



УКРАЇНА

(19) UA (11) 93508 (13) C2

(51) МПК

A61K 39/015 (2011.01)

A61K 39/29 (2011.01)

A61K 39/39 (2011.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) АНТИМАЛЯРІЙНА ВАКЦИНА

1

2

(21) a200713498

(22) 29.06.2006

(24) 25.02.2011

(86) PCT/EP2006/006407, 29.06.2006

(31) 0513421.8

(32) 30.06.2005

(33) GB

(46) 25.02.2011, Бюл.№ 4, 2011 р.

(72) КОЕН ДЖОУЗЕФ Д., BE

(73) ГЛАКСОСМІТКЛАЙН БАЙОЛОДЖІКАЛЗ С.А.,
BE

(56) EP A 0761231, 12.03.1997.

WO A 9633739, 31.10.1996.

WO A 2004037189, 06.05.2004.

EP A 1623720, 08.02.2006.

WO A 9400153, 06.01.1994.

WALSH ET AL: "Heterologous prime-boost immunization in rhesus macaques by two, optimally spaced particle-mediated epidermal deliveries of Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-encoding DNA, followed by intramuscular RTS,S/AS02A" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 24, no. 19, 8 May 2006 (2006-05-08), pages 4167-4178, XP005421562 ISSN: 0264-410X.

BALLOU W R ET AL: "UPDATE ON THE CLINICAL DEVELOPMENT OF CANDIDATE MALARIA VACCINES" AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE & HYGIENE, LAWRENCE, KS, US, vol. 71, no. 2, SUPPL 2, August 2004 (2004-08), pages 239-247, XP009057966 ISSN: 0002-9637.

ALONSO ET AL: "Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against Plasmodium falciparum infection and disease in young African children: randomised controlled trial" LANCET THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB, vol. 364, no. 9443, 16 October 2004 (2004-10-16), pages 1411-1420, XP005106739 ISSN: 0140-6736.

ALONSO ET AL: "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 THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB, vol. 366, no. 9502, 10 December 2005 (2005-12-10), pages 2012-2018, XP005204961 ISSN: 0140-6736.

RICHARDS R L ET AL: "Liposomes containing lipid A serve as an adjuvant for induction of antibody and cytotoxic T-cell responses against RTS,S malaria antigen." INFECTION AND IMMUNITY. JUN 1998, vol. 66, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 2859-2865, XP009073208 ISSN: 0019-9567.
UA C2 68336, 16.08.2004.

(57) 1. Застосування антигена Plasmodium або його імуногенного фрагмента, або похідної та ад'юванта, що включає похідну ліпиду А та сапонін у складі ліпосоми, у виробництві лікарського засобу для імунізації подорожуючих до ендемічних районів проти продуктивної малярійної інфекції, де антиген Plasmodium являє собою білок, що оточує спорозоїт (CS), або його імуногенний фрагмент, або похідну, здатні викликати імунну відповідь проти Plasmodium.

2. Застосування згідно з п. 1, де CS білок або фрагмент є злитим з поверхневим антигеном вірусу гепатиту В (HBsAg).

3. Застосування згідно з п. 2, де CS білок або фрагмент знаходиться в формі гібридного білка, що включає суттєво всю С-термінальну частину CS білка Plasmodium, чотири або більше тандемних повтори імунодомінантної ділянки CS білка, та поверхневий антиген з вірусу гепатиту В (HBsAg).

4. Застосування згідно з будь-яким з пп. 1-3, де гібридний білок включає послідовність CS білка P.falciparum, суттєво таку, що відповідає амінокислотам 207-395 CS білка P. falciparum штаму NF54 клону 3D7, злитого у рамці за допомогою лінійного лінкера з N-термінальною ділянкою HBsAg.

5. Застосування згідно з п. 4, де гібридний білок являє собою RTS.

6. Застосування згідно з п. 5, де RTS знаходиться в формі комбінованих частинок RTS,S.

7. Застосування згідно з п. 6, де кількість RTS,S складає 25 або 50 мкг на дозу.

8. Застосування згідно з будь-яким з пп. 1-7, де ад'ювант включає 3D-MPL та QS21.

9. Застосування згідно з п. 8, де QS21 є блокованим у холестеринвмісних ліпосомах.

10. Застосування згідно з будь-яким з пп. 1-8, у поєднанні з полінуклеотидом, що кодує антиген Plasmodium або його імуногенний фрагмент, або похідну, де суміш антиген/ад'ювант та полінуклео-

(13) C2

(11) 93508

(19) UA

тид призначені для послідовного застосування у будь-якому порядку.

11. Застосування згідно з п. 10, де спочатку використовують полінуклеотид.

12. Композиція, що включає антиген Plasmodium або його імуногенний фрагмент, або похідну та ад'ювант, що містить похідну ліпиду А та сапонін у складі ліпосоми, для застосування при імунізації подорожуючих до ендемічних районів проти продуктивної малярійної інфекції, де антиген Plasmodium являє собою білок, що оточує спорозоїт (CS), або його імуногенний фрагмент, або похідну, здатні викликати імунну відповідь проти Plasmodium.

13. Композиція згідно з п. 12, де CS білок або фрагмент є злитим з поверхневим антигеном вірусу гепатиту В (HBsAg).

14. Композиція згідно з п. 13, де CS білок або фрагмент знаходиться в формі гібридного білка, що включає суттєво всю С-термінальну частину CS білка Plasmodium, чотири або більше тандемних повтори імунодомінантної ділянки CS білка та поверхневий антиген з вірусу гепатиту В (HBsAg).

15. Композиція згідно з будь-яким з пп. 12-14, де гібридний білок включає послідовність CS білка P. falciparum, суттєво таку, що відповідає амінокислотам 207-395 CS білка P. falciparum штаму NF54 клону 3D7, злитого у рамці за допомогою лінійного лінкера з N-термінальною ділянкою HBsAg.

16. Композиція згідно з п. 15, де гібридний білок являє собою RTS.

17. Композиція згідно з п. 16, де RTS знаходиться в формі комбінованих частинок RTS,S.

18. Композиція згідно з п. 17, де кількість RTS,S складає 25 або 50 мкг на дозу.

19. Композиція згідно з будь-яким з пп. 11-18, де ад'ювант включає 3D-MPL та QS21.

20. Композиція згідно з п. 19, де QS21 є блокованим у холестеринвмісних ліпосомах.

21. Композиція згідно з п. 11-20 для застосування як частини режиму примування/бустеризації, де додаткова частина включає полінуклеотид, що кодує антиген Plasmodium або його імуногенний фрагмент, або похідну, де суміш антиген/ад'ювант та полінуклеотид призначені для послідовного застосування у будь-якому порядку.

22. Композиція згідно з п. 21, де спочатку використовують полінуклеотид.

23. Спосіб профілактики продуктивної малярійної інфекції у подорожуючих в ендемічні райони, що передбачає введення прийнятної кількості композиції, яка включає антиген Plasmodium або його імуногенний фрагмент, або похідну та ад'ювант, що містить похідну ліпиду А та сапонін у складі ліпосоми, де антиген Plasmodium являє собою білок, що оточує спорозоїт (CS), або його імуногенний фрагмент, або похідну, здатні викликати імунну відповідь проти Plasmodium.

24. Спосіб згідно з п. 23, де білок або фрагмент є злитим з поверхневим антигеном вірусу гепатиту В (HBsAg).

25. Спосіб згідно з п. 24, де CS білок або фрагмент знаходиться в формі гібридного білка, що включає

суттєво всю С-термінальну частину CS білка Plasmodium, чотири або більше тандемні повтори імунодомінантної ділянки CS білка та поверхневий антиген з вірусу гепатиту В (HBsAg).

26. Спосіб згідно з будь-яким з пп. 23-25, де гібридний білок включає послідовність CS білка P. falciparum, суттєво таку, що відповідає амінокислотам 207-395 CS білка P. falciparum штаму NF54 клону 3D7, злитого у рамці за допомогою лінійного лінкера з N-термінальною ділянкою HBsAg.

27. Спосіб згідно з п. 26, де гібридний білок являє собою RTS.

28. Спосіб згідно з п. 27, де RTS знаходиться в формі комбінованих частинок RTS,S.

29. Спосіб згідно з п. 28, де кількість RTS,S складає 25 або 50 мкг на дозу.

30. Спосіб згідно з будь-яким з п. 23-29, де ад'ювант включає 3D-MPL та QS21.

31. Спосіб згідно з п. 30, де QS21 є блокованим у холестеринвмісних ліпосомах.

32. Спосіб згідно з будь-яким з пп. 23-31, що додатково включає введення полінуклеотиду, що кодує антиген Plasmodium або його імуногенний фрагмент, або похідну, для застосування у режимі примування/бустеризації.

33. Спосіб згідно з п. 32, де спочатку використовують полінуклеотид.

34. Застосування антигена Plasmodium або його імуногенного фрагмента, або похідної та ад'юванта, що включає похідну ліпиду А та сапонін у складі ліпосоми, у виробництві набору для імунізації подорожуючих до ендемічних районів проти малярійної інфекції, де антиген забезпечується у ліофілізованій формі, а антиген та ад'ювант змішують перед введенням, і де антиген Plasmodium являє собою білок, що оточує спорозоїт (CS), або його імуногенний фрагмент, або похідну, здатні викликати імунну відповідь проти Plasmodium.

35. Набір, що включає:

антиген Plasmodium або його імуногенний фрагмент, або похідну, що забезпечується в ліофілізованій формі, де антиген Plasmodium являє собою білок, що оточує спорозоїт (CS), або його імуногенний фрагмент, або похідну, здатні викликати імунну відповідь проти Plasmodium, ад'ювант, що включає похідну ліпиду А та сапонін у складі ліпосоми, та

інструкції, які вказують, що антиген, ад'ювант та, необов'язково, додатковий носій, змішують перед введенням подорожуючому до ендемічних районів,

забезпечуючи, таким чином, захист вказаного подорожуючого від продуктивної малярійної інфекції.

