

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
22 de Mayo de 2008 (22.05.2008)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2008/059314 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 14/445 (2006.01) **C12N 15/30** (2006.01)
A61K 39/015 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/IB2006/003835

(22) Fecha de presentación internacional:
14 de Noviembre de 2006 (14.11.2006)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): **CENTRO INTERNACIONAL DE VACUNAS** [CO/CO]; Carrera 35 # 4A-53, Barrio San Fernando, Cali. (CO). **INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA. UNIVERSIDAD DEL VALLE** [CO/CO]; Calle 4B # 36-00, Universidad Del Valle - San Fernando, Cali (CO).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **VALDER-RAMA AGUIRRE, Augusto Elías** [CO/CO]; Calle 4B # 36-00 - Instituto de Inmunología, Universidad Del Valle - San Fernando, Cali (CO). **HERRERA VALENCIA, Sócrates** [CO/CO]; Carrera 35 # 4A-53, Barrio San Fernando, Cali (CO). **ARÉVALO RAMIREZ, Myriam** [CO/CO]; Carrera 35 # 4A-53, Barrio San Fernando, Cali (CO). **NARUM, David** [US/US]; Twinbrook I, Room 1115, 5640 Fishers Lane, Rockville, MD 20852 (US).

(74) Mandatario: **RODRÍGUEZ D'ALEMAN, Dilia María**; Carrera 11# 86-53 Piso 6, Edificio Segovia, Bogotá (CO).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): 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, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (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).

Declaración según la Regla 4.17:

— sobre divulgaciones no perjudiciales o excepciones a la falta de novedad (Regla 4.17(v))

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional
— con una declaración sobre divulgaciones no perjudiciales o excepciones a la falta de novedad
— con la parte de lista de secuencias de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible por medio de la Oficina Internacional previa petición

(54) Title: **MALARIA VACCINE BASED ON THE 200L SUBUNIT OF THE PLASMODIUM VIVAX MSP1 PROTEIN**

(54) Título: **VACUNA CONTRA LA MALARIA, BASADA EN LA SUBUNIDAD 200L DE LA PROTEÍNA MSP1 DE PLASMODIUM VIVAX**

(57) Abstract: The present invention relates to a candidate subunit for a vaccine against malaria caused by *P. vivax*, known as Pv200L, which is based on N-terminal end portions of the *P. vivax* MSP-1 protein. The subunit is designed for use alone or in formulations, combined with other subunits. The invention includes the production of recombinant prototypes of the subunit and the design of a production process that can be scaled up for mass production thereof.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a una subunidad candidato a vacuna contra la malaria causada por *P. vivax*, denominada como Pv200L, que esta basada en porciones del extremo N-terminal de la proteína MSP-1 de *P. vivax*. La subunidad esta diseñada para ser usada sola o en formulaciones combinadas con otras subunidades. La invención incluye la producción dos prototipos recombinantes de la subunidad y el diseño de un proceso de producción escalable para su producción en masa.

WO 2008/059314 A1

**VACUNA CONTRA LA MALARIA, BASADA EN LA SUBUNIDAD 200L DE LA
PROTEÍNA MSP1 DE *Plasmodium vivax***

5

Campo de la invención

La invención descrita a continuación se refiere a vacunas contra la malaria basadas en la subunidad 200L, comprendida entre los aminoácidos 50 y 450 de la Proteína de Superficie del Merozoito 1 (MSP1) de *P.vivax*, y que están dirigidas a controlar el desarrollo de los estadios sanguíneos y la severidad de la enfermedad.

15

Antecedentes de la invención

La malaria es uno de los mayores problemas de salud pública mundial. Se estima que anualmente se producen 500 millones de casos clínicos en todo el mundo y que alrededor de 3 millones de niños y mujeres embarazadas fallecen por la enfermedad, cada año, en sólo África.

20

África es el continente más afectado por la malaria, particularmente por el *Plasmodium falciparum*, la especie más virulenta y responsable de aproximadamente el 80% de la malaria mundial. La segunda especie en abundancia es el *P.vivax*, que representa cerca de 20% de los casos de todo el mundo y se transmite de manera significativa en los continentes americano y asiático. En estos 2 continentes la mayoría de las regiones endémicas tienen transmisión simultánea de *P.falciparum* y *P.vivax*. En muchas regiones maláricas la prevalencia de *P.vivax* es mayor, y a pesar de no causar gran mortalidad produce una significativa morbilidad.

30

El *P.vivax* se caracteriza por producir una enfermedad debilitante que causa gran incapacidad y presenta un comportamiento recidivante, si la infección no se trata adecuadamente. Esta última característica representa un alto riesgo para turistas y viajeros quienes una vez son infectados por primera vez, pueden desarrollar infecciones repetidas sin necesidad de exponerse de nuevo a la picadura del mosquito.

La malaria tiene un impacto negativo sobre el desarrollo social y económico de las áreas endémicas, a tal punto, que se ha estimado que el Producto Interno Bruto acumulado de los países endémicos para malaria se ha reducido en un 50% durante los últimos 20 años comparado con el de los países no endémicos.

Actualmente los costos de control, manejo y tratamiento son excesivamente altos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que para el año 2007, el costo anual para prevenir la malaria solamente en África sería de alrededor de US\$ 2.5 billones.

Los métodos clásicos de control recomendados desde hace varias décadas por la Organización Mundial de la Salud, han consistido en dos alternativas:

1. El control de los vectores a través de la eliminación de sus criaderos, el uso de repelentes y toldillos, y su eliminación a través del uso de insecticidas de acción residual.
2. El tratamiento preventivo y curativo de los individuos expuestos o infectados con malaria, a través del uso de medicamentos antimaláricos.

Se han evidenciado fallas en las medidas clásicas de control de la malaria, debido a la resistencia de los parásitos a la terapia antimalárica y a la resistencia del mosquito *Anopheles* a los insecticidas lo cual produce una creciente complejidad y un aumento en el costo del control de la malaria a nivel mundial. Los hechos anteriores sumados a factores como la deforestación, las migraciones y la inestabilidad política de las comunidades de áreas endémicas contribuyen a agravar el problema.

Durante las últimas 2 décadas, se han realizado importantes esfuerzos para el desarrollo de estrategias alternativas de control de su transmisión, dentro de las cuales, las vacunas han atraído mayor interés por su gran potencial costo-beneficio.

Para llevar a cabo el desarrollo de vacunas contra la malaria, es necesario conocer el ciclo de vida del *Plasmodium*, determinar qué es común a las 4 especies de este género (*Plasmodium spp*) *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malariae* y *P.ovale* que afectan al humano, y establecer cuales son las moléculas involucradas en el mantenimiento del mismo.

En el ciclo de vida, el parásito es transmitido de un individuo infectado a otro por mosquitos del género *Anopheles spp*, los cuales a través de una picadura inyectan el parásito en la forma de esporozoito al torrente sanguíneo del humano. Los parásitos viajan por la sangre hasta el hígado donde se introducen en las células hepáticas y desarrollan una fase de multiplicación masiva (ciclo esquizogónico) que genera miles de nuevos parásitos (merozoitos) con capacidad de invadir los glóbulos rojos, dentro de los cuales el parásito desarrolla una sucesión de ciclos de multiplicación y reinvasión a nuevos glóbulos rojos, aumentando rápidamente su número en el organismo.

Esta última serie de eventos ocurridos en la sangre son los responsables de la enfermedad y pueden conducir a la muerte del paciente. Algunos de los parásitos en la sangre se diferencian sexualmente en gametocitos (masculinos y femeninos) que al ser ingeridos por el mosquito durante una nueva picadura, realizan un proceso de fertilización e inician un nuevo ciclo (esporogónico o sexual) en el intestino del mosquito, para generar nuevos esporozoitos infecciosos.

Durante la fase eritrocítica del *P. vivax*, el merozoito de origen hepático invade un glóbulo rojo joven o reticulocito y ahí se multiplica por mecanismos asexuales hasta generar un esquizonte maduro que contiene entre 20-30 nuevos merozoitos (esquizogonia). Estos escapan del esquizonte y tienen la capacidad de invadir nuevos glóbulos rojos en los que a su vez se reproducen rápidamente para generar nuevos merozoitos. Algunos de los parásitos hepáticos pueden detenerse en su desarrollo y transformarse en formas hibernantes o hipnozoitos, las cuales pueden reactivarse meses o años más tarde y desarrollar la enfermedad después de un primer episodio, si el tratamiento no es adecuado.

Dentro del complejo ciclo de vida del *Plasmodium*, se han identificado 3 sitios distintos en los cuales podría actuar una vacuna antimalárica: 1) En la fase pre-eritrocítica del ciclo, esto es, antes del ingreso del parásito al hígado o durante su desarrollo en el mismo; 2) En la fase eritrocítica asexual, es decir, antes o durante la invasión a los glóbulos rojos, o durante su desarrollo intra-eritrocítico y 3) durante su desarrollo sexual, fertilización y desarrollo en el intestino del mosquito. De los tres blancos mencionados solo la fase eritrocítica es la responsable

de los síntomas y la severidad de la infección. La fase pre-eritrocítica transcurre sin sintomatología y la reproducción sexual ocurre en el mosquito.

Las vacunas eritrocíticas asexuales están fundamentadas en el fenómeno de “premunición”, en el cual los habitantes de zonas endémicas, expuestos a infecciones sucesivas, adquieren naturalmente inmunidad protectora contra las manifestaciones clínicas pero no contra la infección. Como resultado, los individuos adultos de estas regiones se tornan “inmunes” y logran desarrollar una vida normal. Esta inmunidad inicia su desarrollo desde edades muy tempranas y se sostiene hasta la vida adulta a expensas de infecciones repetidas que funcionan como refuerzos de la memoria inmunológica. Este tipo de inmunidad parcial no estéril se conoce como “Inmunidad Clínica” y se manifiesta inicialmente con una reducción en el riesgo de muerte, posteriormente una reducción en la intensidad o severidad de la sintomatología clínica, y finalmente, luego de muchas reinfecciones, con una disminución en la carga parasitaria.

Este fenómeno ha sido difícil de probar en *P. vivax* en áreas de baja transmisión, en donde los habitantes alcanzan niveles relativamente bajos de inmunidad clínica porque se pierde fácilmente dada la baja frecuencia de refuerzos naturales. En áreas donde existen niveles de transmisión moderados o altos, como Papua Nueva Guinea, se ha determinado que la sintomatología aguda puede reducir su intensidad después de varios episodios clínicos y que la prevalencia de infecciones declina significativamente después de los 5-10 años de edad, alcanzando niveles significativos de inmunidad clínica a la edad de 10-15 años.

En la fase eritrocítica la inmunidad esta mediada principalmente por anticuerpos y se considera que la inmunidad celular se encuentra limitada dado que los glóbulos rojos no expresan moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) que les permita presentar antígenos. Estudios de transferencia pasiva de anticuerpos han demostrado conferir inmunidad protectora y ser capaces de controlar parasitemias patentes en pacientes afectados de *P. falciparum*. Los mecanismos involucrados son: 1) Bloqueo de la invasión del parásito al glóbulo rojo; 2) Opsonización y aglutinación del parásito con posterior promoción de la fagocitosis; 3) Inhibición celular dependiente de anticuerpos; 4) Inhibición del secuestro en la microcirculación; y 5) Neutralización de toxinas maláricas.

