



## Desarrollo y Pruebas de Campo de la Vacuna Sintética Contra la Malaria SPf66

- **Doctores Mauricio Rojas, Roberto Amador, Mario Alberto Posada y Manuel Elkin Patarroyo**  
Instituto de Inmunología, Hospital San Juan de Dios, Universidad Nacional  
de Colombia, Santafé de Bogotá.

De acuerdo a estadísticas recientes de la Organización Mundial de la Salud, se estima que 2100 millones de personas habitan en cerca de 100 países donde la malaria es una enfermedad endémica, afectando cerca de 270 millones de individuos anualmente y siendo la causa directa de por lo menos dos millones de muertos al año, especialmente de niños menores de cinco años de edad. Las medidas de control del vector y del parásito con insecticidas y quimioterapia parecían ser suficientes para la erradicación, pero a lo largo del tiempo se ha demostrado la poca eficacia de estas medidas, haciendo que el desarrollo de una vacuna sea esencial como un componente efectivo para el control y erradicación de la malaria especialmente en los países del tercer mundo.

Los primeros esfuerzos encaminados al desarrollo de una vacuna contra la malaria, se llevaron a cabo en la década de 1940 y por los siguientes 40 años se han centrado en el estudio de una vacuna contra los estadios pre-eritrocíticos del parásito, especialmente el esporozoito. Solamente el desarrollo de las técnicas de cultivo en laboratorio del parásito a mediados de los setentas y a principios de los ochentas permitió el estudio de los antígenos de los estadios sanguíneos asexuales y recientemente los antígenos de los estadios hepáticos, sanguíneos sexuales y los mecanismos de interacción del parásito con el glóbulo rojo (21).

Desafortunadamente el desarrollo de la vacuna antimalárica ha sido manejado más por intereses económicos en el desarrollo intelectual que por la necesidad real de aquellas poblaciones a las cuales estaría dirigida. Es por ello que la mayor parte de la investigación básica se lleva a cabo en países en los cuales la malaria no es un problema de salud. En los países donde la malaria es endémica generalmente se carece de los recursos, la infraestructura y el conocimiento

en las ciencias básicas para llevar a cabo un proyecto de esta naturaleza. Adicionalmente los escasos recursos económicos, las malas condiciones de vías e infraestructura de comunicaciones, como la condiciones ecológicas, hace que los métodos tradicionales de diagnóstico y fumigación no se implementen adecuadamente, lo que ha llevado a un aumento de la resistencia en las cepas del vector y del parásito a lo largo del mundo.

Con estas consideraciones en mente, nuestro grupo inició la investigación en el área de la inmunología de la malaria a principios de la década pasada, la cual ha llevado al desarrollo de la vacuna híbrida polimérica y sintética SPf66 cuyos ensayos de campo se han realizado en América, África y Asia.

La vacuna SPf66 es la primera generación de vacunas, con eficacia demostrada en estudios de campo, que combina el concepto de multiantigenicidad y multiestadio.

El camino para llegar a estas conclusiones no ha sido fácil; es por eso que en esta corta revisión queremos contar algunas de nuestras experiencias, que creemos con seguridad servirán a grupos futuros que tomen este mismo camino.

### Vacunas antimaláricas

Como es conocido, el parásito de la malaria presenta un ciclo de vida muy complejo en dos diferentes hospederos, el hombre y el mosquito, en cada uno de los cuales pasa por diferentes estadios con características antigénicas diferentes (15, 16). Existen diferentes puntos en los cuales el sistema inmune puede atacar al parásito, y cada grupo de investigación en el mundo ha centrado sus esfuerzos en uno de los estados para desarrollar su vacuna.