36. Набір згідно з п. 35, що додатково включає полінуклеотид, який кодує антиген Plasmodium або його імуногенний фрагмент, або похідну, де суміш антиген/ад'ювант та полінуклеотид призначені для застосування послідовно у будь-якому порядку, але, зокрема, де полінуклеотид використовують для примування, а суміш антиген/ад'ювант використовують для бустеризації.

Даний винахід відноситься до нового застосування малярійного антигену для імунізації проти малярійних інфекцій та захворювання. Винахід відноситься, зокрема, до застосування антигенів спорозоїту, зокрема, білка, що оточує спорозоїт (CS), його імуногенних фрагментів або похідних, поєднаних з прийнятними ад'ювантами, для імунізації індивідуумів, що не піддавалися впливу малярії та які планують подорож до ендемічних районів, проти малярійної інфекції.

Малярія представляє собою одну з основних проблем охорони здоров'я у світі. Протягом 20-ого століття економічний та соціальний розвиток разом з антималярійними заходами привели до викорінення малярії на значних ділянках земного шару, знизивши площу ділянок земної поверхні, які піддаються впливу малярії, з 50 до 27%. Проте, беручи до уваги очікуваний ріст населення, планується, що на 2010 рік половина населення Землі, близько 3,5 біліонів людей, буде жити в областях, де поширена малярія (Нан, 2004). За сучасними оцінками кількість смертей з причини малярії щорічно становить більше 1 мільйона, а економічні витрати тільки для Африки є дуже значними (Бремен, 2004).

Ці дані висувають на перший план глобальну малярійну кризу та випробування, які вона ставить перед міжнародними органами охорони здоров'я. Причини цієї кризи є множинними та знаходяться у межах від виникнення широко розповсюдженої стійкості до доступних та раніше високо ефективних лікарських засобів до порушення та неадекватності систем здоров'я та відсутності ресурсів. Поки не будуть знайдені шляхи для боротьби з цим захворюванням, глобальні зусилля щодо поліпшення здоров'я та виживання дітей, зниження бідності, підвищення безпеки та стабілізації положення найбільш незахищених шарів населення будуть марними.

Малярія також складає ризик для тих, хто подорожує або працює в ендемічних районах та, звичайно живе у країнах, вільних від малярії. Ризики можуть бути більшими для такого подорожуючого населення, оскільки воно не має будь-якого фонового імунітету до малярії, спричиненого підданям природному зараженню малярією. Другий аспект цього ризику, якому піддається подорожуючий до ендемічних районів малярії, полягає у тому, що захворювання часто неправильно діагностують на його ранніх стадіях з причини симптомів, подібних до застуди. Коли тяжкість підвищується, та малярія, у кінці кінців, діагностується, це може бути занадто пізно. Протягом декількох днів посилення симптомів може настати смерть, наприклад, внаслідок церебральної малярії або недостатності деяких органів (наприклад, печінки або нирок).

Одна з найбільш гострих форм цього захворювання спричинюється протозойним паразитом *Plasmodium falciparum*, що відповідає за найбільшу смертність, притаманну малярії. Інша форма захворювання спричинюється *Plasmodium vivax*. *P. vivax* є найбільш поширеним серед інших збудників малярії. На доповнення до того, що він є представленим у тропічних та субтропічних районах,

здатність паразита завершувати свій москитний цикл при температурах, нижчих 15°C, дозволяє йому розповсюджуватися у районах помірного клімату. Проте завдяки тому факту, що інфекція *P. vivax* рідше буває смертельною, зусилля щодо боротьби з малярією *P. vivax* (шляхом розробки вакцини) відстають від таких для *P. falciparum*.

Спостереження, зроблені 30 років тому, забезпечили сильну підтримку для надії на те, що буде нарешті розроблена ефективна малярійна вакцина. Миші та люди можуть бути захищені від малярії шляхом імунізації за допомогою живих малярійних спорозоїтів або таких, атенуйованих при використанні опромінення. Персистенція внутрішньопечінкової стадії *in vivo* є необхідною для одержання та підтримання протективного імунітету, але механізми, що лежать в основі цього явища, ще не є повністю визначеними. Антитіла, CD8 та CD4 Т-клітини (Hoffman, 1996) передбачаються як вирішальні ефекторні медіатори імунітету.

Життєвий цикл *C. lasmodium* s c (наприклад, *P. falciparum* або *C. vivax*) є складним, потребує двох хазяїв, людини та москіта, для свого завершення. Інфекція у людини ініціюється інокуляцією спорозоїтів у слину інфікованого москіта. Спорозоїти переміщуються до печінки та там інфікують гепатоцити (печінкова стадія), де вони піддаються диференціації через екзоеритроцитарну внутрішньоклітинну стадію у стадію мерозоїту, який інфікує еритроцити крові (RBC) для ініціації циклічної реплікації на безстатевої стадії у крові. У RBC цикл завершується диференціацією ряду мерозоїтів у статеву стадію гаметоцитів, які споживаються москітом, там вони розвиваються через серію стадій у середній кишці з виникненням спорозоїтів, які переміщуються у слинну залозу.

Стадія спорозоїтів *Plasmodium* sp (наприклад, *P. falciparum* або *P. vivax*) була ідентифікована як потенційна мішень для малярійної вакцини. Основний поверхневий білок спорозоїту є відомим як білок, що оточує спорозоїт (CS білок). Цей білок був клонований, експресований та секвенований для різноманітних штамів, наприклад, для штаму NF54 *P. falciparum*, клону 3D7 (Caspers, 1989). Білок зі штаму 3D7 характеризується наявністю центральної імунодомінантної повторюваної ділянки, що включає тетрапептид Asn-Ala-Asn-Pro, який повторюється 40 разів, але переривається чотирма мінорними повторами тетрапептиду Asn-Val-Asp-Pro. В інших штамів кількість основних та мінорних повторів також варіює, як й їх відносне положення. Ця центральна частина фланкується N- та C-термінальними частинами, які складаються з неповторюваних амінокислотних послідовностей, що називаються неповторюваною частиною CS білка.

RTS.S малярійна вакцина GlaxoSmithKline Biologicals, яка базується на CS білку піддається розробці з 1987 року, та на сьогоднішній момент вона представляє собою найбільш сучасну кандидатну малярійну вакцина, що досліджується (Ballou, 2004). Ця вакцина є специфічно націленою на етап розвитку *P. falciparum*, який передує еритроцитарному.

RTS,S/AS02A (RTS,S плюс ад'ювант AS02A, що містить імуностимулятори QS21, 3D-MPL та емульсійне масло-у-воді) використовувалася у подальшій фазі I досліджень, які проводилися у Гамбії на дорослих особах (Doherty, 1999), дітях у віці 6-11 та 1-5 років (Bojang, 2005). Ці дослідження підтвердили, що вакцина була безпечною, імуногенною та є такою, що добре переноситься. Пізніше була вибрана педіатрична вакцинна доза, яка вивчалася у фазі I дослідження на мозамбіцьких дітях у віці 1-4 роки, при цьому вона була виявлена як безпечна, імуногенна та така, що добре переноситься (Macete).

RTS,S/AS02A вакцина була продемонстрована як ефективна у клінічних дослідженнях у США та в районі Західної Африки. RTS,S/AS02A індукуює значні відповіді IgG антитіл на білок *P. falciparum*, що оточує спорозоїт, а також спричинює суттєвий Т-клітинний імунітет (Lalvani, 1999; Sun, 2003). Ефективність щодо експериментального зараження *P. falciparum* у волонтерів, які раніше не піддавалися інфікуванню у США, була оцінена як така, що складає у середньому 30-50% (Stoute, 1997; Stoute 1998; Kester, 2001). Перше з цих досліджень (Stoute, 1997) показало 86%-ну ефективність у маломасштабному експерименті, в якому 6 з 7 імунізованих за допомогою RTS,S/AS02A індивідумів були захищеними. Крім того, дослідження у природних умовах напівімунних дорослих осіб у Гамбії (яке передувало дослідженню безпеки на дорослих особах у Гамбії (Doherty, 1999)) показало середню ефективність 34% протягом періоду одного сезону передачі тривалістю 15 тижнів, з 71%-ною ефективністю у перші дев'ять тижнів усього періоду та 0%-ою ефективністю після цього (Bojang, 2001). Ці дослідження (Stoute, 1997; Stoute, 1998; Bojang, 2001; Kester, 2001) продемонстрували ефективність проти інфекції.

Нещодавно були отримані результати дослідів при використанні RTS,S/AS02A на маленьких африканських дітях. Було виявлено, що RTS,S вакцина на основі CS білка може забезпечувати не тільки захист проти інфекції при природному зараженні, але також й захист проти широкого спектру клінічних захворювань, спричинених *P. falciparum*. Діти, які одержували RTS,S вакцину, мали незначні серйозні побічні явища, низький процент госпіталізації та тяжких ускладнень, від малярії, включаючи смерть, ніж такі у контрольній групі (Alonso, 2004).

Крім того, ефективність RTS,S вакцини як проти нової інфекції, так і проти клінічних випадків, або не спадала, або спадала дуже повільно. Наприкінці шестимісячного періоду дослідження вакцина залишалася ефективною, оскільки існувала значна відмінність у частоті виникнення інфекції. Цим вказані дослідження відрізнялися від попередніх досліджень у групі волонтерів, які раніше не піддавалися впливу малярійних антигенів або на дорослих особах у Гамбії, ці дослідження дали можливість говорити про те, що ефективність вакцини RTS,S була нетривалою (Stoute, 1998; Bojang, 2001). Крім того, після додаткового подальшого дванадцятимісячного періоду експерименту спостерігали, що ефективність вакцини проти

випадків клінічної малярії суттєво не спадала (Alonso, 2005).

Незважаючи на те, що вакцинна композиція, описана вище, показала клінічну ефективність, додаткові удосконалення все ще є необхідними для того, щоб підвищити як кількість захищених індивідумів, так і персистенцію захисту. Нові ад'ювантні композиції, такі, як композиція, що містить QS21 та 3D-MPL у складі ліпосом (в даній заявці далі згадується як ад'ювант В), продемонстрували високу потужність для стимулювання імунної відповіді у різноманітних доклінічних та клінічних дослідженнях.