A pesar de ser la única evidencia de inmunidad protectora inducida por medios naturales, los habitantes de las áreas endémicas siguen siendo afectados por la enfermedad. Esto se debe en parte a que la memoria inmunológica en malaria, por razones desconocidas, es de muy corta duración. Estudios prospectivos han reportado que si existe un periodo mayor de 6 meses entre dos infecciones en un mismo individuo, la memoria inmunológica se pierde y el sistema inmune del individuo responde como si nunca hubiese estado en contacto con el parásito. La existencia de una vacuna que lograra generar memoria inmunológica de larga duración contra los estadios sanguíneos sería de gran utilidad, especialmente para los habitantes de las áreas endémicas.

La Proteína de Superficie del Merozoito 1 (MSP1) es un antígeno considerado el principal blanco de la respuesta inmune contra los estadios sanguíneos de *Plasmodium spp.* Este antígeno ha logrado inducir inmunidad protectora parcial o estéril en varios modelos animales. Experimentos de transferencia pasiva de anticuerpos contra los diferentes fragmentos de la proteína logran bloquear el proceso de invasión al glóbulo rojo e inducir inmunidad protectora parcial en modelos animales. Varias subunidades candidatas a vacuna contra la malaria causada por *P. falciparum* han sido desarrolladas a partir de este antígeno.

La MSP1 se expresa abundantemente en la superficie del merozoito durante la maduración del esquizonte, es esencial para el normal desarrollo del esquizonte y para la interacción inicial con el eritrocito. Durante el rompimiento del esquizonte y la subsiguiente invasión al glóbulo rojo solo un fragmento de 19 KDa, localizado hacia el extremo C-terminal, permanece anclado a la membrana del merozoito. Este fragmento tiene dominios similares a los del Factor de Crecimiento Epidérmico (FCE) que han sido involucrados como ligandos en la interacción inicial con el eritrocito; no obstante, existen dominios de unión al glóbulo rojo en otras regiones de la molécula. Hacia el extremo N-terminal de la molécula, existe un fragmento altamente conservado con un número inusual de epítopes B y T que en *P. falciparum* ha sido denominado Pf190L. Este fragmento expresado como proteína recombinante logra inducir inmunidad parcialmente protectora contra reto infeccioso en primates (Herrera, Rosero et al. 1992), y ha sido incluido en una vacuna multivalente: "Combinación B", que ha demostrado inducir protección parcial en ensayos clínicos, siendo precisamente la subunidad 190L la más inmunogénica (Saul, Lawrence et al. 1999).

Estudios inmunoepidemiológicos en áreas endémicas de Brasil han demostrado la presencia de anticuerpos y células inmunes inducidos naturalmente contra diversas regiones de la MSP1 de *P.vivax*. Al igual que en la MSP1 de *P.falciparum*, la atención se ha centrado en el extremo C-terminal y existen ya subunidades bien definidas como los fragmentos 42 y 19 KDa. Aunque se ha demostrado que la región N-terminal es la de mayor inmunogenicidad en la molécula y que existe asociación con protección clínica inducida naturalmente, son pocos los estudios conducentes a definir una subunidad antigénica hacia este lado de la proteína.

Hasta la fecha no existen solicitudes de patente que se relacionen con una subunidad de vacuna a partir del extremo N-terminal de la MSP-1 de *P.vivax*. Las patentes otorgadas y/o en proceso que se refieren al antígeno MSP-1 usualmente se dirigen al extremo C-terminal de la proteína de *P. falciparum*, más específicamente a los dominios de 42 y 19 KDa (WO97/30150, US2004/0063190A1, WO02/085947A1, US2002/0076403, US2005/0095256A1) y los dominios similares FCE (WO93/17107), ninguna de las secuencias mencionadas anteriormente tienen efectos probados en el control de la infección producida por *P. vivax*

Teniendo en cuenta la información anterior es claro que existe en el estado de la técnica la necesidad de obtener nuevos antígenos que por sus características inmunogénicas permitan el desarrollo de vacunas contra la malaria causada por *P.vivax*.

Descripción de las figuras

Figura 1. Producción de rPv200L

Figura 2. Proceso de producción de EcPv200L escalable a condiciones GMP

Figura 3. Seroepidemiología de rPv200L en la Costa Pacífica Colombiana

Figura 4. Inmunogenicidad de rPv200L en ratones BALB/c

Figura 5. Inmunogenicidad y eficacia protectora de rPv200L en primates *Aotus*

Descripción detallada de la invención

La presente invención se centra en el descubrimiento, desarrollo y producción de una subunidad blanco para vacuna, denominada Pv200L, que por sus capacidades inmunogénicas se consolida como candidato para la elaboración de vacunas contra la malaria causada por *P.vivax*.

Específicamente, la subunidad divulgada en esta solicitud se dirige a controlar la parasitemia y la severidad del proceso infeccioso durante la fase eritrocítica, en la que la invasión del parásito (merozoito) a los glóbulos rojos jóvenes (reticulocitos) ocurre por la interacción de moléculas (ligando) de la superficie del parásito y moléculas (receptoras) presentes en la superficie del reticulocito. El desarrollo y multiplicación intracelular pueden además resultar bloqueados a través de la acción de citocinas inducidas por la proteína, en particular del interferón gamma (IFN- γ).

La invención comprende la generación de vacunas, basadas en la subunidad Pv200L, cuya secuencia de aminoácidos e importancia inmunológica fue establecida por el grupo solicitante (Valderrama-Aguirre, Quintero et al. 2005). La invención incluye también la generación de la subunidad por tecnología recombinante, sumado al diseño y establecimiento de un proceso de generación y purificación industrializable para la producción a gran escala de la subunidad.

La presente invención constituye una aproximación única para la producción de candidatos a vacuna contra la malaria dado que se basa en la subunidad Pv200L, que no había sido previamente descrita y menos como vacuna. Adicionalmente, la invención es novedosa porque hace uso de la tecnología del ADN recombinante y herramientas de ingeniería genética para modificar la secuencia natural del fragmento génico que codifica por la subunidad Pv200L y de esta manera aumentar la eficiencia de síntesis en *E. coli* y facilitar el posterior proceso de purificación.

La subunidad 200L se localiza hacia el extremo N-terminal de la proteína MSP-1 de *P.vivax* y se definió luego de análisis bioinformáticos en los que se determinó una región de más del 70% de homología con la subunidad 190L de la MSP-1 de *P.falciparum* (Guttinger, Romagnoli et al. 1991), candidato a vacuna bien definido y ya en evaluaciones clínicas avanzadas (Genton, Al-

Yaman et al. 2000; Genton, Al-Yaman et al. 2003), seguida por una región de alta capacidad de unión a reticulocitos denominada como HBRI (Rodriguez, Urquiza et al. 2002). La subunidad esta compuesta por parte del bloque 1, los bloques 2-4 y parte del bloque 5, según la clasificación de bloques realizada por Putaporntip y colaboradores (Putaporntip, Jongwutiwes et al. 2002), y esta comprendida entre los aminoácidos 50-450 de la mayoría de secuencias de MSP-1 de *P.vivax* descritas hasta la fecha.

En general la subunidad presenta variaciones en la secuencia y tamaño de algunos de los bloques que la componen. Por esta razón la unidad de invención se define como una secuencia consenso **Pv200L** (SEQ ID N° 1) activa en la protección contra *P.vivax* y obtenida a partir variaciones observadas en la naturaleza y variaciones puntuales realizadas por el solicitante en procura de mejorar la expresión de estas proteínas. En una modalidad la proteína reivindicada presente la secuencia (SEQ ID N°2) o la (SEQ ID N°3).

SEQ ID N° 1

X₁X₂X₃X₄X₅SVLTSKIRNF**X₆X₇KX₈LELQIPGHTDLLHLIREL****X₉EP****X₁₀GIKYLVESYEEFNQL**
MHVINFHYDLLRAKLHDMCAHDYCKIPEHLKISDKELDKKVVVLGYRKPLDNIKDDIGKLE**X₁₁**
FITKNK**X₁₂TX₁₃NIX₁₄X₁₅LIX₁₆X₁₇EN****X₁₈KRX₁₉X₂₀X₂₁X₂₂TX₂₃TTNG****X₂₄GX₂₅QX₂₆X₂₇X₂₈X₂**
9X₃₀X₃₁X₃₂X₃₃X₃₄GX₃₅X₃₆X₃₇TGX₃₈X₃₉X₄₀SX₄₁SSX₄₂TX₄₃SX₄₄GX₄₅GX₄₆TX₄₇X₄₈GX₄₉SX₅₀PA
X₅₁AX₅₂X₅₃SSTNX₅₄X₅₅YX₅₆X₅₇KKX₅₈IYQAX₅₉YN**X₆₀IFYT****X₆₁QL****X₆₂EAQKLIX₆₃VLEKRVKV**
LKEHKX₆₄IKX₆₅LLEQVX₆₆X₆₇EKX₆₈KLPX₆₉DX₇₀X₇₁X₇₂X₇₃TX₇₄LT**X₇₅X₇₆X₇₇X₇₈KX₇₉AX₈₀X₈**
1KIA**X₈₂LEX₈₃X₈₄IX₈₅AX₈₆AKTVNFDLDGLFTDAEELEYLREKAKMAGTLIIPESTKSAGTPG**
KTVPTLKETYPH

En donde X significa:

X_{1, 3, 86}: I o N

X_{2, 23, 72, 73}: N o T

X₄: Q o F

X₅: V o P

X₆: V o L

X_{7, 19, 20, 32, 44}: G o S

X₈: S o F

X₉: F o V

X₁₀: N o H

X_{11, 24, 25}: T o A

- X_{12} : E o I
 $X_{13, 69, 81, 83}$: S o K
 $X_{14, 33, 35, 40, 42, 61}$: N o S
 X_{15} : K o D
- 5 X_{16} : S o I
 $X_{17, 52}$: D o A
 $X_{18, 67}$: A o K
 $X_{21, 78}$: Q o H
 $X_{22, 50}$: S o P
- 10 $X_{26, 74}$: N o P
 X_{27} : N o A
 X_{28} : NGSIAAASSETTQI o no está presente.
 X_{29} : A o S
 $X_{30, 41}$: A o G
- 15 X_{31} : Q o S
 $X_{34, 36, 38, 46}$: T o S
 X_{37} : E o S
 X_{39} : T, R o S
 X_{43} : L o G
- 20 X_{45} : A, D o T
 X_{47} : V o G
 X_{48} : V o T
 X_{49} : T o Q
 $X_{51, 53}$: P o A
- 25 $X_{54, 57, 63, 79}$: A o E
 $X_{55, 75}$: N o D
 $X_{56, 82}$: E o D
 X_{58} : I o K
 X_{59} : I, V o M
- 30 X_{60} : G o T
 $X_{62, 80}$: E o Q
 X_{64} : G o D

X₆₅: A o V

X_{66, 68}: K o E

X₇₀: N o Y

X₇₁: T o P

5 X₇₆: E o no está presente

X₇₇: Q o V

X₈₄: Q o K

X₈₅: V o E

10 La invención también cubre la proteína recombinante que tienen la secuencia definida anteriormente y cuyo fragmento codificante ha sido modificado hacia el extremo 5' mediante la adición del código genético del aminoácido metionina (M) seguido del polipéptido ITIFP y 6 residuos aminoácidos de histidina (H). Preferiblemente la secuencia de la proteína recombinante que aquí se reivindica es la secuencia SEQ ID N° 4.

