiació, però es tracta d'una aproximació més elegant i que es podrà controlar d'una manera més precisa.

Després de bons resultats en models animals, els primers assaigs clínics en humans van haver de ser interromputs per problemes de seguretat, donat que alguns paràsits van escapar la manipulació genètica i van infectar els eritròcits. Com que la seguretat és la principal preocupació de les autoritats reguladores farmacèutiques, els esforços estan actualment centrats en aconseguir *knock outs* dobles que garanteixin que els paràsits mutants no revertiran a formes salvatges.

Infecció amb esporozoïts sota quimioprofilaxi amb cloroquina (CPS)

Una altra estratègia d'immunització molt interessant desenvolupada pel grup del Dr. Robert Sauerwein es basa en la infecció controlada d'humans naïve amb esporozoïts acompanyada de tractament amb cloroquina. Aquesta aproximació va resultar en un sorprenent nivell de 100% de protecció (Roestenberg *et al.* 2009) després de la infecció amb *P. falciparum*, que a més a més va ser sostinguda en el temps (Roestenberg *et al.* 2011).

Actualment els investigadors holandesos estan estudiant quins són els mecanismes immunes responsables d'aquesta protecció, en col·laboració amb el nostre grup al CRESIB. Tanmateix, s'està investigant fins a quin punt aquest model protector es pot reproduir amb altres soques de paràsit, amb fàrmacs anti-malàrics diferents, i si seria factible d'implementar com a una nova eina de prevenció de la malària a l'Àfrica.

Tots aquests estudis de vacunació i infecció controlada amb paràsits sencers han donat un nou impuls als models basats en el repte experimental amb *P. falciparum*. Les infeccions controlades d'humans amb malària són una eina essencial per l'assaig de noves vacunes i també obren l'oportunitat per a desenvolupar estudis bàsics immunològics en individus no prèviament exposats al paràsit. Com a resultat de tots aquests avenços, s'ha creat un

Consorti internacional, que inclou el CRESIB i diverses institucions africanes, per a estandarditzar aquest model en voluntaris humans i poder incrementar la seva utilització per a l'acceleració de la recerca en noves mesures de control de la malària.

Infecció amb dosis ultra-baixes de paràsits

A més a més de les immunitzacions amb formes pre-eritrocítiques del paràsit, una altra experiència d'èxit ha estat la infecció amb paràsits eritrocítics. Investigadors australians van demostrar que una infecció controlada amb dosis molt baixes de *P. falciparum* pot induir una immunitat protectora (Pombo *et al.* 2002). Sorprenentment, aquesta immunitat experimental no està associada a respostes d'anticossos, com succeeix a la natura, sinó que a respostes immunes cel·lulars que encara no han estat ben caracteritzades.

SITUACIÓ ACTUAL I PRESPECTIVES DE FUTUR

Ens trobem en un moment crític en la història de la vacunació contra la malària. Per una banda, la vacuna sub-unitària RTS,S que després de 25 anys de costós desenvolupament havia aixecat moltes expectatives pels resultats dels assaigs clínic de fases II i III, ara també genera molts dubtes per l'eficàcia moderada de 30 % en la població diana, els nadons. Sobretot, l'observació de la curta durada de la protecció i el cost esperat de la vacuna produeixen una gran incertesa sobre el futur d'aquesta vacuna. Per una altra banda, les vacunes recombinants víriques i les vacunes de paràsits sencers podrien constituir una alternativa més eficaç i tenir un major impacte en la disminució de la morbiditat i mortalitat associada al *P. falciparum*, un cop se superin els grans reptes logístics que encara resten.

Els resultats passats i els que han de venir s'hauran de posar en perspectiva en relació amb els objectius que la OMS va establir com a fita per a una primera generació de vacunes de la malària (*WHO Roadmap malaria, 2006*): per 2015, desenvolupar i registrar una vacuna contra la malària amb una eficàcia protectora de més del 50% contra la malaltia greu i la mort i amb una durada superior a un any. Tanmateix, la població diana són els nadons, tant per ser el grup més susceptible, com perquè el PAV constitueix pràcticament l'únic sistema cost-eficaç per a una distribució massiva de qualsevol vacuna que pretengui tenir una ampla implementació a l'Àfrica subsahariana. Tot i que aquests objectius estan en fase de revisió per la OMS, no sembla que cap de les vacunes disponibles fins a dia d'avui superin el llindar que s'havia establert per a recomanar el registre d'una primera vacuna.