Зокрема, основна вимога до вакцини, призначеної для людей, які не походять з ендемічних щодо малярії районів, але подорожують протягом обмеженого періоду часу до районів, де малярія є ендемічною, це - поліпшений захист від інфекції. Клінічне виявлення малярії є можливим тільки тоді, якщо існує продуктивна інфекція печінки, що приводить до утворення мерозоїтів та їх вивільнення на печінковій стадії. Ці мерозоїти можуть потім інфікувати RBC та ініціювати патогенну кров'яну стадію паразита, що приводить до симптоматичної клінічної малярії. Якщо немає продуктивної інфекції після піддання зараженню (тобто немає інфекції печінки та/або вивільнення печінкових мерозоїтів), то це є відомим як стерильний імунітет. Вакцина, яка б мала здатність суттєво знижувати ризик продуктивної інфекції печінки, як визначено вище, після укусу москіта, була б дуже бажаною для популяції подорожуючих, які не мають імунітету, який існував раніше, оскільки шляхом запобігання продуктивній печінковій інфекції вакцина змогла б запобігати будь-яким подальшим клінічним проявам. У цьому полягає відмінність стосовно мети удосконалення вакцини для дітей або людей в ендемічних районах, де основна мета полягає у тому, щоб знизити тяжкість захворювання та/або знизити кількість епізодів захворювання, але не у тому, щоб з необхідністю повністю запобігти їм. Теоретично, не є можливим підтримувати стерильний імунітет протягом невизначеного періоду часу в ендемічних районах, такі особи мають потребу побудувати свій власний імунітет шляхом піддання впливу малярійної інфекції. Крім того, не є доцільним забезпечувати надання стерильного захисту для людей, які живуть в ендемічних районах, протягом тривалого, але обмеженого періоду часу.

Ми описали в даній заявці клінічні стимульовані досліді, які складаються з порівняння RTS,S/AS02A з RTS,S, що містить різні ад'юванти (ад'ювант В), які включають QS21 та 3D-MPL у складі холестеринвмісних ліпосом, у популяції людей, які раніше не піддавалися впливу малярійної інфекції (див. Приклади). При цьому оцінювали імунітет, опосередкований як Т-, так і В-клітинами.

Результати показують, що у популяції дорослих людей, які раніше не піддавалися впливу малярійної інфекції, RTS,S антиген у комбінації з ад'ювантом В є більш, ніж на 50% більш ефективним стосовно захисту від продуктивної печінкової інфекції після контрольного зараження малярією, ніж RTS,S/AS02A. Таким чином, RTS,S антиген у

комбінації з ад'ювантом В є більш ефективним для стерильного захисту, який є необхідним для інтактних щодо малярії індивідуумів, які подорожують до районів, де малярія є ендемічною. Ця підвищена ефективність, що забезпечується за рахунок ад'юванта В, асоціюється з підвищеною антиген-специфічною імунною відповіддю (антитіла та CD4-Th1 Т-клітини).

Таким чином, даний винахід забезпечує застосування антигену Plasmodium або його імуногенного фрагменту, або похідної та ад'юванта, що включає похідну ліпиду А та сапонін у складі ліпосом, при виробництві лікарського засобу для імунізації подорожуючих до ендемічних районів проти продуктивної малярійної інфекції.

В загальному випадку, подорожуючі до ендемічних районів є такими, що не піддавалися раніше впливу малярійної інфекції. Таким чином, винахід застосовується для інтактних щодо малярії індивідуумів.

Зокрема, винахід стосується зниження частоти виникнення продуктивних малярійних інфекцій у подорожуючих до ендемічних районів, які можуть бути будь-якого віку, але, зокрема, бути дорослими.

Другий аспект даного винаходу забезпечує композицію, яка включає антиген Plasmodium або його імуногенний фрагмент, або похідну та ад'ювант, що містить похідну ліпиду А та сапонін у складі ліпосом, для застосування для імунізації подорожуючих до ендемічних районів проти продуктивної малярійної інфекції.

У третьому аспекті винахід забезпечує спосіб профілактики продуктивної малярійної інфекції у подорожуючих в ендемічні райони, що включає введення прийнятної кількості композиції, що містить антиген Plasmodium або його імуногенний фрагмент, або похідну та ад'ювант, що включає похідну ліпиду А та сапонін у складі ліпосом.

В одному втіленні винаходу антиген Plasmodium представляє собою антиген *P. falciparum*. В іншому втіленні винаходу антиген Plasmodium представляє собою антиген *P. vivax*.

Є прийнятним, коли антиген є пре-еритроцитарним антигеном.

Антиген може, наприклад, бути вибраний з будь-якого антигену, що експресується на спорозоїті або іншій пре-еритроцитарній стадії паразита, такий, як печінкова стадія.

Наприклад, антиген може бути вибраний з білка, який оточує спорозоїт (CS), антигену-1 печінкової стадії (LSA-1) (див., наприклад, WO2004/044167), антигену-3 печінкової стадії (LSA-3) (описаний, наприклад, в EP 0 570 489 та EP 0 833 917), Pfs масою 16 кДа (описаний в WO 91/18922 та EP 597 843), антигену-1, що експортується (Exp-1) (описаний, наприклад, в Meraldi та ін. 2002, *Parasite Immunol.* том 24(3): 141), збагаченого треоніном-аспарагіном білка спорозоїту (STARP), антигену спорозоїту та печінкової стадії (SALSA), тромбоспондину, пов'язаного з невідомим білком (TRAP) (описаний в WO 90/01496, WO 91/11516 та WO 92/11868) та апікального антигену-1 (AMA-1) мерозоїту (описаний в EP 0 372 019), який нещодавно був показаний як такий, що є при-

сутнім на печінковій стадії (на доповнення до еритроцитарної стадії). Усі ці антигени є добре відомим в області техніки. Антиген може представляти собою або цільний білок або його імуногенний фрагмент, або похідну, або обидва. Імуногенні фрагменти малярійних антигенів є добре відомими, наприклад, ектодомен з AMA-1 (описаний, наприклад, в WO 02/077195). Похідні включають, наприклад, злиті конструкції з іншими білками, які можуть представляти собою малярійні білки або немаларійні білки, такі, як HBsAg. Похідні згідно з даним винаходом є здатними підвищувати імунну відповідь проти нативного антигену.

Антиген Plasmodium може бути злитий з поверхневим антигеном вірусу гепатиту В (HBsAg).

Зокрема, один антиген для застосування у винаході має походження від білка, який оточує спорозоїт (CS) та може знаходитися у формі гібридного білка з HBsAg. Антиген може бути цільним CS білком або його частиною, включаючи фрагмент або фрагменти CS білка, при цьому вказані фрагменти є злитими один з одним.

CS білок на основі антигену може бути у формі гібридного білка, що включає суттєво усю С-термінальну частину CS білка Plasmodium, чотири або більше тандемні повтори імунодомінантної ділянки CS білка, та поверхневий антиген з вірусу гепатиту В (HBsAg). Гібридний білок може включати послідовність, що містить, принаймні, 160 амінокислот та яка є суттєво гомологічною до С-термінальної частини CS білка. Зокрема, «суттєво уся С-термінальна частина CS білка» включає С-термінальний кінець за виключенням гідрофобної «якірної» послідовності. Крім того, у випадку антигену з Plasmodium falciparum, він містить 4 або більше, наприклад, 10 або більше Asn-Ala-Asn-Pro тетрапептидних повторюваних ділянок. CS білок може не мати 12 амінокислот С-термінального кінця.

Гібридний білок для застосування у даному винаході може представляти собою білок, який включає частину CS білка *P. falciparum* суттєво ту, що відповідає амінокислотам 207-395 *P. falciparum* клона 3D7, який походить від штаму NF54 (Caspers, 1989), злитого у рамці за допомогою лінійного лінкера з N-термінальною частиною HBsAg. Лінкер може включати частину preS2 з HBsAg.

CS конструкції для застосування у даному винаході є такими, як описано у WO 93/10152. Одна така конструкція представляє собою гібридний білок, відомий як RTS, що описаний в WO 93/10152 (де він позначається як RTS*) та WO 98/05355, повний зміст обох цих джерел є введеним у дану заявку як посилання.

Окремий білок для застосування у даному винаході представляє собою гібридний білок, відомий як RTS, що складається з:

- Залишку метіоніну, який кодується нуклеотидами від 1059 до 1061, що одержані з генної послідовності *Saccharomyces cerevisiae* TDH3 (Musti, 1983).

- Трьох амінокислот, Met Ala Pro, одержаних з нуклеотидної послідовності (від 1062 до 1070), створеної за допомогою процедури клонування,

яка використовується для конструкції гібридного гена.

- Ланцюга з 189 амінокислот, що кодується нуклеотидами від 1071 до 1637, що представляють собою амінокислоти від 207 до 395 білка, що оточує спорозоїт (CSP) *Plasmodium falciparum* штаму 3D7 (Caspers, 1989). Амінокислота (Gly), яка кодується нуклеотидами від 1638 до 1640, що створені за допомогою процедури клонування при використанні конструкції гібридного гена.

- Чотири амінокислоти, Pro Val Thr Asn, що кодуються нуклеотидами від 1641 до 1652 та представляють собою чотири карбокситермінальні залишки вірусу гепатиту В (серотип adw) preS2 білка (Valenzuela, 1979).

- Послідовність 226 амінокислот, що кодуються нуклеотидами від 1653 до 2330, та визначають S білок вірусу гепатиту В (серотип adw).

RTS може бути в формі RTS,S комбінованих частинок.

RTS,S частинки включають два поліпептиди RTS та S, які можуть бути синтезовані одночасно та спонтанно утворюють складні корпускулярні структури (RTS,S), наприклад, під час очистки.

RTS білок може експресуватися у дріжджах, наприклад, *S. cerevisiae*. У такому хазяїні RTS буде експресуватися у вигляді ліпопротеїнових частинок. Реципієнтний дріжджовий штам може вже нести у своєму геномі декілька інтегрованих копій S експресійної касети гепатиту В. Одержаний штам, таким чином, синтезує два поліпептиди, S та RTS, що спонтанно поєднуються у змішані (RTS,S) ліпопротеїнові частинки. Ці частинки можуть бути присутніми у CSP послідовностях гібриду на його поверхні. RTS та S у цих комбінованих частинках можуть бути присутніми у специфічному співвідношенні, наприклад, 1:4.