15 Otra alternativa de la invención hace referencia a la proteína que tienen la secuencia definida anteriormente y cuyo fragmento codificante ha sido modificado hacia el extremo 5' mediante la adición de un aminoácido metionina (M) seguido del polipéptido ITIFP; y en su extremo 3', donde se han insertado 5 aminoácidos histidina (H). Preferiblemente la solicitud se refiere a la secuencia de la proteína recombinante que corresponde a la secuencia SEQ ID N° 5.

20

En este orden de ideas, durante el desarrollo de la invención se generaron dos proteínas recombinantes, rPv200L (SEQ ID N° 4) y EcPv200L (SEQ ID N° 5), originadas a partir de manipulaciones para lograr la producción transgénica en *E. coli*, mejorar las condiciones de hidrofobicidad y empaquetamiento en cuerpos de inclusión, y facilitar su posterior purificación.

25 Específicamente, para elaborar el producto rPv200L se adicionaron los códigos genéticos para una metionina (M) como codón de inicio, una secuencia corta de ITIFP altamente hidrofóbica, seguida de 5 histidinas (H) hacia el extremo 5' del gen (SEQ ID N° 6). En el caso de EcPv200L, se uso un gen sintético (SEQ ID N° 7), con el código genético alterado para hacer compatible el gen salvaje con el uso de codón de *E. coli* y así facilitar la expresión transgénica.

30 Adicionalmente, se mantuvo la secuencia ITIFP y se agregaron los códigos genéticos de 6 histidinas hacia el extremo 3' del gen, para facilitar el proceso de purificación, y finalmente se adicionó un codón de parada. Las modificaciones puntuales se muestran en la secuencia N° 7.

Otra invención reivindicada en la presente solicitud es el proceso de producción de la proteína recombinante *EcPv200L*. Dicho proceso de producción involucra 3 subprocesos: clonación, fermentación, y purificación. Durante la clonación, el gen sintético es insertado en el vector de expresión procariótica pET-24(a) y posteriormente se transforman bacterias *E. coli* BL21 (DE3). En el subproceso de fermentación, los clones recombinantes se adaptan a crecimiento en medio de cultivo químicamente definido y en condiciones controladas de bioreactor. Finalmente para la etapa de purificación, la pasta celular resultante se lisa en un microfluidizador y previa centrifugación se recuperan los cuerpos de inclusión. Estos últimos son solubilizados con GuHCl 8M en presencia de β -mercaptoetanol y posteriormente sometidos a purificación mediante una serie de cromatografías.

Las cromatografías conducentes a purificar y obtener el producto final son en su orden: 1) Cromatografía de Afinidad con Ión Metálico Níquel (IMAC), 2) Cromatografía de Exclusión por Tamaño en Superdex 300 (SEC-S300); 3) Cromatografía de Interacción Hidrofóbica en resina de Butilo (HIC-Butyl); 4) Cromatografía de Intercambio Iónico en resina Q (IEX-Q); y 5) cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC-S75) en Superdex 75. El producto final es caracterizado para determinar perfil por cromatografía analítica de exclusión por tamaño (SEC-An) y fase reversa (RP-An) en HPLC, determinar contenido de endotoxinas y contaminantes de *E. coli* y finalmente determinar perfil por espectrometría de masas y secuenciación N-terminal. El proceso de obtención de la proteína recombinante *EcPv200L* es novedoso toda vez que es un proceso exclusivamente diseñado para esta proteína recombinante basado en sus características bioquímicas y que no había sido reportado en el estado de la técnica. Además, el proceso como tal no funciona con ninguna otra proteína recombinante y con la proteína de la invención tiene la ventaja de garantizar una alta productividad sin afectar la estabilidad ni las otras características relevantes para que la proteína conserve sus propiedades antigénicas, beneficios que no se alcanzan si se modifican las etapas o las condiciones del proceso que aquí se define.

También es parte de la invención las secuencias de ácidos nucleicos que codifica por el fragmento *Pv200L*, así como las moléculas de ácido nucleico complementarias a ellas (ADNc) y las variaciones que pueden tener estas moléculas de ADN en virtud de la degeneración del código genético. Igualmente, la invención reclamada abarca los vectores de expresión que

comprenden el ADN o el ADNc definidos en el párrafo anterior y las células transformadas con dichos vectores. Dentro de los vectores usados en esta invención se encuentran plásmidos, fagos, baculovirus y YAC, expresados en sistemas procarióticos como bacterias, y eucarióticos como levaduras, células de plantas, mamíferos e insectos.

5

Adicional a las invenciones descritas, también son parte de la invención las composiciones farmacéuticas, especialmente vacunas para la prevención de la malaria que comprendan la subunidad *Pv200L* o subfragmentos de esta, ya sea como péptido sintético, proteína recombinante, ADN o ARN.

10

Preferiblemente la invención se refiere a las composiciones farmacéuticas precisadas anteriormente, y que comprenden uno o más adyuvantes de uso humano, cuyo uso es ampliamente reconocido en formulaciones de vacunas para potenciar la respuesta inmune ya sea por la inducción de anticuerpos específicos y/o estimular linfocitos T ayudadores y/o citotóxicos.

15

De manera complementaria, es objeto de la presente invención la formulación de las moléculas inmunogénicas descritas anteriormente, ya sea individualmente, combinadas con adyuvantes o combinadas con otras moléculas inmunogénicas formuladas en composiciones farmacéuticas con el fin de ser administradas en pacientes con necesidad de prevenir infecciones maláricas; estas moléculas se pueden formular como composiciones farmacéuticas en forma de proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos formulados en diferentes adyuvantes de uso en humanos y diferentes proporciones.

20

De acuerdo a lo mencionado, son objeto de la presente invención las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas inmunogénicas definidas anteriormente con uno o más adyuvantes seleccionados del grupo que comprende Montanide ISA-720, Montanide ISA-51, ASO2 (SBAS2), AS2V, AS1B, MF59, Alum, QS-21, MPL, CpG o microcápsulas. Estos adyuvantes han sido utilizados con diferentes antígenos de *Plasmodium* y han demostrado ser seguros y estimular la respuesta inmune humoral y/o celular.

30

Adicionalmente, se entienden comprendidas dentro de la invención reivindicada las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas inmunogénicas definidas

anteriormente y fragmentos derivados de otros estadios del *Plasmodium* o de microorganismos diferentes a este y opcionalmente, incluyen diferentes adyuvantes de uso en humanos.

Preferiblemente, la subunidad de la invención podrá ser combinada con antígenos presentes en las diferentes fases del ciclo de vida del parásito, ya sea que los antígenos se anexasen a la secuencia durante la síntesis o sean adicionados a la composición farmacéutica, tales como la proteína de circumesporozoito (CS), la proteína de adhesión relacionada con la trombospodina (TRAP), la proteína de unión a Duffy (DBP), la proteína de superficie del merozoito (MSP-1), la proteína Pvs25 y la proteína Pvs48/45 del ciclo esporogónico, entre otros. Estos antígenos podrán ser usados completos o fragmentos de los mismos producidos como péptidos sintéticos, proteínas recombinantes o ADN.

A manera ilustrativa a continuación se presentan ejemplos que describen de forma detallada la mejor manera para llevar a cabo para la caracterización de la subunidad Pv200L de *P. vivax* y su producción como proteína recombinante de las diferentes moléculas de la invención. No obstante, la materia reivindicada no se limita a dichos ejemplos. Por el contrario, el objeto solicitado abarca la proteína de la presente invención o sus fragmentos independientemente del proceso que se emplee para producirlos.

Ejemplo 1. Sistemas de producción de Pv200L como proteína recombinante.

La subunidad Pv200L ha sido producida como proteína recombinante. Durante el proceso de desarrollo de la invención se obtuvieron dos prototipos recombinantes, rPv200L y EcPv200L. La rPv200L fue obtenida a partir de un amplificado de PCR que se insertó en el vector plasmídico pRSET-B, el cual fue posteriormente clonado en bacterias *E.coli* BL21(DE3)-RIL. La purificación de rPv200L se logró por pases sucesivos a través de una cromatografía manual en columna de Níquel (IMAC), proceso facilitado por la adición de histidinas hacia el extremo N-terminal.

El producto obtenido puede observarse en la figura 1 en la cual se muestra: (i) electroforesis en gel de acrilamida teñida con Azul de Coomassie de rPv200L a 10, 1 y 0.5 µg. (ii): Perfil

cromatográfico por HPLC en fase reversa que demuestra una homogeneidad de más del 90% en el producto final.

Dados los resultados promisorios obtenidos con esta unidad decidimos establecer y mejorar el sistema de producción para dar lugar a la versión recombinante mejorada de *Pv200L*, denominada como *EcPv200L*, compatible con estándares de calidad de material grado clínico.

Los principales cambios en los sistemas de expresión están resumidos en la tabla 1. Entre ellos se destacan el cambio del vector de expresión, la producción de un gen sintético armonizado al uso de codón de *E. coli*, el cambio del marcador de selección, la producción de pasta celular en biorreactor y en medio de cultivo químicamente definido.

Tabla 1

| Producción de <i>EcPv200L</i> | | |
|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Característica | <i>rPv200L</i> | <i>EcPv200L</i> |
| Vector | pRSET-B | pET24a(+) |
| Fuente del gen | Salvaje | Gen sintético armonizado |
| Marcador de selección | Resistencia a Ampicilina | Resistencia a Kanamicina |
| Hospedero | <i>E. coli</i> BL21(DE3)-RIL | <i>E. coli</i> BL21(DE3) |
| Medio de cultivo | Complejo | Definido |
| Biorreactor | No | Si |
| Estándar de calidad | Laboratorio | Compatible con grado clínico |
| Fracción corpuscular | Soluble | Cuerpos de inclusión |

Finalmente, se estableció un sistema de purificación con un total de 5 pasos que incluyen cromatografías de afinidad (IMAC), de exclusión por tamaño (SEC-S300 y SEC-S75), de intercambio aniónico (IEX-Q) y de interacción hidrofóbica (HIC-Butyl). Este procedimiento y su secuencia correcta son detallados en la figura 2. El producto final fue caracterizado bioquímicamente en términos de: la secuencia del plásmido de expresión, perfil de fase reversa (RP) y exclusión por tamaño (SEC) por HPLC con análisis de radio hidrodinámico, secuenciación N-terminal, perfil por espectrometría de masas (MS), contenido de endotoxinas y contaminantes de *E. coli*.