## Vacunas anti-esporozoito

Los esporozoitos son inyectados en la sangre, con la picadura de mosquito, permaneciendo en el torrente circulatorio por escasos segundos antes de invadir al hepatocito. Los primeros logros para inducir una inmunidad protectora se llevaron a cabo en los años 40 con la inducción de protección a la infección en aves luego de la inmunización con esporozoitos irradiados con luz ultravioleta. Posteriormente los esposos Nus-sen-sweig demostraron la generación de una inmunidad protectora en ratones luego de la inmunización con esporozoitos irradiados de *P. berghei*.

Estos ensayos condujeron a la realización de los primeros ensayos de protección en humanos en 1975, lográndose protección en seis de los trece participantes. Con estos experimentos se hizo evidente que es posible inducir una inmunidad en el individuo susceptible, lo que hace de éste un método potencialmente efectivo en el control de la enfermedad.

El conocimiento de la biología del parásito hizo posible disecar al esporozoito en cada uno de sus componentes antigénicos y conocer el papel de cada uno de ellos dentro de la biología del parásito. Cerca del 30% de la superficie del esporozoito está conformado por la proteína CS, una molécula que posee una región central inmunodominante que consta de 40 grupos de secuencias repetitivas de cuatro aminoácidos (Asn-Ala-Asn-Pro; NANP). Se han llevado a cabo varios intentos de vacuna con estas secuencias; dos de ellos en humanos (6, 11, 17). El primero utilizó la molécula R32tet<sub>32</sub>, un antígeno recombinante (4) que contiene treinta copias de la secuencia NANP acoplada a la proteína para la resistencia a la tetraciclina. El segundo ensayo se llevo a cabo con (NANP)<sub>3</sub>-TT, una molécula sintética que contiene tres copias de la secuencia NANP acoplada al toxoide tetánico. En ambos casos, y a pesar de generar una respuesta inmune contra la molécula en los individuos vacunados, no se logró conferir protección (19).

## Vacunas contra los estadios hepáticos.

La fase hepática dentro del desarrollo del parásito, conocido como estadio exoeritrocítico, ha sido pobremente caracterizado. Guerin-Marchand (10) ha reportado el clonaje del gen de una proteína específica de este estadio. Esta proteína contiene varias repeticiones compuestas por 17 aminoácidos. En el modelo murino, en los momentos iniciales del estadio hepático se ha demostrado que el gamma interferon y los anticuerpos producen una inhibición del desarrollo del parásito dentro del hepatocito. Igualmente, se ha demostrado recientemente que los antígenos exoeri-

trocíticos específicos son realmente productos de degradación de la proteína CS del esporozoito (12), y que la inmunidad citotóxica generada por la inmunización con esporozoitos irradiados se conserva en este estadio. En la actualidad se han identificado las proteínas LSA-3 y SALSA cuya importancia biológica está siendo estudiada.

## Vacunas contra los estadios sanguíneos asexuales.

Cuando el merozoito invade al glóbulo rojo se da inicio al ciclo de replicación que llevará a la generación de ocho a veinte merozoitos hijos, los cuales eventualmente lisarán al glóbulo rojo hospedero para invadir a los eritrocitos adyacentes.

La vacuna contra los estadios sanguíneos asexuales pretende estimular el control, por parte del sistema inmune de los individuos, del nivel de parásitos en la sangre, similar a lo que ocurre en los habitantes de áreas endémicas. Con una inmunidad parcial se logra un control de la parasitemia y a su vez un control de la sintomatología. Con la vacuna anti-esporozoito con porcentajes inferiores al 99% de inhibición del crecimiento del parásito, únicamente se logra postergar por algunos días la aparición de la enfermedad, pero sin lograr una reducción de la severidad. Una vacuna dirigida contra los estadios sanguíneos asexuales, con solamente un 80% de la inhibición del crecimiento, prolonga marcadamente el tiempo de aparición y la severidad de la sintomatología y el curso clínico de la enfermedad. Con un 95% de inhibición, se puede lograr una progresiva disminución de la parasitemia con una eventual resolución de la infección.