Застосування додаткового малярійного антигену або його фрагменту, або похідної у винаході також охоплюється даним винаходом. Інші преритроцитарні антигени, такі, як AMA-1, LSA-1, LSA-3 (описані, наприклад, в EP 0 570 489 та EP 0 833 917) та Pfs вагою 16кДа, можуть використовуватися у комбінації з RTS,S. Альтернативно, RTS,S може використовуватися у комбінації з антигеном кров'яної стадії, таким, як поверхневий білок-1 мерозоїту (MSP-1) (описаний, наприклад, в US 4,837,016), антиген-175, що відповідає за зв'язування з еритроцитами (EBA-175) або MSP-3 (описаний, наприклад, в EP 0 666 916).

Імуногенні фрагменти будь-якого з цих антигенів, як описано в даній заявці, будуть містити, принаймні, один епітоп антигену та демонструють антигенність стосовно малярії, а також є здатними до підвищення імунної відповіді, коли презентуються у прийнятній конструкції, так, як, наприклад, коли експресуються з іншими малярійними антигенами або іншими немаларійними антигенами, або презентуються на носії, при цьому імунна відповідь є направленою проти нативного антигену. Типово, імуногенні фрагменти містять, принаймні, 20, або, принаймні, 50, або, принаймні, 100, суміжних амінокислот з малярійного антигену.

Похідні антигенів або фрагментів, як описано в даній заявці, будуть подібним чином містити, при-

наймні, один епітоп антигену та демонструвати антигенність стосовно малярії, а також будуть здатними до підвищення імунної відповіді, направленої проти нативного антигену. Похідні включають, наприклад, злиті конструкції малярійного антигену з іншим білком, який може бути або може не бути іншим малярійним білком та може бути, наприклад, HBsAg.

Згідно з даним винаходом водний розчин очищеного гібридного білка може використовуватися безпосередньо та поєднуватися з прийнятим ад'ювантом згідно з винаходом. Альтернативно, білок може бути ліофілізований перед змішуванням його з ад'ювантом. Ад'ювант може бути рідким та, таким чином, може використовуватися для відновлення антигену у рідкій формі вакцини.

Таким чином, винахід додатково забезпечує застосування антигену *Plasmodium* або його імуногенного фрагменту, або похідної та ад'юванту, що включає похідну ліпиду А та сапонін у складі ліпосоми, як описано в даній заявці, у виробництві набору для імунізації подорожувачих в ендемічні райони проти малярії, де антиген забезпечується у ліофілізованій формі, а антиген та ад'ювант змішуються перед введенням.

Вакцинна доза згідно з винаходом може складати від 1 до 100 мкг RTS,S на дозу, наприклад, від 25 до 75 мкг RTS,S, наприклад, дозу 50 мкг RTS,S білка, який може бути присутнім у 500 мкл (заклучна рідка композиція). Це є прийнятною дозою для застосування у дорослих. Прийнятна доза для застосування у дітей складає половину дози для дорослих, це становить 25 мкг RTS,S, ця доза може бути присутньою у 250 мкл (заклучна рідка композиція). Подібні дози можуть використовуватися для інших антигенів.

Згідно з винаходом антиген поєднують з ад'ювантом, який містить похідну ліпиду А та сапонін у складі ліпосоми.

Прийнятні ад'юванти згідно з винаходом представляють собою знешкоджений ліпід А, одержаний з будь-якого джерела, та нетоксичні похідні ліпиду А, які є переважними стимуляторами Th1 клітинної відповіді (що також у даній заявці називається Th1-типом відповіді).

Імунна відповідь може бути приблизно розділена на дві крайні категорії: гуморальна імунна відповідь або опосередкована клітинами імунна відповідь (традиційно характеризується антитілами та клітинними ефекторними механізмами захисту, відповідно). Ці категорії відповіді називаються відповідями Th1-типу (опосередкована клітинами відповідь) та імунними відповідями Th2-типу (гуморальна відповідь).

Виражені імунні відповіді Th1-типу можуть характеризуватися синтезом антигенспецифічних, обмежених гаплотипом цитотоксичних Т-лімфоцитів, та відповідями клітин природних кілерів. У мишей відповіді Th1-типу часто характеризуються синтезом антитіла підтипу IgG2a, у той час, як у людей такі відповіді дають антитілам IgG1 типу. Th2 тип імунних відповідей характеризується синтезом ряду ізотипів імуноглобуліну, включаючи мишачий IgG1.

Можна вважати, що направляючою силою у розвитку цих двох типів імунної відповіді є цитокини. Високі рівні цитокінів Th1-типу мають тенденцію до переважної індукції опосередкованої клітинами імунної відповіді на даний антиген, у той час, як високі рівні цитокінів Th2-типу мають тенденцію до переважної індукції гуморальної імунної відповіді на антиген.

Відмінність між Th1- та Th2-типами імунної відповіді не є абсолютною, та може набувати форми діапазону між цими двома крайніми вираженнями. У реальному житті індивідуум буде підтримувати імунну відповідь, що описується як така, що переважною представляє собою Th1 або переважно Th2. Проте часто є зручним розглядати родини цитокінів з точки зору таких, описаних у мишачих клонах CD4 +ve T-клітин Mosmann та Coffman (Mosmann, 1989). Традиційно, Th1-тип відповіді асоціюється з продукцією INF-гамма цитокінів Т-лімфоцитами. Інші цитокини, які часто безпосередньо асоціюються з індукцією імунної відповіді Th1-типу, не синтезуються Т-клітинами, наприклад, такі, як IL-12. На противагу до цього, відповіді Th2-типу асоціюються із секрецією IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 та фактора-бета некрозу пухлин (TNF-бета).

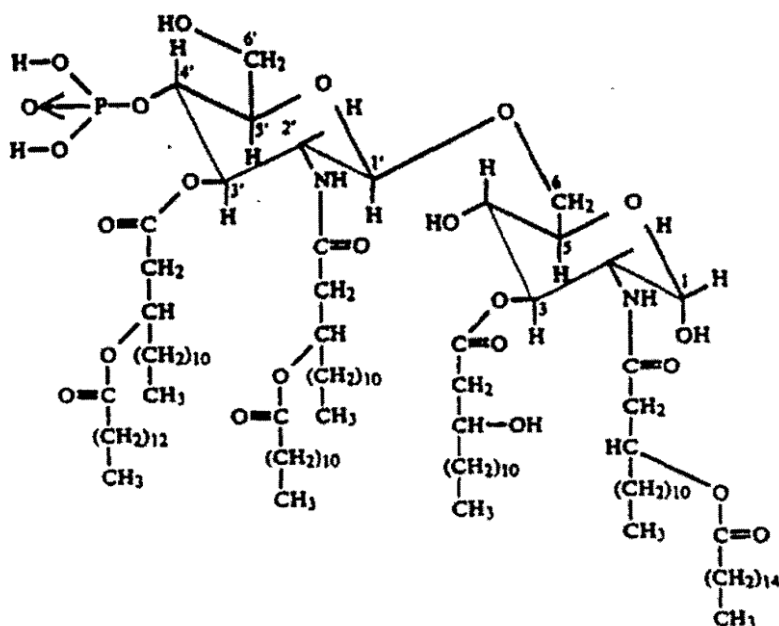
Є відомим, що деякі вакцинні ад'юванти є особливо прийнятними для стимуляції відповіді на

основі цитокінів Th1-типу або Th2-типу. Традиційно, індикатори балансу Th1:Th2 імунної відповіді після вакцинації або інфекції включають безпосереднє вимірювання продукції цитокінів Th1 або Th2 Т-лімфоцитами *in vitro* після повторної стимуляції антигеном та/або вимірювання (принаймні, у мишей) співвідношення IgG1 : IgG2a відповіді антигенспецифічних антитіл.

Таким чином, ад'ювант Th1-типу є таким, що стимулює ізолювану популяцію Т-клітин для продукції високих рівнів цитокінів Th1-типу, коли повторно стимулюється антигеном *in vitro* та індукуює відповідь антигенспецифічних імуноглобулінів, асоційовану з ізотипом Th1-типу.

Ад'юванти, які є здатними до переважного стимулювання Th1 клітинної відповіді, є описаний в WO 94/00153 та WO 95/17209.

Вже давно відомо, що ентеробактеріальний ліпополісахарид (LPS) є потужним стимулятором імунної системи, незважаючи на те, що його застосування в ад'ювантах є обмеженим токсичними ефектами. Нетоксична похідна LPS, монофосфорил ліпід А (MPL), одержана шляхом видалення центральної вуглеводневої групи та фосфату з глюкозаміну з відновлюючими кінцями, була описана (Ribi, 1986) та має наступну структуру:



Додатковий знешкоджений варіант MPL є одержаним за допомогою видалення ацильного ланцюга з 3-положення дисахаридного скелету, він називається 3-О-деацильованим монофосфорил ліпідом А (3D-MPL). Він може бути очищений та одержаний за допомогою способів, які описуються в GB 2122204B, посилання на який також розкриває одержання дифосфорил ліпиду А та його 3-О-деацильованих варіантів.

Окрема форма 3D-MPL для застосування у даному винаході представляє собою таку у вигляді емульсії, що складається з маленьких частинок, які мають розмір частинок, менший за 0,2 мкм у

діаметрі, спосіб її виробництва є розкритим в WO 94/21292. Водні композиції, що включають монофосфорил ліпід А та сурфактант, є описаними в WO98/43670.