El proceso definido anteriormente tiene una eficiencia global de purificación del 20%, y es fácilmente escalable y transferible. El producto obtenido, presenta niveles de endotoxinas inferiores a 100 UE/dosis y contaminantes de *E. coli* casi imperceptibles (< 0.1%), resultando

compatible con las regulaciones de agencias como la FDA y la USP. Así las cosas, el proceso aquí definido asegura una mejor expresión de la proteína, una mayor productividad y de una calidad de la proteína óptima para ser usada en la producción de vacunas.

5 Ejemplo 2. Ensayos de Seroepidemiología de la subunidad Pv200L

La subunidad Pv200L es altamente reconocida por individuos de áreas endémicas que han estado infectados y/o expuestos a infecciones por *P. vivax*. La figura 3 muestra los niveles de anticuerpos IgG contra rPv200L encontrados durante un estudio seroepidemiológico realizado en la Costa Pacífica Colombiana.

El suero de individuos infectados con *P. vivax* reconoce específicamente la proteína recombinante rPv200L por inmunoblot (figura 3i, izquierda), mientras que los individuos control, que nunca han visitado o han estado expuestos en áreas endémicas, no reconocen la rPv200L (figura 3i, derecha). La distribución de los valores de densidad óptica según la edad (figura 3ii) muestra que existe una tendencia a desarrollar títulos más altos de anticuerpo hacia la 2 y 5 década de la vida, fenómeno mas notable entre los expuestos (•) que entre los infectados (+).

Tabla 2

| Seroepidemiología de Pv200L | | | | |
|-----------------------------|----|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Grupo | n | % IgG positiva (IC exacto 95%) | Promedio OD (IC 95%) | Título de anticuerpos |
| Infectados | 81 | 72.8 (61.8 – 82.1) | 1.015 (0.828 – 1.203) | $10^3 - 10^5$ |
| Expuestos | 69 | 52.2 (39.8 – 64.3) | 0.464 (0.363 – 0.506) | $10^2 - 10^4$ |
| Control | 44 | 6.8 (1.40 – 18.1) | 0.264 (0.246 – 0.368) | — |

La tabla 2 muestra el nivel de reconocimiento de la subunidad Pv200L por individuos de un área endémica en términos del porcentaje de respondedores con reacción positiva por IgG contra rPv200L y la fortaleza de tal reacción expresada como promedio de densidad óptica (OD).

La proteína recombinante EcPv200L ha sido también analizada mediante ensayos de seroepidemiología con sueros de individuos de áreas endémicas de Brasil obteniendo un

reconocimiento positivo por IgG contra la subunidad en más del 90% de 4 diferentes áreas endémicas evaluadas.

Ejemplo 3. Inmunogenicidad de rPv200L en ratones BALB/c

Ratones BALB/c fueron inmunizados con 50 µg de rPv200L bajo un régimen de 3 inmunizaciones vía intraperitoneal. Los niveles de anticuerpos IgG específicos contra rPv200L luego de la tercera inmunización con la proteína emulsificada en adyuvante de Freund se muestran en la figura 4. Los títulos de anticuerpos tipo IgG anti-rPv200L después de la última inmunización alcanzan niveles por encima de 1×10^7 diluciones (figura 4i). Tales anticuerpos son capaces de reconocer el inmunógeno rPv200L (4ii, izquierda) y su homólogo en *P. falciparum* rPf190L (4ii, derecha). Finalmente, los anticuerpos inducidos por inmunización con rPv200L en ratones BALB/c logran reconocer la proteína nativa sobre esquizontes de *P. vivax* (4iii).

Ejemplo 4. Inmunogenicidad y Eficacia Protectora de rPv200L en primates del género *Aotus*

La inmunización de primates *Aotus lemurinus griseimembra* con rPv200L con un esquema de 3 dosis vía subcutánea con 100 µg de rPv200L emulsificada en adyuvante de Freund, logra inducir una respuesta inmune fuerte en términos de anticuerpos IgG que protege contra la reto con formas sanguíneas de *P. vivax* (Salvador I). Los primates inmunizados con rPv200L se protegen parcialmente logrando controlar la parasitemia y el progreso hacia la anemia severa. La figura 5i muestra como las curvas de parasitemia (parasitos/300 WBCs) en el grupo control (izquierda) alcanzan picos de mayor nivel que en el grupo inmunizado (derecha).

La tabla 3 recopila los parámetros determinados en el ensayo piloto de eficacia protectora en primates *Aotus*, con los que se demuestra que la parasitemia acumulada (CP) y el área bajo la curva de parasitemia (AUC) es reducida en el grupo inmunizado. Igualmente se muestran los datos de respuesta inmune humoral. Solo los animales control tuvieron que ser tratados para controlar la parasitemia antes de caer en anemia severa, lo que apoya una evidencia de respuesta inmune contra la severidad de la enfermedad.

Tabla 3

| Eficacia protectora de rPv200L en primates <i>Aotus</i> | | | | | | |
|---|-----------------|----------|-----|-----|-----|-----|
| Grupo | Título de IgG | | CP | | AUC | |
| | ELISA | IFAT | Pcl | Ptx | Pcl | Ptx |
| Control | <1000 | Negativo | 575 | 562 | 840 | 800 |
| | <1000 | Negativo | 201 | 179 | 280 | 232 |
| | <1000 | Negativo | 90 | 36 | 121 | 40 |
| | <1000 | Negativo | 425 | 400 | 586 | 537 |
| Inmunizado | 2×10^7 | 2,200 | 19 | 11 | 25 | 13 |
| | 2×10^7 | 2,200 | 235 | 95 | 339 | 93 |
| | 2×10^7 | 2,200 | 259 | 240 | 353 | 292 |
| | 2×10^7 | 2,200 | 231 | 210 | 312 | 266 |

ELISA = título de anticuerpos IgG contra rPv200L antes del reto; IFAT = título de anticuerpos IgG contra esquizontes de *P. vivax* antes del reto; CP = Parasitemia acumulada (Σ de parasitemia/300 glóbulos blancos cada día); pcl = tiempo de aclaramiento de la parasitemia; Ptx = tiempo antes del primer tratamiento (para todo el grupo); AUC = Área bajo la curva {parásitos/día}.

5

REIVINDICACIONES

1. Una proteína que se caracteriza porque comprende la secuencia:

5 **X₁X₂X₃X₄X₅SVLTSKIRNF**X₆X₇KX₈LELQIPGHTDLLHLIRELAX₉EPX₁₀GIKYLVESYEEFNQL**
 MHVINFYDLLRAKLHDMCAHDYCKIPEHLKISDKELDMLKKVVLGYRKPLDNIKDDIGKLE**X₁₁**
 FITKN**X₁₂**T**X₁₃**N**X₁₄**L**X₁₅**L**X₁₆****X₁₇**EN**X₁₈**K**X₁₉****X₂₀****X₂₁****X₂₂**T**X₂₃**TTNG**X₂₄**G**X₂₅**Q**X₂₆****X₂₇****X₂₈****X₂₉**
 9**X₃₀****X₃₁****X₃₂****X₃₃****X₃₄**G**X₃₅****X₃₆****X₃₇**TG**X₃₈****X₃₉****X₄₀**S**X₄₁**SS**X₄₂**T**X₄₃**S**X₄₄**G**X₄₅**G**X₄₆**T**X₄₇****X₄₈**G**X₄₉**S**X₅₀**PA
X₅₁A**X₅₂****X₅₃**SSTN**X₅₄****X₅₅**Y**X₅₆****X₅₇**KK**X₅₈**IYQ**X₅₉**YN**X₆₀**IFYT**X₆₁**QL**X₆₂**EAQKL**X₆₃**VLEKRVKV
 LKEHK**X₆₄**IK**X₆₅**LLEQV**X₆₆****X₆₇**EK**X₆₈**KLP**X₆₉**DX**X₇₀****X₇₁****X₇₂****X₇₃**T**X₇₄**LT**X₇₅****X₇₆****X₇₇****X₇₈**K**X₇₉**A**X₈₀****X₈₁**
 10 **X₈₂**L**X₈₃****X₈₄**I**X₈₅**A**X₈₆**AKTVNFDLDGLFTDAEELEYLREKAKMAGTLIIPESTKSAGTPG
 KTVPTLKETYPH**

Donde X significa:

- X_{1, 3, 86}**: I o N
- 15 **X_{2, 23, 72, 73}**: N o T
- X₄**: Q o F
- X₅**: V o P
- X₆**: V o L
- X_{7, 19, 20, 32, 44}**: G o S
- 20 **X₈**: S o F
- X₉**: F o V
- X₁₀**: N o H
- X_{11, 24, 25}**: T o A
- X₁₂**: E o I
- 25 **X_{13, 69, 81, 83}**: S o K
- X_{14, 33, 35, 40, 42, 61}**: N o S
- X₁₅**: K o D
- X₁₆**: S o I
- X_{17, 52}**: D o A
- 30 **X_{18, 67}**: A o K
- X_{21, 78}**: Q o H
- X_{22, 50}**: S o P
- X_{26, 74}**: N o P
- X₂₇**: N o A
- 35 **X₂₈**: NGSIAAASSETTQI o no está presente.
- X₂₉**: A o S

- X_{30, 41}: A o G
 X₃₁: Q o S
 X_{34, 36, 38, 46}: T o S
 X₃₇: E o S
 5 X₃₉: T, R o S
 X₄₃: L o G
 X₄₅: A, D o T
 X₄₇: V o G
 X₄₈: V o T
 10 X₄₉: T o Q
 X_{51, 53}: P o A
 X_{54, 57, 63, 79}: A o E
 X_{55, 75}: N o D
 X_{56, 82}: E o D
 15 X₅₈: I o K
 X₅₉: I, V o M
 X₆₀: G o T
 X_{62, 80}: E o Q
 X₆₄: G o D
 20 X₆₅: A o V
 X_{66, 68}: K o E
 X₇₀: N o Y
 X₇₁: T o P
 X₇₆: E o no está presente
 25 X₇₇: Q o V
 X₈₄: Q o K
 X₈₅: V o E

2. La proteína, según la reivindicación 1, caracterizada porque comprende la secuencia de
 30 aminoácidos definida en SEQ ID N°2 o SEQ ID N°3.

3. La proteína, según la reivindicación 1, caracterizada porque es una proteína recombinante o un péptido sintético.
4. La proteína recombinante, según la reivindicación 3, caracterizada porque adicionalmente
5 tiene el aminoácido metionina (M) seguido de seis aminoácidos histidina y el péptido ITIFP hacia el extremo N-terminal.
5. La proteína recombinante según la reivindicación 4 caracterizada porque comprende la
10 secuencia SEQ ID N°4.
6. La proteína recombinante, según la reivindicación 3, caracterizada porque adicionalmente
tiene el aminoácido metionina (M) seguido de el péptido ITIFP hacia el extremo N-terminal,
y cinco aminoácidos histidina hacia el extremo C-terminal.
- 15 7. La proteína recombinante, según la reivindicación 6, caracterizada porque comprende la
secuencia SEQ ID N°5.
8. Una molécula de ácido nucleico caracterizada porque comprende una secuencia de
nucleótidos que codifica una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
20
9. La molécula de ácido nucleico, según la reivindicación 8, caracterizado porque es una
molécula de ADN, ARN o cADN.
10. La molécula de ácido nucleico, según la reivindicación 9, caracterizado porque comprende la
25 secuencia de polinucleótidos identificada como secuencia SEQ ID N°6 o SEQ ID N°7.
11. Un vector de expresión caracterizado porque comprende la molécula de ácido nucleico de
acuerdo con la reivindicación 8. Preferiblemente la secuencia de polinucleótidos es la
secuencia identificada como SEQ ID N°6 o la secuencia identificada como SEQ ID N°7.
30
12. El vector de expresión, según la reivindicación 11, caracterizado porque es un plásmido ó un
fago.