El trabajo desarrollado por Trager y Jensen (42) en el desarrollo del cultivo continuo para los estadios sanguíneos del *Plasmodium falciparum* ha permitido el aislamiento de grandes cantidades de merozoitos, permitiendo así disecar los mecanismos moleculares de interacción del parásito con el glóbulo rojo, al igual que ha permitido el aislamiento y purificación de gran número de proteínas. Uno de los antígenos mejor estudiados es el MSA-1 (antígeno mayor de superficie-1), también conocido como la proteína 190 kD, glicoproteína 195, gp 185, PSA y PMMSA (32). Este antígeno es procesado durante la maduración de merozoito a esquizonte, generándose así la mayor cantidad de los antígenos de la superficie del parásito (13, 14). Durante la invasión uno de los productos de degradación de MSA-1, la proteína de 83 kD, es expuesta por el parásito en la roptria, que es el elemento de contacto del parásito con el glóbulo rojo. La localización de la proteína de 83 kD aquí nos indica que está jugando un papel activo dentro del proceso de

interacción parásito-glóbulo rojo previo a la invasión a la célula roja. Los micos *saimiri* han desarrollado inmunidad protectora en ensayos en los cuales se ha utilizado la proteína 195 kD (39). La proteína 83 kD purificada o péptidos sintéticos derivados de la secuencia N-terminal, produjeron que los anticuerpos específicos, detectados por ELISA E IFI, que indujeron una protección parcial de los animales retados (34). Otro de los productos de degradación es la proteína de 19 Kd, cuya secuencia ha demostrado alta homología con los factores de crecimiento epidermal, y que en los ensayos iniciales en roedores ha inducido niveles de protección a la infección importantes.

La proteína de 42 Kd se encuentra en la superficie de la célula roja infectada. Existen evidencias que sugieren que esta proteína o sus derivados pueden desarrollar una inmunidad protectora por lo que han sido extensamente utilizadas tanto en su forma nativa como mediante la utilización de la proteína recombinante como con péptidos sintéticos en ensayos en animales induciéndose una inmunidad pero ésta confiere protección limitada a la infección.

El antígeno parasitario que aparece en la superficie del eritrocito, "antígeno de superficie del eritrocito infectado con anillos" (RESA), ha sido investigado, ya que los anticuerpos dirigidos contra el antígeno, logran producir *in vitro* un alto porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito. Se pensó que RESA, se podía utilizar en el desarrollo de una vacuna, pero en los ensayos en el modelo animal de los *Aotus* demostró grados parciales de protección (7).

Otros antígenos que han sido candidatos para el desarrollo de una vacuna contra los estadios sanguíneos asexuales, son las proteínas SERP (18) y SERP-H ambas de gran homología y ricas en serina. Estudios moleculares adelantados con ambos antígenos sugieren que son precursores de proteinasas que son activadas por clivaje proteolítico. Para la proteína SERP se ha evidenciado el desarrollo de inmunidad protectora en micos *Saimiri* (9).

### **Vacunas contra los estadios sanguíneos sexuales.**

Las vacunas que se desarrollen contra estos estadios, se han llamado vacunas bloqueadoras de la transmisión, las cuales no tienen ningún valor profiláctico en el individuo inmunizado, pero sí confieren protección a la población residente en las zonas endémicas ya que se previene la infección del mosquito luego de la picadura en un individuo infectado, deteniendo así el ciclo de vida del parásito. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas de los estadios

sexuales, confieren inmunidad pasiva cuando son inoculados en animales infectados.

### **Otro tipo de vacunas**

Las vacunas no-tradicionales están siendo desarrolladas en la actualidad, con reportes preliminares de las primeras fases de los ensayos clínicos (6). Mediante la manipulación de la estructura terciaria de los péptidos sintéticos (36) o mediante el desarrollo de nuevos adyuvantes (41), dando la posibilidad de estimular al sistema inmune e induciendo la liberación de altos niveles de citoquinas (38), que a su vez estimulan la producción de óxido nítrico el cual puede ser responsable de la fisio-patología sistémica que ocurre en el individuo con malaria. La posibilidad de bloquear estos exoantígenos con anticuerpos como ocurre en el caso de la difteria o el tétanos, permitiría desarrollar una vacuna preventiva de la enfermedad mas no de la infección, lo que es la base de la vacuna anti-enfermedad como preventiva de la severidad de la infección, o alternativamente una vacuna contra el TNF.