Ад'юванти на основі бактеріальних ліпополісахаридів, що використовуються у даному винаході, можуть бути очищені з бактеріальних джерел, після чого їх піддають обробці, або, альтернативно, вони можуть бути синтетичними. Наприклад, очищений монофосфорил ліпід А є описаним у Ribi та ін. (Ribi, 1986), а 3-О-деацильований монофосфорил або дифосфорил ліпід А, що має походження з *Salmonella* sp., є описаним в GB 2220211 та US

4912094. Інші очищені та синтетичні ліпополісахариди були описані (Hilgers, 1986; Hilgers, 1987; EP 0 549 074 B1). Один окремих ліпополісахаридний ад'ювант для застосування у даному винаході представляє собою 3D-MPL.

Згідно з цим похідні LPS, що можуть використовуватися у даному винаході, представляють собою такі імуностимулятори, що є подібними за структурою до імуностимуляторів на основі LPS або MPL або 3D-MPL. Інші альтернативні похідні LPS можуть бути ацилованим моносахаридом, який представляє собою частину описаної вище структури MPL.

Сапоніни також є Th1 імуностимуляторами. Сапоніни є добре відомими ад'ювантами (Lacaille-Dubois, 1996). Прийнятні сапоніни для застосування у даному винаході включають імунологічно активні сапоніни, наприклад, Quil A (має походження від кори південно-американського дерева *Quillaja Saponaria Molina*), та його імунологічно активні фракції, що є описаними в US 5,057,540 та "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2): 1-55; та EP 0 362 279 B1. Гемолітичні сапоніни QS21 та QS17 (очищені за допомогою BEPX фракції Quil A) були описані як ефективні системні ад'юванти, а спосіб їх одержання розкритий в патенті US 5,057,540 та EP 0362279B1. У цих посиланнях є також описаним застосування Q37 (негемолітична фракція Quil-A), що діє як потужний ад'ювант для системних вакцин. Застосування QS21 є також додатково описаним у Kensil та ін. (Kensil, 1991). Комбінації QS21 та полісорбату або циклодекстрину є також відомими (WO 99/10008). Окремі ад'ювантні системи, що включають фракції QuilA, такі, як QS21 та QS7, є описаними в WO 96/33739 та WO 96/11711.

Ліпополісахаридні та сапонінові імуностимулятори, описані вище для застосування у даному винаході, рецептують разом з ліпосомним носієм. Наприклад, носій може включати холестеринвімісні ліпосоми, як описано в WO 96/33739.

Комбінації монофосфорил ліпиду A та похідної сапоніну є описаними в WO 94/00153; WO 95/17210; WO 96/33739; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241, а комбінація QS21 та 3D-MPL є розкритою в WO 94/00153.

Таким чином, прийнятні ад'ювантні системи для застосування у даному винаході включають, наприклад, комбінацію монофосфорил ліпиду A, такого, як 3D-MPL, разом з похідною сапоніну, зокрема, комбінацію QS21 та 3D-MPL, як розкрито в WO 94/00153. Ад'ювантна система включає ліпосомний носій, наприклад, холестеринвімісні ліпосоми, наприклад, в композиції, де QS21 послаблюється у холестеринвімісних ліпосомах (DQ), як розкрито в WO 96/33739.

Таким чином, сапонін, такий, як QS21 може також бути присутнім в або бути асоційованим з мембранами ліпосом, як описано в WO 96/33739. 3D-MPL, або інша похідна ліпиду A може бути присутньою або в інкапсульованому вигляді у мембранах ліпосом, або може бути присутньою поза ліпосомами, або у тому й тому вигляді. Один конкретний ад'ювант для застосування у даному вина-

ході включає два імуностимулятори QS21 та 3D-MPL, у композиції з холестеринвімісними ліпосомами, в яких 3D-MPL є інкапсульованим у ліпосомах, а QS21 є асоційованим з ліпосомами.

Кількість білка згідно з даним винаходом, що є присутнім у кожній вакцинній дозі, вибирають як кількість, яка індукує імунопротективну відповідь без значних, шкідливих побічних ефектів у типових вакцинах. Така кількість буде варіювати в залежності від специфічного використовуваного імуногену та специфічного ад'юванта. В загальному випадку передбачається, що кожна доза буде включати 1-1000 мкг білка, наприклад, 1-200 мкг, наприклад, 10-100 мкг. Оптимальна кількість для конкретної вакцини може бути встановлена за допомогою стандартних досліджень, які втягують спостереження за титрами антитіл та іншими відповідями в осіб.

Прийнятний графік вакцинації для застосування у даному винаході передбачає первинний курс перед подорожжю до ендемічного за малярією району, який може бути завершений, за, принаймні, 2-4 тижні перед прибуттям у цей район. Цей первинний курс може передбачати введення від 1 до 3 доз, наприклад, 2 або 3 дози, які вводять з інтервалом, принаймні, 7 днів, або від 1 до 4 тижнів, або, наприклад, місяць між дозами. Курс первинної вакцинації може супроводжуватися повторюваними антигенними стимуляціями кожні шість місяців протягом періоду часу, поки існує ризик інфекції. Періодичні вакцинації шляхом антигенних стимуляцій можуть бути прийнятними перед повторенням подорожі до ендемічних районів. Прийнятні кількості RTS,S білка на дозу є такими, як наведено в даній заявці вище.

Вакцини згідно з винаходом можуть вводитися за допомогою будь-якого з різноманітних шляхів, такими, як оральний шлях, місцеве введення, підшкірне, введення через слизову оболонку (типово, інтравагінальне), внутрішньовенне, внутрішньом'язове, сублінгвальне, інтрадермальне введення та введення за допомогою супозиторію.

Винахід може додатково використовуватися у режимі гетерологічного примування-бустеризації.

Замість додання повторюваних доз RTS,S або іншої композиції, що містить поліпептид, відмінна форма вакцини може вводитися в режимі вакцинації гетерологічного «примування-бустеризації». Композиція для примування та композиція для бустеризації будуть містити, принаймні, один антиген у цілому, хоча ідентична форма антигену не є необхідною; це може бути відмінна форма того самого антигену.

Імунізації на основі «примування-бустеризації» згідно з винаходом може бути проведена при використанні комбінації білка та полінуклеотиду, зокрема, композицій на основі ДНК. Така стратегія вважається ефективною в індукції широких імунних відповідей, у той час як доставка ДНК у вигляді плазмиди або живого вектора індукує сильні відповіді цитотоксичних Т-лімфоцитів (CTL). Так, вакцинація на основі комбінації білка та ДНК буде забезпечувати широку різноманітність імунних відповідей.

Таким чином, винахід додатково забезпечує застосування антигену Plasmodium або його імуногенного фрагменту, або похідної та ад'юванту, що включає похідну ліпиду А та сапонін у складі ліпосоми, як описано в даній заявці, разом з полінуклеотидом, що кодує антиген Plasmodium або його імуногенний фрагмент, або похідну, у виробництві фармацевтичного набору для імунізації подорожуючих до ендемічних районів проти продуктивної малярійної інфекції.

Винахід також забезпечує набір, який включає антиген Plasmodium або його імуногенний фрагмент, або похідну, що забезпечується у ліофілізованій формі, ад'ювант, що включає похідну ліпиду А та сапонін у складі ліпосоми, та інструкції, які вказують, що цей антиген, ад'ювант та, необов'язково, додатковий носій, змішуються перед введенням подорожуючому до ендемічного району, захищаючи, таким чином, вказаного подорожуючого від продуктивної малярійної інфекції.

Таким чином, коли RTS,S або інший поліпептид на основі CS білка використовується як поліпептидний компонент режиму примування-бустеризації, то полінуклеотидний компонент буде кодувати CS білок або його імуногенний фрагмент, або похідну.

ДНК може доставлятися як оголена ДНК, така, як плазмідна ДНК, або у формі рекомбінантного живого вектора. Живі вектори для застосування у даному винаході можуть бути дефектними на реплікацію. Приклади живих векторів, які можуть використовуватися, представляють собою вектори на основі поксвірусів, наприклад, модифікованого вірусу Анкара (MVA), вектори на основі альфавірусів, наприклад, вектори на основі вірусу венецуського енцефаліту коней, або аденовірусні вектори, наприклад, вектор на основі аденовірусу, відмінного від людського, такий, як вектор на основі аденовірусу шимпанзе, або будь-який інший прийнятний живий вектор.

Прийнятний аденовірус для застосування як живого вектора у вакцині на основі «примування-бустеризації» згідно з винаходом представляє собою аденовірус мало поширений у сироватці людей, такий, як Ad5 або Aci35, або аденовірус, що має походження не від людини, такий, як мавпячий аденовірус. Віруси можуть бути дефектними на реплікацію. Типово, ці віруси містять E1 делецію та можуть рости на клітинних лініях, що є трансформованими за допомогою гена E1. Прийнятні мавпячі аденовіруси є вірусами, ізольованими від шимпанзе. Зокрема, C68 (що є також відомим як Pap 9) (див. патент США № 6083 716) та Pap 5, 6 та Pap 7 (WO 03/046124) можуть використовуватися у даному винаході. Ці віруси можуть піддаватися маніпуляціям для вбудовування гетерологічного полінуклеотиду згідно з винаходом, так, що поліпептиди згідно з винаходом можуть експресуватися. Застосування, композиція та одержання таких рекомбінантних аденовірусних векторів описане детально в WO 03/046142.

Білкові антигени можуть бути введені один раз або декілька разів після, після чого проводять одну або більше введень ДНК, або ДНК може використовуватися спочатку для одного або більше

введень, після чого проводять одну або більше імунізацій білком. Може бути бажаним спочатку вводити ДНК, після чого вводять білок.

Так, окремий приклад імунізації примування-бустеризації згідно з винаходом передбачає примування однією дозою полінуклеотиду у формі рекомбінантного живого вектора, такого, як будь-який з тих, що описані вище, після чого здійснюють бустеризацію однією або більше дозами, наприклад, 2 або 3 дозами, білка, такого, як RTS,S з ад'ювантом, таким, як ті, що описані в даній заявці. При цьому полінуклеотид кодує той самий білок (наприклад, CS білок) або його імуногенний фрагмент, або похідну.