13. Una célula recombinante caracterizada porque comprende el vector de expresión según la reivindicación 11.
- 5 14. Una composición farmacéutica para la prevención de la malaria caracterizada porque comprende una proteína según las reivindicaciones 1 a 7.
15. Una composición farmacéutica para la prevención de la malaria caracterizada porque comprende la molécula de ácido nucleico según las reivindicaciones 8 a 10.
- 10 16. Una composición farmacéutica para la prevención de la malaria caracterizada porque comprende el vector según la reivindicación 11.
17. Una composición farmacéutica para la prevención de la malaria caracterizada porque
15 comprende la célula recombinante de la reivindicación 13.
18. Una vacuna para la prevención de la malaria caracterizada porque comprende la proteína según las reivindicaciones 1 a 7.
- 20 19. Una vacuna para la prevención de la malaria caracterizada porque comprende la molécula de ácido nucleico según las reivindicaciones 8 a 10.
20. Una vacuna para la prevención de la malaria caracterizada porque comprende un vector según la reivindicación 11.
- 25 21. Una vacuna para la prevención de la malaria caracterizada porque comprende la célula recombinante de reivindicación 13.
22. La vacuna según las reivindicaciones 17 a 21 caracterizada porque comprende
30 adicionalmente uno o más adyuvantes de uso humano.

23. La vacuna según la reivindicación 22 caracterizada porque el adyuvante es seleccionado del grupo que consiste en Montanide ISA-720, Montanide ISA-51, ASO2 (SBAS2), AS2V, AS1B, MF59, Alum, QS-21, MPL, CpG o microcápsulas.
- 5 24. La vacuna, según la reivindicación 22, caracterizada porque comprende adicionalmente antígenos derivados de otros estadios del Plasmodium o de microorganismos diferentes a éste.
- 10 25. La vacuna según la reivindicación 24 caracterizada porque los antígenos derivados de Plasmodium o de otro microorganismo se seleccionan a partir del grupo que consiste en la proteína de adhesión relacionada con la trombospondina (TRAP), la proteína de unión a Duffy (DBP), la proteína de superficie del merozoito (MSP-1), proteína Pvs25 y proteína Pv48/45, entre otros.
- 15 26. La vacuna según la reivindicación 25 caracterizada porque los antígenos son proteínas completas o fragmentos de las mismas producidos como péptidos sintéticos, proteínas recombinantes o vacunas de ADN.
- 20 27. Un proceso para producir la proteína recombinante de la reivindicación 1 caracterizado porque comprende los siguientes pasos
1. Clonación del gen sintético que codifica la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID 1 en el vector de expresión procariótica pET-24(a) y transformación de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) con dicho vector.
 - 25 2. Fermentación de los clones recombinantes en un medio de de cultivo químicamente definido y en condiciones controladas de bioreactor.
 3. Purificación de la pasta celular mediante lisis en un microfluidizador seguida de centrifugación para recuperar los cuerpos de inclusión, que son solubilizados con GuHCl 8M en presencia de β -mercaptoetanol y posteriormente sometidos a
 - 30 purificación mediante una serie de cromatografías.

28. El proceso, según la reivindicación 27, caracterizado porque preferiblemente la serie de cromatografías del paso 3 son en su orden:

1. Cromatografía de Afinidad con Ión Metálico Níquel (IMAC),
2. Cromatografía de Exclusión por Tamaño en Superdex 300 (SEC-S300);
- 5 3. Cromatografía de Interacción Hidrofóbica en resina de Butilo (HIC-Butyl);
4. Cromatografía de Intercambio Iónico en resina Q (IEX-Q); y
5. Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC-S75) en Superdex 75.