Como se ve una vacuna contra un antígeno particular de cualquier estadio del parásito confiere solamente una protección parcial, es por eso que el concepto de la vacuna multiantigénica y multiestadio es necesario en malaria. La vacuna SPf66 desarrollada por nuestro grupo es la primera proteína híbrida polimérica y sintética, en la cual se incluyen tres diferentes epitopes de proteínas de merozoitos intercalados con el motivo NANP de la proteína CS del esporozoito.

### **Desarrollo y pruebas de campo de la vacuna SPf66**

#### **Fase 0**

Las fases iniciales de la investigación se centraron en la determinación de aquellas proteínas importantes en el proceso de desarrollo de una respuesta inmune protectora. Para esto se procedió a partir de cepas de parásitos aisladas de pacientes maláricos, al aislamiento y purificación de las proteínas 195, 155, 115, 112, 105, 97, 96, 95, 90, 83, 63, 60, 55, 54, 50, 40, 35, 30 y de 23 Kd de las cuales se purificaron entre 200 a 400 ug de cada una de ellas.

En malaria existe el modelo del mico *Aotus trivirgatus* el cual es altamente susceptible a la infección por *Plasmodium falciparum* requiriendo de tratamiento para sobrevivir a la infección. Las proteínas 155, 115, 105, 90, 83, 60, 55, 50, 40, 35, 30 y 23 Kd, fueron inoculadas cada una en dos o tres animales en tres ocasiones. Cada uno de los animales fue retado con un millón de glóbulos rojos infectados con mala-

ria. Luego del reto los animales inmunizados con la proteína 155 y 55 mostraron un retraso significativo en la aparición de las parasitemias, sugiriendo una protección parcial. Los animales inmunizados con las proteínas 83 Kd y 35 Kd, no presentaron parásitos en sangre o con parasitemias bajas que autocontrolaron la infección.

El siguiente paso fue la síntesis de 12 péptidos de la región aminoterminal de las moléculas 35 Kd y 55 Kd y diferentes péptidos que correspondieron al 47% de la molécula 83 Kd (20). Estos péptidos se acoplaron a albúmina bovina sérica y fueron utilizados para inmunizar otro grupo de *Aotus* en cinco ocasiones. Al día 90 los animales fueron retados con cinco millones de glóbulos rojos infectados. La mayor parte de los péptidos utilizados en el ensayo no mostraron ninguna protección. Los péptidos 83.1, 35.1, 83.2, 83.26, 83.18, 83.30 y 83.23 mostraron un retardo importante en la aparición de los parásitos en los animales inmunizados, lo que sugería que cada uno de estos en forma individual solamente era capaz de generar una respuesta inmune parcial (28). El paso siguiente fue el tomar un nuevo grupo de animales e inmunizarlos con mezclas de dos o tres péptidos que generaron una respuesta parcial. De los seis animales inmunizados con la combinación de los péptidos 83.1, 55.1 y 35.1 tres presentaron parasitemias leves y con un retardo importante en la aparición de la parasitemia y los tres restantes no desarrollaron ningún nivel de parásitos en sangre (29). Este mismo ensayo fue repetido en 25 animales de los cuales 18 fueron inmunizados con la mezcla de péptidos y los siete restantes sirvieron de controles. De este grupo nueve presentaron protección completa, cinco tuvieron parasitemias leves que autocontrolaron y los cuatro restantes se comportaron en forma similar a los controles.