Таким чином, винахід також забезпечує фармацевтичний набір, що включає

a) антиген Plasmodium або його імуногенний фрагмент, або похідну та ад'ювант, що містить похідну ліпиду А та сапонін у складі ліпосоми, та

b) полінуклеотид, що кодує антиген Plasmodium або його імуногенний фрагмент, або похідну;

де a) та b) призначені для використання послідовно у будь-якому порядку, але, зокрема, де b) використовується для примування, а a) використовується для бустеризації. Винахід також забезпечує інструкції з вказаним набором, які містять вказівки стосовно a), що антиген, ад'ювант та, необов'язково, додатковий носій змішуються перед введенням подорожуючому в ендемічний район.

Композиція a) може представляти собою будь-яку поліпептидну композицію, як описано в даній заявці, у прийнятному ад'юванті, як описано в даній заявці, наприклад, a) може бути композицією, що включає RTS,S та ад'ювант, який містить QS21 та 3D-MPL у складі ліпосоми, та b) може бути живим вектором, як описано в даній заявці, таким, як аденовірусний вектор, наприклад, вектор на основі аденовірусу шимпанзе, що кодує CS білок або його імуногенний фрагмент, або похідну.

Як композиція для примування, так і композиція для бустеризації, можуть доставлятися у більшій, ніж одна доза, кількості. Крім того, дози для початкового примування та бустеризації можуть доповнюватися додатковими дозами, які можуть періодично чергуватися для досягнення, наприклад, ДНК примування / білкової бустеризації / додаткової дози ДНК / додаткової дози білка.

Фармацевтично прийнятні розріджувачі або наповнювачі для застосування у винаході є добре відомими у рівні техніки та включають, наприклад, воду або буфери. Вакцинний препарат є описаним у загальному вигляді (Powell, 1995; Voller, 1978). Інкапсуляція у ліпосомах є описаною, наприклад Fullerton, патент США № 4,235,877. Кон'югація білка з макромолекулами розкрита, наприклад, Likhite, патент США № 4,372,945 та Armor та ін., патент США № 4,474,757.

В іншому аспекті винахід забезпечує спосіб для визначення, чи є індивідуум захищеним від малярії після введення композиції малярійного антигену, зокрема, композиції преритроцитарного малярійного антигену, індивідууму, при цьому вказаний спосіб включає вимірю-

вання рівня CD4 Т-клітин, специфічних для малярійного антигену, що утворилися у індивідуума. Забезпечується також спосіб визначення, чи є індивідуум захищеним від малярії після введення композиції малярійного антигену, зокрема, композиції пре-еритроцитарного малярійного антигену, індивідууму, при цьому вказаний спосіб включає вимірювання концентрації антитіл, специфічних для малярійного антигену, що утворилися у індивідуума.

У додатковому аспекті винахід забезпечує спосіб оцінки ефективності кандидатної вакцини, зокрема, пре-еритроцитарної кандидатної вакцини, у запобіганні малярії, при цьому вказаний спосіб включає вимірювання рівня CD4 Т-клітин, що утворилися у індивідуума проти кандидатної вакцини. Також забезпечується спосіб оцінки ефективності кандидатної вакцини, зокрема, пре-еритроцитарної кандидатної вакцини, у запобіганні малярії, при цьому вказаний спосіб включає вимірювання концентрації специфічних антитіл, що утворилися у індивідуума у відповідь на кандидатну вакцину. У більш специфічному втіленні ця вакцина включає антиген *Plasmodium* або його імуногенний фрагмент, або похідну та ад'ювант, що містить похідну ліпиду А та сапонін у складі ліпосоми

Приклади

Приклад 1: Вакцинація при використанні RTS,S та ад'юванта В та експериментальне контрольне зараження малярією

Вакцини

RTS,S: RTS представляє собою ланцюг гібридного поліпептиду вагою 51 кДа, що містить 424 амінокислоти (а.к.) та складається з 189 амінокислот, які мають походження від поверхневого антигену спорозоїту (центрального тандемного повтору CS білка та карбокситермінальних ділянок, 189 амінокислот загальною малярійного паразита *P.falciparum* штам NF54 (CSP антиген, а.к. від 207 до 395), злитий з амінотермінальним кінцем S білка вірусу гепатиту В. S представляє собою поліпептид вагою 24 кДа (довжиною 226 амінокислот), що відповідає поверхневому антигену вірусу гепатиту В (HBsAg), та є антигеном, який використовується у вакцин Engerix-B® GSK Biologicals.

Два білки одержують внутрішньоклітинно у дріжджах (*S. cerevisiae*) та спонтанно поєднують у змішані полімерні корпускулярні структури, кожна з яких, як оцінюється, містить приблизно 100 поліпептидів.

Одержання RTS,S є описаним в WO 93/10152.

Повна доза RTS,S/AS02A (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium) містить 50 мкг ліофілізованого RTS,S антигену, відновленого в 500 мкл ад'юванта AS02A у вигляді емульсії масло-у-воді, що містить імуностимулятори 3D-MPL® (GlaxoSmithKline Biologicals, Montana, USA) та QS21, 50 мкг кожного.

Повна доза RTS,S/ад'ювант В (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium) містить 50 мкг ліофілізованого RTS,S антигену, відновленого в 500 мкл ад'юванта В, який містить імуностимулятори 3D-MPL® та QS21 (50 мкг кожного) у композиції з холестеринвмісними ліпосомами. Ліпосоми можуть

бути одержані із суміші деолеїнового фосфатидилхоліну (DOPC), холестерину та 3D-MPL в органічному розчиннику, при цьому суміш є висушеною. Потім додають водний розчин для суспендування ліпиду. Суспензію піддають мікропсевдозрідженню до тих пір, поки розмір ліпосом не зменшиться настільки, щоб стерильно фільтруватися через фільтр розміром 0,2 мкм. Типово, співвідношення холестерин : фосфатидилхолін складає 1:4 (ваг./ваг), водний розчин додають до одержання концентрації холестерину від 5 до 50 мг/мл. QS21 додають до ліпосом, які містять холестерин.

Методологія

Цей клінічний дослід оцінював безпечність, реактогенність, імуногенність та попередню ефективність малярійної вакцини, що містить антиген RTS,S з доданням ад'юванта AS02A або ад'юванта В.

Набирали 103 особи у дві групи та випадковим чином розділяли їх для одержання 3 доз кожної вакцини згідно з розкладом вакцинації через 0, 1, 2 місяці. Оскільки у дослідження було втягнуто багато осіб, то групи набирали та піддавали вакцинації послідовно.

Для кожної групи волонтери піддавалися стандартизованому первинному зараженню малярією (Chulay, 1986) через два - чотири тижні після введення третьої дози. Первинне контрольне зараження передбачало можливість харчування п'яти москітів *Anopheles stephensi*, заражених спорозоїтами *P.falciparum*, на кожному з волонтерів протягом періоду часу п'яти хвилин. Для кожної групи також піддавали зараженню 12 невакцинованих контрольних волонтерів.

Приблизно через шість місяців після первинного контрольного зараження, волонтерів, які були захищеними при первинному контрольному зараженні, просили погодитися на повторне контрольне зараження. Ніяких додаткових доз вакцини не вводили між контрольними зараженнями. Повторне контрольне зараження проводили так, як і первинне контрольне зараження. Для кожної групи, піддавали контрольному зараженню 6 невакцинованих контрольних волонтерів. Після кожного контрольного зараження особи піддавалися щоденній оцінці протягом періоду часу, принаймні, 30 днів для встановлення факту, чи були вони інфіковані малярією. Основний метод визначення інфекції полягав в оцінці забарвлених за Giemsa мазків периферичної крові для визначення нестатевої стадії паразитів за допомогою світлового мікроскопа. Це свідчить про те, що особа була піддана продуктивній інфекції з паразитами, які вивільнилися з печінки та розвинулися до еритроцитарної стадії. Таким чином, стерильного захисту від контрольного зараження не було досягнуто. При перших ознаках інфекції осіб визначали позитивними щодо малярії та піддавали лікуванню при використанні лікарської дози хлорохіну. Результатом первинної ефективності був стерильний захист, а саме особа ніколи не розвивала безстатевої стадії паразитів. На доповнення, реєстрували час між контрольним зараженням та появою паразитів у тих осіб, що не були повністю захищеними.

Крім того, збирали зразки мононуклеарних клітин периферичної крові (PBMC) до вакцинації, через 2 тижні після вакцинації II та через 14-28 днів після вакцинації III (день вакцинації: DOC).

Зразки PBMC використовували для оцінки CD4 та CD8 Т-клітинних відповідей за допомогою проточної цитометрії для визначення цитокінів. Остання методика дозволяє кількісно оцінювати Т-клітини, специфічні для даного антигену. Антиген-специфічні CD4 та CD8 Т-клітини підраховували за допомогою проточної цитометрії після традиційного імуофлуоресцентного мічення фенотипів клітин, а також внутрішньоклітинної продукції цитокінів. Коротко, антигенспецифічні CD4 та CD8 Т-клітини периферичної крові можуть бути повторно стимульовані *in vitro* для продукції IL-2, CD40L, TNF-альфа або IFN-гамма, коли вони піддаються інкубації з їх відповідним антигеном. Як HBs (поверхневий антиген вірусу гепатиту В), так і пули CSP пептиду використовували як антигени для повторної стимуляції антигенспецифічних Т-клітин. Результати виражали як частоту зустрічальності CD4 або CD8 Т-клітин, які експресують принаймні два різні цитокіни з наступних CD40L, IL-2, TNF-альфа або IFN-гамма у межах субпопуляції CD4 або CD8 Т-клітин.

Рівні антитіл визначали шляхом оцінки антиген-логігенезу (IgG) у відповідь на CS-повторювану ді-

лянку *P. falciparum*, як вимірюється за допомогою стандартних методик ELISA при використанні рекомбінантного білка R32LR як імобілізованого антигену. Коротко, R32LR білком [відповідає повторюваній ділянці (NANP) білка, що оточує спорозоїт *Plasmodium falciparum* (CSP)] покривали планшети на 96 комірок. Після насичення планшетів послідовні розведення зразків сироватки безпосередньо додавали до планшетів. Антитіла до R32LR, присутні у зразку сироватки, будуть зв'язуватися з комірками, попередньо покритими R32LR. Після цього промивали планшети. Додавали мічене перексидазою козяче анти-людське IgG(Y) антитіло, при цьому воно буде зв'язуватися з анти-CS IgG антитілами. Після наступного етапу промивання додання хромогенного субстратного розчину, специфічного для пероксидази, буде забезпечувати середнє значення визначення анти-CS IgG, що зв'язалися з антигеном, яким було покрито планшети. Пероксидаза каталізує кольорову реакцію. Інтенсивність одержаного забарвлення є пропорційною титру анти-CS IgG антитіл, що містяться у зразку. Рівні антитіл до ділянки повтору визначали відносно відомої стандартної серії у кожному планшеті та виражали у мкг/мл.