En conclusió, mentre no disposem d'una vacuna segura, immunogènica i eficaç que compleixi els requisits mínims establerts per la OMS, cal entendre millor com ha funcionat l'única vacuna experimental que ha mostrat un nivell de protecció moderada contra la malària: la RTS,S. Només així serem capaços d'avançar d'una manera més racional envers desenvolupar una segona generació de vacunes que ens apropi més als objectius del Mil·lenni i a l'erradicació definitiva d'aquesta devastadora malaltia. Hem de posar fil a l'agulla.

Moltes gràcies.

Barcelona, 26 de novembre de 2012 (revisat 8 de gener de 2014).

Bibliografía

- Abdulla S, Oberholzer R, Juma O, Kubhoja S, Machera F, Membi C, Omari S, Urassa A, Mshinda H, Jumanne A, Salim N, Shomari M, Aebi T, Schellenberg DM, Carter T, Villafana T, Demoitié MA, Dubois MC, Leach A, Lievens M, Vekemans J, Cohen J, Ballou WR, Tanner M. Safety and immunogenicity of RTS,S/AS02D malaria vaccine in infants. *N Engl J Med* 2008;359:2533-44.
- Aide P, Dobaño C, Sacarlal J, Aponte JJ, Mandomando I, Guinovart C, Bassat Q, Renom M, Puyol L, Macete E, Herreros E, Leach A, Dubois MC, Demoitié MA, Lievens M, Vekemans J, Loucq C, Ballou WR, Cohen J, Alonso PL. Four year immunogenicity of the RTS,S/AS02(A) malaria vaccine in Mozambican children during a phase IIb trial. *Vaccine* 2011;29:6059-67.
- Alonso PL, Brown G, Arevalo-Herrera M, Binka F, Chitnis C, Collins F, Doumbo OK, Greenwood B, Hall BF, Levine MM, Mendis K, Newman RD, Plowe CV, Rodríguez MH, Sinden R, Slutsker L, Tanner M. A research agenda to underpin malaria eradication. *PLoS Med* 2011;8(1):e1000406.
- Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Aide P, Sigauque B, Milman J, Mandomando I, Bassat Q, Guinovart C, Espasa M, Corachan S, Lievens M, Navia MM, Dubois MC, Menendez C, Dubovsky F, Cohen J, Thompson R, Ballou WR. Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet* 2005;366:2012-8.
- Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J, Mandomando I, Spiessens B, Guinovart C, Espasa M, Bassat Q, Aide P, Ofori-Anyinam O, Navia MM, Corachan S, Ceuppens M, Dubois MC, Demoitié MA, Dubovsky F, Menéndez C, Tornieporth N, Ballou WR, Thompson R, Cohen J. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* 2004;364:1411-20.
- Aponte JJ, Aide P, Renom M, Mandomando I, Bassat Q, Sacarlal J, Manaca MN, Lafuente S, Barbosa A, Leach A, Lievens M, Vekemans J, Sigauque B, Dubois MC, Demoitié MA, Sillman M, Savarese B, McNeil JG, Macete E, Ballou WR, Cohen J, Alonso PL. Safety of the RTS,S/AS02D candidate malaria vaccine in infants living in a highly endemic area of Mozambique: a double blind randomised controlled phase I/IIb trial. *Lancet* 2007;370:1543-51.
- Bejon P, Lusingu J, Olotu A, Leach A, Lievens M, Vekemans J, Mshamu S, Lang T, Gould J, Dubois MC, Demoitié MA, Stallaert JF, Vansadia P, Carter T, Njuguna P, Awuondo KO, Malabeja A, Abdul O, Gesase S, Mturi N, Drakeley CJ, Savarese B, Villafana T, Ballou WR, Cohen J, Riley EM, Lemnge MM, Marsh K, von Seidlein L. Efficacy of RTS,S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age. *N Engl J Med*. 2008;359:2521-32.
- Campo JJ, Dobaño C, Sacarlal J, Guinovart C, Mayor A, Angov E, Dutta S, Chitnis C, Macete E, Aponte JJ, Alonso PL. Impact of the RTS,S malaria vaccine candidate on naturally acquired antibody responses to multiple asexual blood stage antigens. *PLoS One* 2011;6(10):e25779.
- Cohen S, McGregor IA, Carrington S. Gamma globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 1961; 192:733-737.
- Crosnier C, Bustamante LY, Bartholdson SJ, Bei AK, Theron M, Uchikawa M, Mboup S, Ndir O, Kwiatkowski DP, Duraisingh MT, Rayner JC, Wright GJ. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2011;480:534-7.
- Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:13-36.
- Enosse S, Dobaño C, Quelhas D, Aponte JJ, Lievens M, Leach A, Sacarlal J, Greenwood B, Milman J, Dubovsky F, Cohen J, Thompson R, Ballou WR, Alonso PL, Conway DJ, Sutherland CJ. RTS,S/AS02A malaria vaccine does not induce parasite CSP T cell epitope selection and reduces multiplicity of infection. *PLoS Clin Trials* 2006;1(1):e5.
- Epstein JE, Tewari K, Lyke KE, Sim BK, Billingsley PF, Laurens MB, Gunasekera A, Chakravarty S, James ER, Sedegah M, Richman A, Velmurugan S, Reyes S, Li M, Tucker K, Ahumada A, Ruben AJ, Li T, Stafford R, Eappen AG, Tamminga C, Bennett JW, Ockenhouse CF, Murphy JR, Komisar J, Thomas N, Loyevsky M, Birkett A, Plowe CV, Loucq C, Edelman R, Richie TL, Seder RA, Hoffman SL. Live attenuated malaria vaccine designed to protect through hepatic CD8⁺ T cell immunity. *Science* 2011;334:475-80.

- Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Pertea M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DM, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM, Barrell B. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2002;419:498-511.
- Hoffman SL, Goh LM, Luke TC, Schneider I, Le TP, Doolan DL, Sacci J, de la Vega P, Dowler M, Paul C, Gordon DM, Stoute JA, Church LW, Sedegah M, Heppner DG, Ballou WR, Richie TL. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis* 2002;185:1155-64.
- Marsh K, Otoo L, Hayes RJ, Carson DC, Greenwood BM. Antibodies to blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1989; 83:293-303.
- Nussenzweig RL, Vanderberg J, Most H, Orton C. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature* 1967; 216: 160-2.
- Pombo DJ, Lawrence G, Hirunpetcharat C, Rzepczyk C, Bryden M, Cloonan N, Anderson K, Mahakunkijcharoen Y, Martin LB, Wilson D, Elliott S, Elliott S, Eisen DP, Weinberg JB, Saul A, Good MF. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Lancet* 2002;360:610-7.
- Roestenberg M, McCall M, Hopman J, Wiersma J, Luty AJ, van Gemert GJ, van de Vegte-Bolmer M, van Schaijk B, Teelen K, Arens T, Spaarman L, de Mast Q, Roeffen W, Snounou G, Rénia L, van der Ven A, Hermsen CC, Sauerwein R. Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. *N Engl J Med* 2009;361:468-77.
- Roestenberg M, Teirlinck AC, McCall MB, Teelen K, Makamdop KN, Wiersma J, Arens T, Beckers P, van Gemert G, van de Vegte-Bolmer M, van der Ven AJ, Luty AJ, Hermsen CC, Sauerwein RW. Long-term protection against malaria after experimental sporozoite inoculation: an open-label follow-up study. *Lancet* 2011;377:1770-6.
- Sabchareon, A., T. Burnouf, D. Ouattara, P. Attanath, H. Bouharoun Tayoun, P. Chantavanich, C. Foucault, T. Chongsuphajaisiddhi, and P. Druilhe. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45:297-308.
- Sacarlal J, Aide P, Aponte JJ, Renom M, Leach A, Mandomando I, Lievens M, Bassat Q, Lafuente S, Macete E, Vekemans J, Guinovart C, Sigauque B, Sillman M, Milman J, Dubois MC, Demoitié MA, Thonnard J, Menéndez C, Ballou WR, Cohen J, Alonso PL. Long-term safety and efficacy of the RTS,S/AS02A malaria vaccine in Mozambican children. *J Infect Dis* 2009;200:329-36.
- Seder RA, Chang LJ, Enama ME, Zephir KL, Sarwar UN, Gordon IJ, Holman LA, James ER, Billingsley PF, Gunasekera A, Richman A, Chakravarty S, Manoj A, Velmurugan S, Li M, Ruben AJ, Li T, Eappen AG, Stafford RE, Plummer SH, Hendel CS, Novik L, Costner PJ, Mendoza FH, Saunders JG, Nason MC, Richardson JH, Murphy J, Davidson SA, Richie TL, Sedegah M, Sutamihardja A, Fahle GA, Lyke KE, Laurens MB, Roederer M, Tewari K, Epstein JE, Sim BK, Ledgerwood JE, Graham BS, Hoffman SL; VRC 312 Study Team. Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. *Science*. 2013;341(6152):1359-65.
- Schofield L, Hewitt MC, Evans K, Siomos MA, Seeberger PH. Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. *Nature*. 2002;418:785-9.
- The RTS,S Clinical Trials Partnership. A Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Infants. *N Engl J Med* 2012 Nov 9.
- The RTS,S Clinical Trials Partnership. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med*. 2011;365:1863-75.
- Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976; 193:673-675.
- WHO World Malaria Report, 2011