1/5

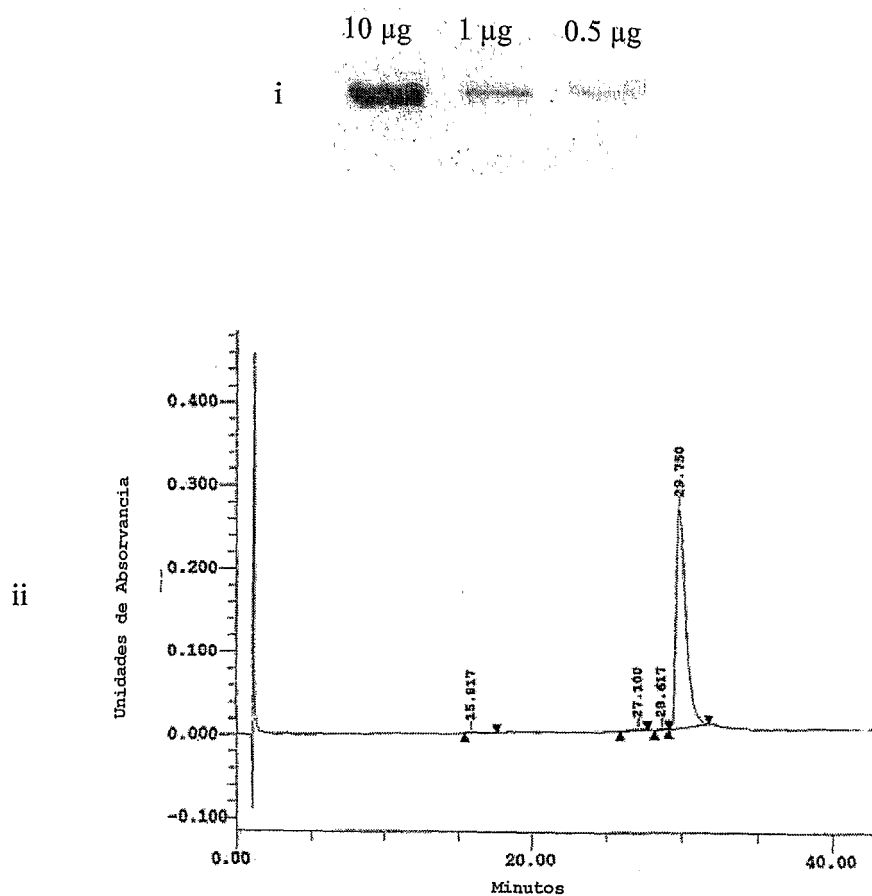


Figura 1

2/5

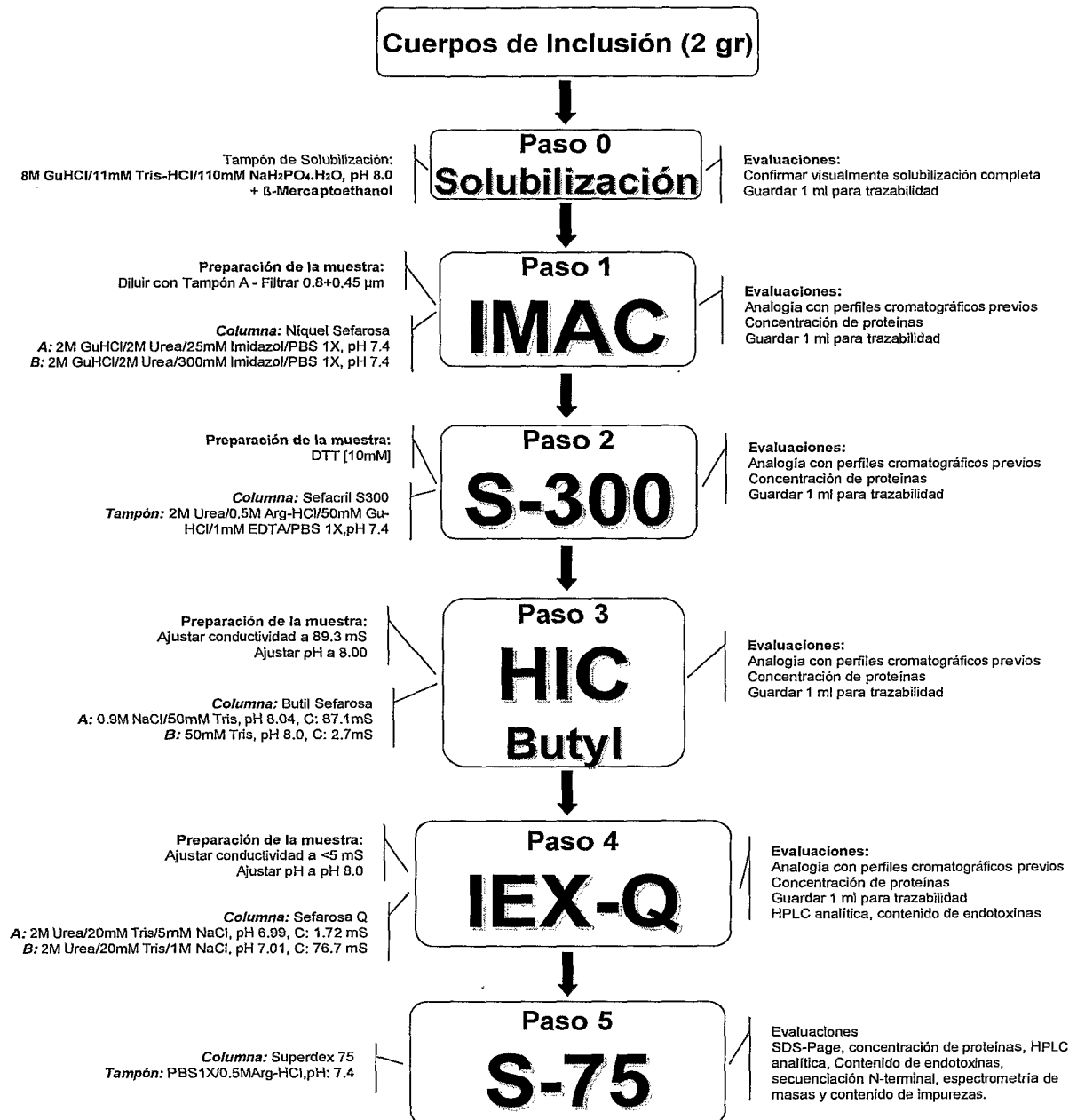


Figura 2

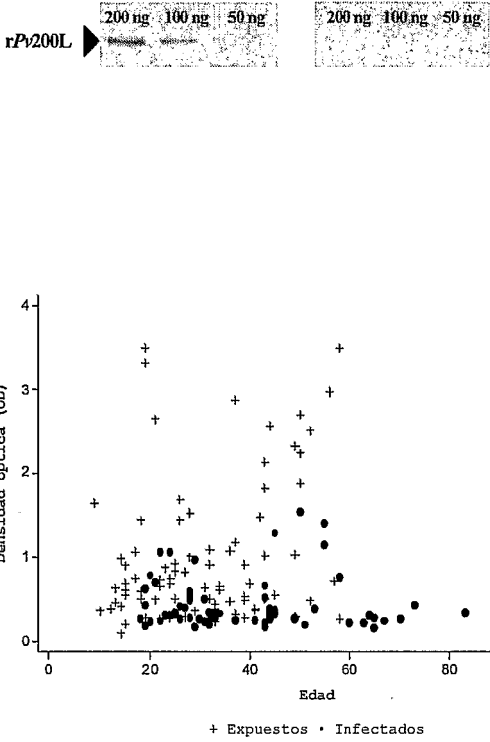


Figura 3

4/5

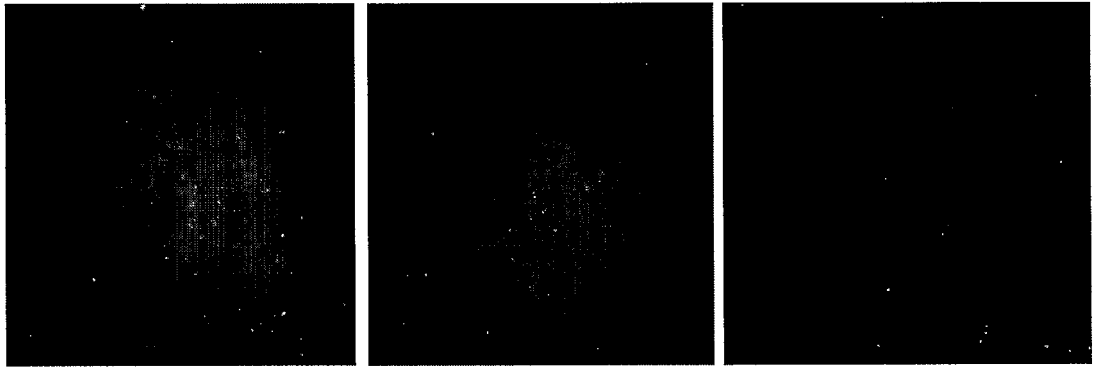
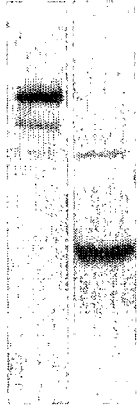
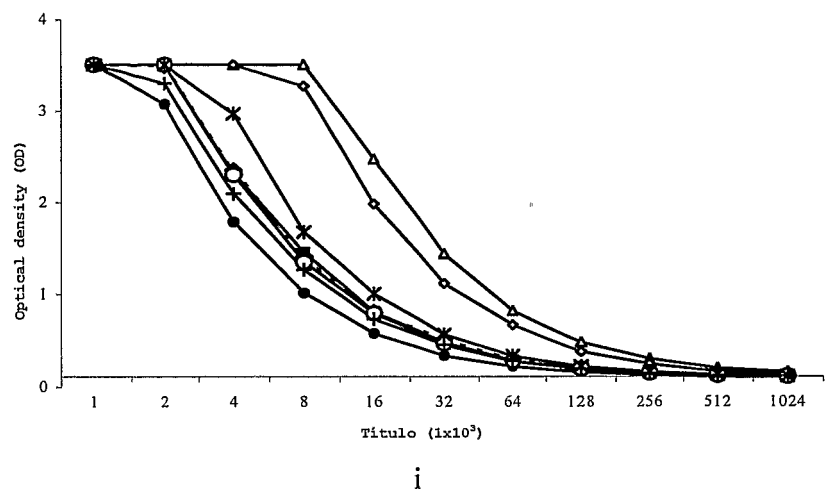
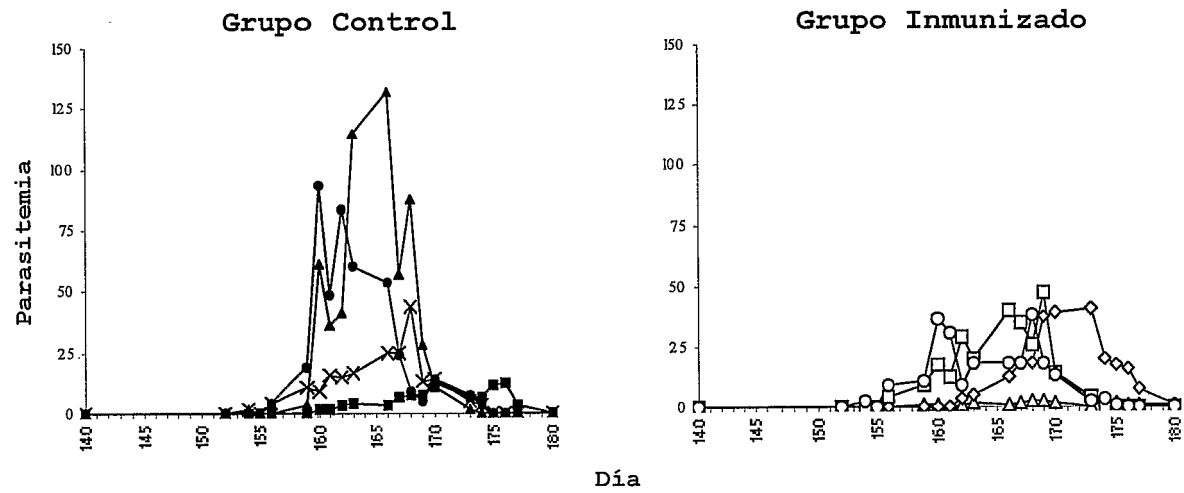


Figura 4

5/5

i



5

Figura 5

ii

Sequence Listing.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> CENTRO INTERNACIONAL DE VACUNAS
INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA. UNIVERSIDAD DEL VALLE

<120> VACUNA CONTRA LA MALARIA, BASADA EN LA SUBUNIDAD 200L DE LA
PROTEÍNA MSP1 DE Plasmodium vivax

<130> P-867

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 354
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fragment of protein MSP-1 from Plasmodium vivax with conservative
modifications.

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> Xaa is I or N

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> Xaa is N or T

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> Xaa is I or N

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> Xaa is Q or F

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> Xaa is V or P

<220>
<221> VARIANT
<222> (16)..(16)
<223> Xaa is V or L

<220>
<221> VARIANT
<222> (17)..(17)
<223> Xaa is G or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (19)..(19)
<223> Xaa is S or F

Sequence Listing.ST25

<220>
<221> VARIANT
<222> (39)..(39)
<223> Xaa is F or V

<220>
<221> VARIANT
<222> (42)..(42)
<223> Xaa is N or H

<220>
<221> VARIANT
<222> (120)..(120)
<223> Xaa is T or A

<220>
<221> VARIANT
<222> (127)..(127)
<223> Xaa is E or I

<220>
<221> VARIANT
<222> (130)..(130)
<223> Xaa is S or K

<220>
<221> VARIANT
<222> (133)..(133)
<223> Xaa is N or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (134)..(134)
<223> Xaa is K or D

<220>
<221> VARIANT
<222> (137)..(137)
<223> Xaa is S or I

<220>
<221> VARIANT
<222> (138)..(138)
<223> Xaa is D or A

<220>
<221> VARIANT
<222> (141)..(141)
<223> Xaa is A or K

<220>
<221> VARIANT
<222> (144)..(144)
<223> Xaa is G or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (145)..(145)
<223> Xaa is G or S

<220>
<221> VARIANT

Sequence Listing.ST25

<222> (146)..(146)
<223> Xaa is Q or H

<220>
<221> VARIANT
<222> (147)..(147)
<223> Xaa is S or P

<220>
<221> VARIANT
<222> (149)..(149)
<223> Xaa is N or T

<220>
<221> VARIANT
<222> (154)..(154)
<223> Xaa is T or A

<220>
<221> VARIANT
<222> (156)..(156)
<223> Xaa is T or A

<220>
<221> VARIANT
<222> (158)..(158)
<223> Xaa is N or P

<220>
<221> VARIANT
<222> (159)..(159)
<223> Xaa is N or A

<220>
<221> VARIANT
<222> (160)..(160)
<223> Xaa is NOTINING or NGSIAAASSETTQI

<220>
<221> VARIANT
<222> (161)..(161)
<223> Xaa is A or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (162)..(162)
<223> Xaa is A or G

<220>
<221> VARIANT
<222> (163)..(163)
<223> Xaa is Q or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (164)..(164)
<223> Xaa is G or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (165)..(165)
<223> Xaa is N or S

Sequence Listing.ST25

<220>
<221> VARIANT
<222> (166)..(166)
<223> Xaa is T or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (168)..(168)
<223> Xaa is N or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (169)..(169)
<223> Xaa is T or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (170)..(170)
<223> Xaa is E or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (173)..(173)
<223> Xaa is T or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (174)..(174)
<223> Xaa is T, R or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (175)..(175)
<223> Xaa is N or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (177)..(177)
<223> Xaa is A or G

<220>
<221> VARIANT
<222> (180)..(180)
<223> Xaa is N or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (182)..(182)
<223> Xaa is L or G

<220>
<221> VARIANT
<222> (184)..(184)
<223> Xaa is G or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (186)..(186)
<223> Xaa is A, D or T

<220>
<221> VARIANT
<222> (188)..(188)

Sequence Listing.ST25

<223> Xaa is T or S

<220>

<221> VARIANT

<222> (190)..(190)

<223> Xaa is V or G

<220>

<221> VARIANT

<222> (191)..(191)

<223> Xaa is V or T

<220>

<221> VARIANT

<222> (193)..(193)

<223> Xaa is T or Q

<220>

<221> VARIANT

<222> (195)..(195)

<223> Xaa is S or P

<220>

<221> VARIANT

<222> (198)..(198)

<223> Xaa is P or A

<220>

<221> VARIANT

<222> (200)..(200)

<223> Xaa is D or A

<220>

<221> VARIANT

<222> (201)..(201)

<223> Xaa is P or A

<220>

<221> VARIANT

<222> (206)..(206)

<223> Xaa is A or E

<220>

<221> VARIANT

<222> (207)..(207)

<223> Xaa is N or D

<220>

<221> VARIANT

<222> (209)..(209)

<223> Xaa is E or D

<220>

<221> VARIANT

<222> (210)..(210)

<223> Xaa is A or E

<220>

<221> VARIANT

<222> (213)..(213)