Результати

Група 1:

Ад'ювант	Кількість вакцинованих волонтерів	Кількість волонтерів, яких піддавали контрольному зараженню (кількість захищених)	Кількість волонтерів, яких піддавали повторному зараженню (кількість захищених)
Ад'ювант В	26	17(10)	5(3)
AS02A	25	24(9)	5(1)
УСЬГО:	51	41	10

Група 2:

Ад'ювант	Кількість вакцинованих волонтерів	Кількість волонтерів, яких піддавали контрольному зараженню (кількість захищених)	Кількість волонтерів, яких піддавали повторному зараженню (кількість захищених)
Ад'ювант В	Фігур відсутня	19(8)	Не проводили
AS02A	Фігур відсутня	20(5)	Не проводили
УСЬГО:	52	39	

Групи 1 та 2, поєднані для первинного контрольного зараження:

Ад'ювант	Кількість вакцинованих та підданих контрольному зараженню волонтерів (первинне контрольне зараження)	Кількість захищених волонтерів	Кількість інфікованих волонтерів	Ефективність вакцини
Ад'ювант В	36	18	18	50%
AS02A	44	14	30	32%

Таким чином, у цьому досліді ад'ювант В був виявлений як найбільш ефективний при захисті індивідуумів, які раніше не піддавалися малярійній інфекції. 50% індивідуумів, яких піддавали контрольному зараженню, з групи ад'юванта В були захищеними, у той час, як були захищеними тільки 32% індивідуумів, яких піддавали контрольному зараженню, з групи AS02A. Це представляє собою поліпшення захисту при порівнянні між двома ад'ювантами більше, ніж на 50%.

Крім того, у групі 1 ад'ювант В був виявлений як значно більш потужний, ніж AS02A для індукції відповідей CD4⁺ Т-клітин, направлених проти антигенів, представлених в RTS,S (Фігура 1. $p=0,01663$). Поєднані дані для груп 1 та 2 були менш значними (Фігура 2. $p=0,07$).

Перед вакцинацією не визначали здатних до виявлення відповідей CD4/CD8 Т-клітин, направлених проти HBs або CSP. На противагу до цього, через 2 тижні після вакцинації II, а також через 2 тижні після вакцинації III (DOC: день контрольного зараження), HBs- та CSP-специфічні CD4 Т-клітини визначали у більшості індивідуумів, вакцинованих обома композиціями. У ті самі моменти часу не спостерігали здатної до виявлення відповіді CD8 Т-клітин. Ці спостереження демонструють, що аналіз, який використовується для імуномоніторингу Т-клітин, є специфічним та чутливим, що є передумовою для здійснення формального порівняння між групами, які одержували різні вакцинні композиції.

Фігура 1 показує, що індивідууми з групи 1, вакциновані за допомогою композиції RTS,S/ад'ювант В мали вищу частоту зустрічальності CSP-специфічних CD4 Т-клітин у порівнянні з такими, вакцинованими за допомогою RTS,S/AS02A через 2 тижні після вакцинації II, так і після вакцинації III (DOC). Подібний висновок був зроблений для HBs-специфічних CD4 Т-клітин, які продукують IFN-гамма та інший цитокін, вибраний з IL-2, CD40L, TNF-альфа через 2 тижні після вакцинації II (дані не представлені).

Фігура 2 показує подібне до Фігури 1 дослідження, за винятком того, що воно включає дані, одержані з двох груп.

На Фігурах 1 та 2 результати виражені як частота зустрічальності CD4 Т-клітин, які експресують, принаймні, два різні цитокінів, вибрані з CD40L, IL-2, TNF-альфа або IFN-гамма у 10^5 CD4 Т-клітин.

Подібну картину спостерігали стосовно відповідей анти-CSP специфічних антитіл. З Фігури 5 можна побачити, що концентрація антитіл, утворених у відповідь на композицію RTS,S/ ад'ювант В була значно вищою, ніж концентрація антитіл, що утворилися у відповідь на RTS,S/AS02A (див., зокрема, DOC - 2 тижні після вакцинації III ($C = 0,00793$), але ефект був помітний через 2 тижні після вакцинації II). Результати виражали як середнє геометричне значення концентрації (GMC). Попередні посилання на початкову точку часу, перед тим, як вводили будь-яку дозу.

M1 відноситься до точки часу 2 тижні після першої дози.

M2 відноситься до точки часу 2 тижні після другої дози.

DOC відноситься до дати контрольного зараження, яка мала місце через 2 тижні після третьої дози.

Захист проти контрольного зараження малярією асоціюється з значно вищою відповіддю CD4 Т-клітин та відповіддю специфічних антитіл на CSP.

Підвищена імуногенність композиції RTS,S/ ад'ювант В у порівнянні з такою RTS,S/AS02A з необхідністю не означає, що вона буде трансплюватися у біологічно релевантний ефект. Проте індивідууми, вакциновані за допомогою композиції RTS, ад'ювант В, у цьому досліді показали підвищений рівень захисту (18 з 36 індивідуумів: 50%) проти контрольного зараження малярією у порівнянні з такими, вакцинованими за допомогою RTS,S/AS02A (14 з 44 індивідуумів: 32%). Можливий зв'язок відповіді CD4 Т-клітин та захисту був, таким чином, знайдений.

Якщо наведена вище гіпотеза є правильною, то захищені індивідууми повинні мати більш високу відповідь CD4 Т-клітин, ніж індивідууми, вакциновані за допомогою композиції RTS,S/AS02A або навіть композиції RTS,S/ад'ювант В. Фігури 3 та 4 для першої групи та поєднаних груп, відповідно (з обома поєднаними ад'ювантними групами), чітко підтримують вказану вище гіпотезу, а також підтримують ідею, що CSP-специфічні CD4 Т-клітини грають значну роль у захисті. Згідно з цим статистичний аналіз, проведений на зразках, які забирали як через 2 тижні після вакцинації II, так і через 2 тижні після вакцинації Ні, демонструють, що відмінність у частоті зустрічальності між захищеними та незахищеними індивідуумами є статистично значущою.

На Фігурах 3 та 4 результати представлені як частота зустрічальності CD4 Т-клітин, які експресують, принаймні, два різні цитокіни, вибрані з CD40L, IL-2, TNF-альфа або IFN-гамма у 10^6 CD4 Т-клітин. Аналіз імуногенності також показує, що, на відміну від CSP-специфічних CD4 Т-клітин, HBs-специфічні CD4 Т-клітини не асоціюються із захистом проти малярії через 2 тижні після вакцинації II, а також через 2 тижні після вакцинації III ($p=0,14$ та $p=0,053$, відповідно). Це додатково підтверджує значимість приведених вище результатів та означає, що захист є специфічно пов'язаним з присутністю CD4 Т-клітин, здатних впізнавати пептид CSP, але не пептид HBs.

На завершення, оскільки не визначали здатного до виявлення рівня відповіді CD8 Т-клітин, можна також запропонувати, що, найбільш вірогідно, захист від пре-еритроцитарної стадії малярії забезпечується RTS,S, яка містить ад'ювант В або A802A, але не завдяки CSP-специфічним CD8 Т-клітинам, після вакцинації.

Подібну картину спостерігали при моніторингу відповіді антитіл, направлених проти CSP. Фігура 6 показує концентрації антитіла у захищених та незахищених індивідуумів (результати відносяться до обох груп з поєднаними групами обох ад'ювантів).

Зрозуміло, що ці індивідууми, які є захищеними, показали значно вищу концентрацію антитіл, ніж ті, що не були захищеними ($P < 0,0001$).

Обговорення

Приведені вище результати ясно демонструють, що існує зв'язок між CSP-специфічними CD4 Т-клітинами та антитілогенезом, з одного боку, та захисним статусом проти контрольного зараження малярією, з іншого боку. Механізм, за допомогою якого CSP-специфічні CD4 Т-клітини або антитіла будуть виявляти антипаразитарний ефект, є невідомим. Проте аналіз також чітко ідентифікував незначну кількість індивідуумів, які мали високу відповідь CD4 Т-клітин або високий антитілогенез, але не були захищеними. Це означає, що сильна CD4 Т-клітинна відповідь або високий антитілогенез у відповідь на CSP не дають можливості самі по собі передбачити захист від контрольного зараження малярією.

Були розвинені різні технології для моніторингу відповіді Т-клітин, такі, як проліферація лімфоцитів, секреція цитокінів, забарвлення тетрамерів, імуноферментний спот-аналіз або проточна цитометрія цитокінів. Останній метод був нещодавно вибраний як провідна технологія на основі відмінної повторюваності/відтворюваності даних, а також як релевантне визначення маркерів (CD4, CD8, CD40L, IL-2, TNF, IFN γ). Також була ідентифікована специфічна аналітична методологія, яка дозволяє розрізняти високий фон результатів, що часто спостерігається при підходах проточної цитометрії. Дане повідомлення демонструє можливість здійснення винаходу при використанні проточної цитометрії цитокінів для надійного моніторингу відповідей Т-клітин у клінічному дослідженні на людях. Крім того, він також демонструє, що є можливим ідентифікувати маркер захисту, який не є безпосередньо зв'язаним з гуморальним імунітетом.