<223> Xaa is I or K

<220>

Sequence Listing.ST25

<221> VARIANT
<222> (218)..(218)
<223> Xaa is I, V or M

<220>
<221> VARIANT
<222> (221)..(221)
<223> Xaa is G or T

<220>
<221> VARIANT
<222> (226)..(226)
<223> Xaa is N or S

<220>
<221> VARIANT
<222> (229)..(229)
<223> Xaa is E or Q

<220>
<221> VARIANT
<222> (236)..(236)
<223> Xaa is A or E

<220>
<221> VARIANT
<222> (250)..(250)
<223> Xaa is G or D

<220>
<221> VARIANT
<222> (253)..(253)
<223> Xaa is A or V

<220>
<221> VARIANT
<222> (259)..(259)
<223> Xaa is K or E

<220>
<221> VARIANT
<222> (260)..(260)
<223> Xaa is A or K

<220>
<221> VARIANT
<222> (263)..(263)
<223> Xaa is K or E

<220>
<221> VARIANT
<222> (267)..(267)
<223> Xaa is S or K

<220>
<221> VARIANT
<222> (269)..(269)
<223> Xaa is N or Y

<220>
<221> VARIANT
<222> (270)..(270)
<223> Xaa is T or P

Sequence Listing.ST25

<220>
<221> VARIANT
<222> (271)..(271)
<223> Xaa is N or T

<220>
<221> VARIANT
<222> (272)..(272)
<223> Xaa is N or T

<220>
<221> VARIANT
<222> (274)..(274)
<223> Xaa is N or P

<220>
<221> VARIANT
<222> (277)..(277)
<223> Xaa is N or D

<220>
<221> VARIANT
<222> (278)..(278)
<223> Xaa is E or NOTHING

<220>
<221> VARIANT
<222> (279)..(279)
<223> Xaa is Q or V

<220>
<221> VARIANT
<222> (280)..(280)
<223> Xaa is Q or H

<220>
<221> VARIANT
<222> (282)..(282)
<223> Xaa is A or E

<220>
<221> VARIANT
<222> (284)..(284)
<223> Xaa is E or Q

<220>
<221> VARIANT
<222> (285)..(285)
<223> Xaa is S or K

<220>
<221> VARIANT
<222> (289)..(289)
<223> Xaa is E or D

<220>
<221> VARIANT
<222> (292)..(292)
<223> Xaa is S or K

<220>
<221> VARIANT

Sequence Listing.ST25

<222> (293)..(293)
 <223> Xaa is Q or K

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (295)..(295)
 <223> Xaa is V or E

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (297)..(297)
 <223> Xaa is I or N

 <300>
 <301> AUGUSTO VALDERRAMA-AGUIRRE, GUSTAVO QUINTERO, ANDRÉS GÓMEZ,
 ALEJANDRO CASTELLANOS, YOBANA PÉREZ, FABIÁN MÉNDEZ, MYRIAM
 ARÉVALO-HERRERA, AND SÓCRATES HERRERA*
 <302> ANTIGENICITY, IMMUNOGENICITY, AND PROTECTIVE EFFICACY OF
 PLASMODIUM VIVAX MSP1 PV200L: A POTENTIAL MALARIA VACCINE SUBUNIT
 <303> The American Society of Tropical Medicine and Hygiene
 <304> 73
 <305> 5
 <306> 16-24
 <307> 2005-11-15

 <400> 1

 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Val Leu Thr Ser Lys Ile Arg Asn Phe Xaa
 1 5 10 15

 Xaa Lys Xaa Leu Glu Leu Gln Ile Pro Gly His Thr Asp Leu Leu His
 20 25 30

 Leu Ile Arg Glu Leu Ala Xaa Glu Pro Xaa Gly Ile Lys Tyr Leu Val
 35 40 45

 Glu Ser Tyr Glu Glu Phe Asn Gln Leu Met His Val Ile Asn Phe His
 50 55 60

 Tyr Asp Leu Leu Arg Ala Lys Leu His Asp Met Cys Ala His Asp Tyr
 65 70 75 80

 Cys Lys Ile Pro Glu His Leu Lys Ile Ser Asp Lys Glu Leu Asp Met
 85 90 95

 Leu Lys Lys Val Val Leu Gly Tyr Arg Lys Pro Leu Asp Asn Ile Lys
 100 105 110

 Asp Asp Ile Gly Lys Leu Glu Xaa Phe Ile Thr Lys Asn Lys Xaa Thr
 115 120 125

 Ile Xaa Asn Ile Xaa Xaa Leu Ile Xaa Xaa Glu Asn Xaa Lys Arg Xaa
 130 135 140

Sequence Listing.ST25

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

Pro His

<210> 2
 <211> 366
 <212> PRT
 <213> Plasmodium vivax
 <400> 2

Sequence Listing.ST25

Asn Asn Asn Gln Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Ile Arg Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Ser Lys Phe Leu Glu Leu Gln Ile Pro Gly His Thr Asp Leu Leu His
 20 25 30

Leu Ile Arg Glu Leu Ala Val Glu Pro Asn Gly Ile Lys Tyr Leu Val
 35 40 45

Glu Ser Tyr Glu Glu Phe Asn Gln Leu Met His Val Ile Asn Phe His
 50 55 60

Tyr Asp Leu Leu Arg Ala Lys Leu His Asp Met Cys Ala His Asp Tyr
 65 70 75 80

Cys Lys Ile Pro Glu His Leu Lys Ile Ser Asp Lys Glu Leu Asp Met
 85 90 95

Leu Lys Lys Val Val Leu Gly Tyr Arg Lys Pro Leu Asp Asn Ile Lys
 100 105 110

Asp Asp Ile Gly Lys Leu Glu Thr Phe Ile Thr Lys Asn Lys Ile Thr
 115 120 125

Ile Lys Asn Ile Ser Asp Leu Ile Ile Ala Glu Asn Lys Lys Arg Ser
 130 135 140

Gly His Pro Thr Thr Thr Thr Asn Gly Ala Gly Thr Gln Pro Ala Asn
 145 150 155 160

Gly Ser Ile Ala Ala Ala Ser Ser Glu Thr Thr Gln Ile Ser Gly Ser
 165 170 175

Ser Asn Ser Gly Ser Ser Ser Thr Gly Ser Ser Asn Ser Gly Ser Ser
 180 185 190

Ser Thr Gly Ser Ser Gly Thr Gly Ser Thr Gly Thr Gly Gln Ser Pro
 195 200 205

Pro Ala Ala Ala Asp Ala Ser Ser Thr Asn Ala Asn Tyr Glu Ala Lys
 210 215 220

Lys Ile Ile Tyr Gln Ala Val Tyr Asn Thr Ile Phe Tyr Thr Asn Gln
 225 230 235 240

Leu Gln Glu Ala Gln Lys Leu Ile Ala Val Leu Glu Lys Arg Val Lys
 245 250 255

Sequence Listing.ST25

Val Leu Lys Glu His Lys Asp Ile Lys Val Leu Leu Glu Gln Val Ala
 260 265 270

Lys Glu Lys Glu Lys Leu Pro Ser Asp Tyr Pro Asn Thr Thr Asn Leu
 275 280 285

Thr Asn Val His Lys Glu Ala Glu Ser Lys Ile Ala Glu Leu Glu Lys
 290 295 300

Lys Ile Glu Ala Ile Ala Lys Thr Val Asn Phe Asp Leu Asp Gly Leu
 305 310 315 320

Phe Thr Asp Ala Glu Glu Leu Glu Tyr Tyr Leu Arg Glu Lys Ala Lys
 325 330 335

Met Ala Gly Thr Leu Ile Ile Pro Glu Ser Thr Lys Ser Ala Gly Thr
 340 345 350

Pro Gly Lys Thr Val Pro Thr Leu Lys Glu Thr Tyr Pro His
 355 360 365

<210> 3
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> Plasmodium vivax

<400> 3

Asn Asn Asn Gln Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Ile Arg Asn Phe Val
 1 5 10 15

Gly Lys Phe Leu Glu Leu Gln Ile Pro Gly His Thr Asp Leu Leu His
 20 25 30

Leu Ile Arg Glu Leu Ala Phe Glu Pro Asn Gly Ile Lys Tyr Leu Val
 35 40 45

Glu Ser Tyr Glu Glu Phe Asn Gln Leu Met His Val Ile Asn Phe His
 50 55 60

Tyr Asp Leu Leu Arg Ala Lys Leu His Asp Met Cys Ala His Asp Tyr
 65 70 75 80

Cys Lys Ile Pro Glu His Leu Lys Ile Ser Asp Lys Glu Leu Asp Met
 85 90 95

Leu Lys Lys Val Val Leu Gly Tyr Arg Lys Pro Leu Asp Asn Ile Lys
 100 105 110

Sequence Listing.ST25

Asp Asp Ile Gly Lys Leu Glu Thr Phe Ile Thr Lys Asn Lys Glu Thr
 115 120 125
 Ile Ser Asn Ile Asn Lys Leu Ile Ser Asp Glu Asn Ala Lys Arg Gly
 130 135 140
 Gly Gln Ser Thr Asn Thr Thr Asn Gly Thr Gly Ala Gln Asn Asn Ala
 145 150 155 160
 Ala Gln Gly Ser Thr Gly Asn Thr Glu Thr Gly Thr Arg Ser Ser Ala
 165 170 175
 Ser Ser Asn Thr Leu Ser Gly Gly Asp Gly Thr Thr Val Val Gly Thr
 180 185 190
 Ser Ser Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ser Thr Asn Glu Asp Tyr Asp
 195 200 205
 Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Gln Ala Met Tyr Asn Gly Ile Phe Tyr Thr
 210 215 220
 Ser Gln Leu Glu Glu Ala Gln Lys Leu Ile Glu Val Leu Glu Lys Arg
 225 230 235 240
 Val Lys Val Leu Lys Glu His Lys Gly Ile Lys Ala Leu Leu Glu Gln
 245 250 255
 Val Glu Ala Glu Lys Lys Lys Leu Pro Lys Asp Asn Thr Thr Asn Thr
 260 265 270
 Pro Leu Thr Asp Glu Gln Gln Lys Ala Ala Gln Lys Lys Ile Ala Asp
 275 280 285
 Leu Glu Ser Gln Ile Val Ala Asn Ala Lys Thr Val Asn Phe Asp Leu
 290 295 300
 Asp Gly Leu Phe Thr Asp Ala Glu Glu Leu Glu Tyr Tyr Leu Arg Glu
 305 310 315 320
 Lys Ala Lys Met Ala Gly Thr Leu Ile Ile Pro Glu Ser Thr Lys Ser
 325 330 335
 Ala Gly Thr Pro Gly Lys Thr Val Pro Thr Leu Lys Glu Thr Tyr Pro
 340 345 350
 His

Sequence Listing.

<210> 4
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Recombinant protein containing a fragment of protein MSP-1 from Plasmodium vivax, an amino acid methionine and six amino acids histidine in N-terminal end of said fragment.

<400> 4

Met His His His His His His Ile Thr Ile Phe Pro Ser Val Leu Thr
 1 5 10 15

Ser Lys Ile Arg Asn Phe Val Gly Lys Ser Leu Glu Leu Gln Ile Pro
 20 25 30

Gly His Thr Asp Leu Leu His Leu Ile Arg Glu Leu Ala Phe Glu Pro
 35 40 45

His Gly Ile Lys Tyr Leu Val Glu Ser Tyr Glu Glu Phe Asn Gln Leu
 50 55 60

Met His Val Ile Asn Phe His Tyr Asp Leu Leu Arg Ala Lys Leu His
 65 70 75 80

Asp Met Cys Ala His Asp Tyr Cys Lys Ile Pro Glu His Leu Lys Ile
 85 90 95

Ser Asp Lys Glu Leu Asp Met Leu Lys Lys Val Val Leu Gly Tyr Arg
 100 105 110

Lys Pro Leu Asp Asn Ile Lys Asp Asp Ile Gly Lys Leu Glu Ala Phe
 115 120 125

Ile Thr Lys Asn Lys Glu Thr Ile Ser Asn Ile Asn Lys Leu Ile Ser
 130 135 140

Asp Glu Asn Ala Lys Arg Gly Ser Gln Ser Thr Asn Thr Thr Asn Gly
 145 150 155 160

Thr Gly Ala Gln Asn Asn Ala Ala Gln Gly Ser Thr Gly Asn Thr Glu
 165 170 175

Thr Gly Thr Gln Ser Ser Ala Ser Ser Asn Thr Leu Ser Gly Gly Ala
 180 185 190

Gly Thr Thr Val Val Gly Thr Ser Ser Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser

205

Val Gly Lys Ser Leu Glu Leu Gln Ile Pro Gly His Thr Asp Leu Leu
20 25 30

Sequence Listing.ST25

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

Sequence Listing.ST25

Asp Leu Glu Ser Gln Ile Val Ala Ile Ala Lys Thr Val Asn Phe Asp
 290 295 300

Leu Asp Gly Leu Phe Thr Asp Ala Glu Glu Leu Glu Tyr Tyr Leu Arg
 305 310 315 320

Glu Lys Ala Lys Met Ala Gly Thr Leu Ile Ile Pro Glu Ser Thr Lys
 325 330 335

Ser Ala Gly Thr Pro Gly Lys Thr Val Pro Thr Leu Lys Glu Thr Tyr
 340 345 350

Pro His His His His His His
 355

<210> 6
 <211> 1165
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Recombinant DNA codifying a protein comprising an amino acid methionine, a sequence ITIFP, six amino acids histidine and a fragment of protein MSP-1 from Plasmodium vivax.

<400> 6
 atgcaccacc accaccacca ccaataacaa tctttcccag cgttttaact tccaaaataa 60
 gaaatttcgt gggcaagtct ttggagctac aaattcctgg acataccgac ttgctacacc 120
 tgataagaga attggccttt gaaccccatg ggataaaata ccttggtggag agctacgaag 180
 aattcaatca actgatgcac gtgatcaact tccactatga tttgttgagg gcgaagctcc 240
 acgacatgtg tgcccacgat tattgcaaaa taccggagca tctaaaaatc tctgacaaaag 300
 agctggacat gctcaagaaa gttgttctgg gctataggaa gcccttgac aacataaaag 360
 acgacattgg aaaattggag gcctttatca ctaaaaacaa ggaaacaata agcaatataa 420
 acaagttaat tagtgatgag aatgctaaaa ggggaagcca atccaccaac acgactaatg 480
 gaaccggagc gcaaaacaat gctgctcaag gttcaacagg caatactgaa acaggtactc 540
 aaagttctgc ttcattctaac actctctcgg gtggcgctgg tacgacggtc gtaggaacat 600
 cttctccagc acctgctgct ccatcttcaa caaatgcaaa ctacgaagcg aagaaaatca 660
 tctaccaagc catctacaac ggcatatttt acacgaacca gctggaggag gcgcaaaagt 720
 taatcgaagt cctggagaag cgcgtgaaag tgctgaagga gcacaaaggc atcaaggcgc 780
 tactcgaaca ggtcgaagca gaaaagaaaa agcttcctaaa agataatacc accaatacac 840
 cccttacaga tgaacaacag aaagcagccc aaaagaaaat tgccgaccta gagagtcaga 900
 tcgttgctat cgctaaaacc gttaacttcg acctggacgg tctgttcacc gacgctgaag 960

Sequence Listing.ST25

aactggaata ctacctgaaa tcgtagccat cgccaagact gtgaacttcg acctggacgg 1020
 tctgtttact gacgcagagg agttggagta ctatttgagg gagaaggcaa agatggccgg 1080
 cacgctaata atcccagaaa gcaccaaata agcaggcacc cctggaaaga cagttccaac 1140
 cctgaaagag acctaccac actga 1165

<210> 7
 <211> 1080
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Recombinant DNA codifying an amino acid methionine, a sequence ITIFP, a fragment of protein MSP-1 from Plasmodium vivax and six amino acids histidine.

<400> 7
 atgatcacca tcttcccgtc tgttctgacc tctaagatcc gtaacttcgt tggtaaactct 60
 ctggaactgc agatcccggg tcacaccgac ctgctgcacc tgatccgtga actggctttc 120
 gaaccgcacg gatatcaata cctgggttgaa tcttacgaag aattcaacca gctgatgcac 180
 gttatcaact tccactacga cctgctgcgt gctaaactgc acgacatgtg cgctcacgac 240
 tactgcaaaa tcccggaaca cctgaaaatc tctgacaaag aactggacat gctgaagaaa 300
 gttgttctgg gttaccgtaa accgctggac aacatcaaag acgacatcgg taaactggaa 360
 gctttcatca ccaagaacaa agaaaccatc tctaactca acaaactgat ctctgacgaa 420
 aacgctaaac gtgggttctca gtctaccaac accaccaacg gtaccgggtgc tcagaacaac 480
 gctgctcagg gttctaccgg taacaccgaa accggtaccc agtcttctgc ttcttctaac 540
 accctgtctg gtggtgctgg taccaccgtt gttggtacct cttctccggc tccggctgct 600
 ccgtcttcta ccaacgctaa ctacgaagct aagaaaatca tctaccaggc tatctacaac 660
 ggtatcttct acaccaacca gctggaagaa gctcagaaac tgatcgaagt tctggagaaa 720
 cgtgttaaag ttctgaaaga acacaaaggt atcaaagctc tgctggaaca ggttgaagct 780
 gaaaagaaga aactgccgaa agacaacacc accaacacc cgctgaccga cgaacagcag 840
 aaagctgctc agaagaaaat cgctgacctg gaatctcaga tcgttgctat cgctaaaacc 900
 gttaacttcg acctggacgg tctgttcacc gacgctgaag aactggaata ctacctgcgt 960
 gaaaaggcta aaatggctgg taccctgatc atcccggaat ctaccaaata tgctggtacc 1020
 ccgggtaaaa ccgttccgac cctgaaagaa acctaccgc accaccacca ccaccactga 1080

| | | |
|-------------|---|--|
| VIII-5-1 | Declaración: Divulgaciones no perjudiciales o excepciones a la falta de novedad Declaración sobre las divulgaciones no perjudiciales o las excepciones a la falta de novedad (Reglas 4.17.v) y 51bis.1.a)v) Nombre (APELLIDOS, Nombre) | respecto de esta solicitud internacional CENTRO INTERNACIONAL DE VACUNAS declara que el objeto reivindicado en esta solicitud internacional se divulgó como sigue: |
| VIII-5-1(i) | Tipo de divulgación: | publicación |
| VIII-5-1(i) | fecha de la divulgación: | 15 Noviembre 2005 (15.11.2005) |
| VIII-5-1(i) | Título de la divulgación: | ANTIGENICITY, IMMUNOGENICITY, AND PROTECTIVE EFFICACY OF |
| VIII-5-1(i) | Lugar de la divulgación: | |
| VIII-5-1(v) | Esta declaración se hace para: | todas las designaciones |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ IB 2006/003835

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT,EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | VALDERRAMA-AGUIRRE A. ET AL. Antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of Plasmodium vivax MSP1 PV200L: a potential malaria vaccine subunit. Am. J. Trop. Med. Hyg. November 2005, Vol 73, Suppl 5, pages16-24. (Ver the whole document) | 1-28 |
| X | GIBSON HL. ET AL. Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of Plasmodium vivax. Molecular and Biochemical Parasitology. 1992, Vol 50, pages 325 334. (Ver the whole document) | 1-28 |
| X | DEL PORTILLO HA. ET AL. Plasmodium vivax: Cloning and Expression of a Major Blood-Stage Surface Antigen. Experimental Parasitology. 1988, Vol 67, pages 346-353. (Ver the whole document) | 1-28 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance. | |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |
| | "&" document member of the same patent family |

Date of the actual completion of the international search

14 September 2007 (14.09.2007)

Date of mailing of the international search report

(21.09.2007)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M^a D. García Grávalos

Telephone No. 913493404

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB 2006/003835

| C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category* | Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | PUTAPORNTIP CH. ET AL. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the Plasmodium vivax merozoite surface protein-1 locus. Proc Nat Acad Sci USA. 2002, Vol 99, N° 25, pages 16348-53. (Ver the whole document) | 1-28 |
| X | DEL PORTILLO HA. ET AL. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of Plasmodium vivax reveals sequences conserved between different Plasmodium species. Proc Natl Acad Sci USA. 1991, Vol 88, pages 4030-4034. (Ver the whole document) | 1-28 |

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/445 (2006.01)

A61K 39/015 (2006.01)

C12N 15/30 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ IB 2006/003835

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C07K, A61K, C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-ALL, UNIPROT, EURO PATENTS, JAPAN PATENTS, US PATENTS, PDB

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones nº |
|------------|---|--|
| X | VALDERRAMA-AGUIRRE A. ET AL. Antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of Plasmodium vivax MSP1 PV200L: a potential malaria vaccine subunit. Am. J. Trop. Med. Hyg. Noviembre 2005, Vol 73, Suppl 5, páginas 16-24. (Ver todo el documento) | 1-28 |
| X | GIBSON HL. ET AL. Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of Plasmodium vivax. Molecular and Biochemical Parasitology. 1992, Vol 50, páginas 325-334. (Ver todo el documento) | 1-28 |
| X | DEL PORTILLO HA. ET AL. Plasmodium vivax: Cloning and Expression of a Major Blood-Stage Surface Antigen. Experimental Parasitology. 1988, Vol 67, páginas 346-353. (Ver todo el documento) | 1-28 |

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

| | | |
|--|-----|--|
| * Categorías especiales de documentos citados: | "T" | documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención. |
| "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante. | "X" | documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. |
| "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior. | "Y" | documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. |
| "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). | "&" | documento que forma parte de la misma familia de patentes. |
| "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio. | | |
| "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada. | | |

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

14 Septiembre 2007 (14.09.2007)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

21 de Septiembre 2007 (21-09-2007)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado
Mª D. García Grávalos

Nº de teléfono 913493404

| DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES | | |
|------------------------------------|---|--|
| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones nº |
| X | PUTAPORNTIP CH. ET AL. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the Plasmodium vivax merozoite surface protein-1 locus. Proc Nat Acad Sci USA. 2002, Vol 99, Nº 25, páginas 16348-53. (Ver todo el documento) | 1-28 |
| X | DEL PORTILLO HA. ET AL. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of Plasmodium vivax reveals sequences conserved between different Plasmodium species. Proc Natl Acad Sci USA. 1991, Vol 88, páginas 4030-4034. (Ver todo el documento) | 1-28 |

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ IB 2006/003835

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 14/445 (2006.01)

A61K 39/015 (2006.01)

C12N 15/30 (2006.01)