Незважаючи на те, що ад'ювант В був продемонстрований як набагато потужніший, ніж AS02A, композиція для індукції CSP-специфічних CD4 Т-клітин та антитіл, відмінність щодо частоти зустрічальності CD4 Т-клітин та концентрацій антитіл є відносно помірною, при цьому можна зробити висновок, що вони можуть бути біологічно нерелевантними. Дані, одержані у цьому клінічному дослідженні, дозволяють провести формальну оцінку біологічної релевантності таких відмінностей при використанні захисту проти малярії як біологічно релевантного маркера. Аналіз ясно показує, що помірні, але значущі, відмінності між ад'ювантами у значеннях частоти зустрічальності Т-клітин та концентрації антитіл, перетворюються у значно вищу ступінь захисту проти контрольного зараження малярією.

Посилання

- Alonso C et al. (2004) Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* Oct; 364:1411-1420.
- Alonso et al. (2005) 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*. Dec 10; 366(9502):2012-8.
- Ballou WR, Arevalo-Herrera M, Carucci D, Richie TL, Corradin G, Diggs C, et al. (2004) Update on the clinical development of candidate malaria vaccines. *Am J Trop Med Hyg*; 71 (2 suppl):239-247.
- Bojang KA, Milligan PJM, Pinder M, Vigneron L, Allouche A, Kester KE, et al. (2001) Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial. *The Lancet*; 358(9297): 1927-1934.
- Bojang K.A., Oludude F, Pinder M, Ofori-Anyinam O, Vigneron L, Fitzpatrick S, Njie F, Kassanga A, Leach A, Milman J, Rabinovich R, Me Adam KPWJ, Kester KE, Heppner DG, Cohen JD, Tornieporth N, and Milligan PJM. (2005) Safety and immunogenicity of RTS,S/AS02A candidate malaria vaccine in Gambian children. *Vaccine* 23(32):4148-57.
- Breman JG, Alilio MS, Mills A. (2004) The intolerable burden of malaria: what's new, what's needed. *Am J Trop Med Hyg*; 71(2 suppl):0-i-.
- Caspers et al. (1989) The circumsporozoite protein gene from NF54, a *Plasmodium falciparum* isolate used in malaria vaccine trials. *Mol. Biochem. Parasitol* 35, 185-190.
- Chulay et al, (1986) Malaria transmitted to humans by mosquitoes infected from cultured *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. Jan; 35(1):66-8
- Doherty J, Pinder M, Tornieporth N, Carton C, Vigneron L, Milligan P, et al. (1999) A phase I safety and immunogenicity trial with the candidate malaria vaccine RTS,S/SBAS2 in semi-immune adults in The Gambia. *Am J Trop Med Hyg*; 61(6):865-868.
- Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. (2004) The global distribution and population at

risk of malaria: past, present, and future. *The Lancet Infectious Diseases*;4(6): 327-336.

- Hilgers et al. (1986). Synergistic effects of synthetic adjuvants on the humoral immune response. *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 79(4):392-6

- Hilgers et al. (1987). Synthetic sulpholipopolysaccharides: novel adjuvants for humoral immune responses. *Immunology*, 60(1): 141-6.

- Hoffman SL (1996) "Malaria Vaccine Development: a multi-immune response approach" Am Soc Microbiol Press Ed Hoffman SL, Chapter 3 "Attacking the infected hepatocyte".

- Kensil CR, Patel U, Lennick M, Marciani D.(1991) Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J. Immunology*, vol 146, 431-437

- Kensil, C R. (1996) Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 12(1-2):1-55

- Kester KE, McKinney DA, Tornieporth N, et al. (2001) Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.*; 183(4): 640-7.

- Lacaille-Dubois, M and Wagner H.,(1996) A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*, vol 2 pp 363-386

- Lalvani A, Moris P, Voss G, et al. (1999) Potent induction of focused Th1-type cellular and humoral immune responses by RTS,S/SBAS2, a recombinant *Plasmodium falciparum* malaria vaccine. *J. Infect. Dis.*; 180(5): 1656-64.

- Macete E, Aponte JJ, Guinovart C, Sacarlal J, Mandomando I, Espasa M, et al. Safety, reactogenicity and immunogenicity of the RTS,S/AS02A candidate malaria vaccine in children aged 1 to 4 years in Mozambique. Vaccine submitted.

- Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, 7, pp 145-173

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

- Powell and Newman (Editors) (1995) Vaccine Design - the subunit and adjuvant approach. *Pharmaceutical Biotechnology*, Vol.61, Plenum Press New York.

- Ribi et al, (1986) Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by a structurally established nontoxic lipid A. *Immunobiology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins*. Plenum Publ. Corp., NY, p407-420

- Stoute J, Slaoui M, Heppner D, Momin P, Kester K, Desmons P, et al. (1997) A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. *N Engl J Med*; 336(2):86-91.

- Stoute, JA, Kester KE, Krzych U, Welde BT, Hall T, White K, Glenn G, Ockenhouse CF, Garcon N, Schwenk R, Lanar DE, Momin P, Golenda C, Slaoui M, Wortmann G, Cohen J, Ballou WR. (1998) Long Term Efficacy and Immune Responses Following Immunization with the RTS,S Malaria Vaccine. *J Infect Dis* 178: 1139-44.

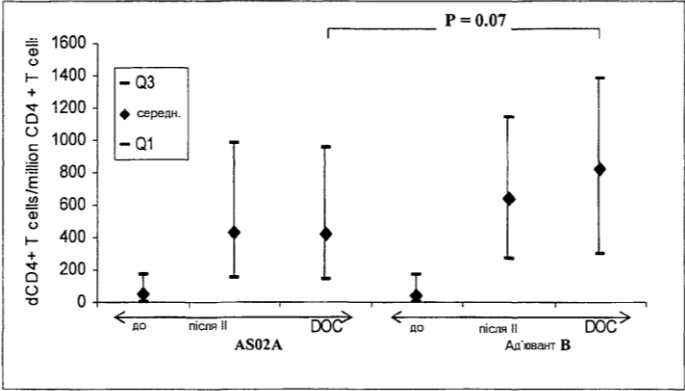
- Sun P, Schwenk R, White K, Stoute JA, Cohen J, Ballou WR, Voss G, Kester KE, Heppner DG, Krzych U. (2003) Protective immunity induced with malaria vaccine, RTS,S, is linked to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-specific CD4(+) and CD8(+) T cells producing IFN-gamma. *J Immunol*. Dec 15; 171(12): 6961-7.

- Valenzuela P, Gray P, Quiroga M, Zaldivar J, Goodman H, Rutter W. (1979) Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen. *Nature* 280, 815-819.

- Voller et al. (Editor) (1978) *New Trends and Developments in Vaccines*. University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A.

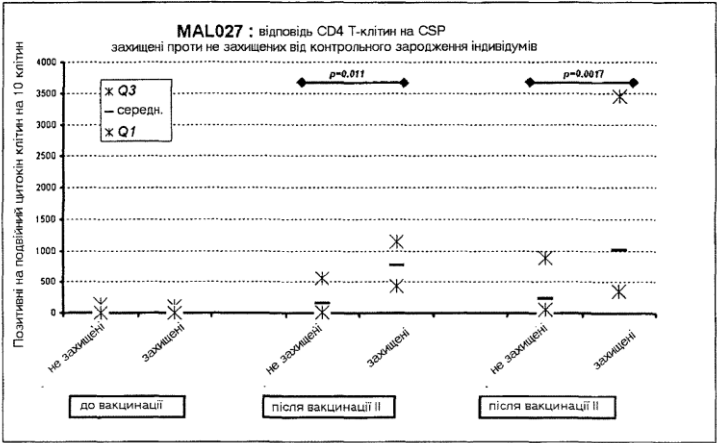
АНТИМАЛЯРІЙНА ВАКЦИНА

Фігура 2: Відповідь СД4 Т-клітин на CSP (обидві групи)



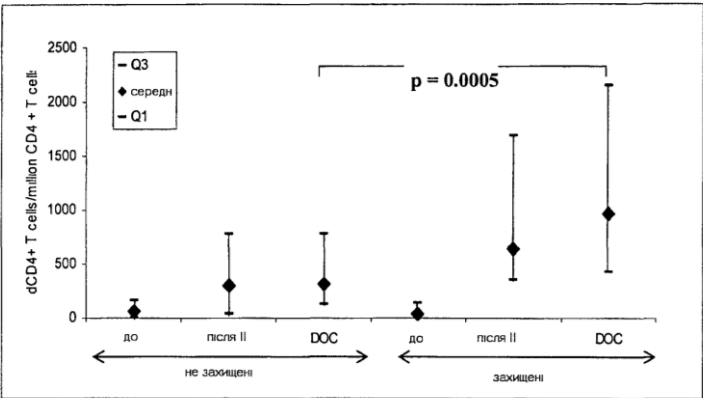
АНТИМАЛЯРІЙНА ВАКЦИНА

Фігура 3: Відповідь СД4 Т-клітин на CSP (перша група)



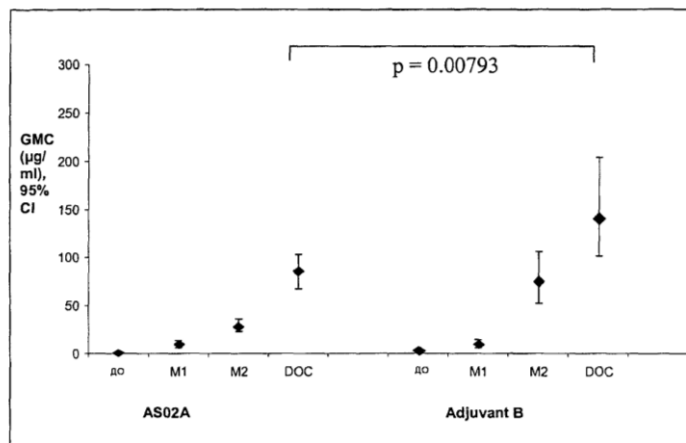
АНТИМАЛЯРІЙНА ВАКЦИНА

Фігура 4: Відповідь СД4 Т-клітин на CSP (обидві групи)



АНТИМАЛЯРІЙНА ВАКЦИНА

Фігура 5: Відповідь антитіл на CSP (обидві групи)



АНТИМАЛЯРІЙНА ВАКЦИНА

Фігура 6: Відповідь антитіл на CSP (обидві групи)