Con toda esta información se diseñó la proteína híbrida, polimérica y sintética SPf 66, la cual está compuesta por las secuencias de los péptidos 55.1, 83.1 y 35.1 intercaladas por la secuencia repetitiva de NANP, proveniente de la proteína CS de esporozoito. Su seguridad, inmunogenicidad y protectividad fueron demostradas en los micos *Aotus* donde no se observaron alteraciones histopatológicas ni alteraciones en las pruebas de laboratorio clínico en ninguno de los animales inmunizados con respecto al grupo control.

### Fase 1

El objetivo de esta fase es evaluar la tolerancia local y sistémica de la vacuna en el humano inmunizado, así como las características de la respuesta inmune generada por aquellos antígenos probados durante la fase 0 (43, 44).

Para la selección de aquellos voluntarios que participaron en esta fase fueron importantes las siguientes tres consideraciones: primero, la facilidad de la aplicación de las tres dosis y su subsecuente monitoreo. Segundo era importante que se tratase de adultos masculinos sanos y tercero debían provenir de áreas no endémicas y sin antecedentes de exposición al parásito. Por todas estas razones nuestro grupo decidió iniciar el trabajo con soldados de la Fuerzas Militares de Colombia. Inicialmente, 109 soldados voluntarios ingresaron al estudio, no se ofreció ningún incentivo económico o de promoción. Cada uno de los voluntarios fue examinado por un médico para determinar su salud física y mental, y determinar los antecedentes médicos, quirúrgicos o familiares de importancia. Quedaron solamente 30 del total de voluntarios para la siguiente fase, que consistió en una serie completa de laboratorios que fueron, parcial de orina, química sanguínea, recuento de células, determinación de anticuerpos anti-merozoito por IFI (inmuno fluorescencia indirecta) y la presencia de autoanticuerpos. Finalmente 9 individuos fueron seleccionados para el reto.

Los voluntarios fueron divididos en cinco grupos:

Dos voluntarios con tres dosis de 2 mg/dosis de SPf 66 los días 0, 60 y 80; tres recibieron 2 dosis de 2 mg/dosis de la misma molécula los días 0 y 60, tres voluntarios que sirvieron de controles se les aplicó solución salina los días 0, 20 y 45 y un voluntario sirvió de receptor nativo para hacer el pase de la cepa de *P. falciparum* con la cual se efectuó el reto.

Cada uno de los vacunados fue retado con la inoculación intravenosa de un millón de glóbulos rojos infectados con *P. falciparum* provenientes del voluntario en el cual se realizó el pase de la cepa.

Los resultados de esta fase mostraron que la vacuna es bien tolerada, presentándose ocasionalmente algunas reacciones locales menores. Ninguno de los voluntarios presentó alteraciones significativas en el cuadro hemático, la química sanguínea y el parcial de orina en los días -1, 1, 3 y 5 después de cada inmunización. Todas las pruebas de autoinmunidad fueron sistemáticamente negativas (factor reumatoideo, anticuerpos antinucleares, *test* de Coombs y anti miocardio).

Los estudios de la cinética de la respuesta inmune humoral y celular, analizada a partir de muestras de sangre tomadas los días -1 y 15 y prereto, se realizaron mediante la técnica del ELISA convencional, utilizando como antígeno la molécula SPf 66 y ensayos de linfoproliferación con células mononucleares perifé-

ricas. Todas las pruebas fueron negativas en el pre-immune y a partir de la primera dosis y hasta completar el esquema de vacunación se observó un incremento importante tanto en los títulos de anticuerpos como en los índices de proliferación celular (23).

## Fase II

**Fase IIA.** Durante esta fase la eficacia de la inmunidad protectora conferida por la aplicación de la molécula SPf 66, fue evidenciada a través del reto, mediante la aplicación de un millón de glóbulos rojos infectados en individuos sin antecedentes de exposición al parásito, quienes recibieron el esquema de vacunación. Esta fase del desarrollo de la vacuna se realizó bajo una estricta supervisión médica que incluía la disponibilidad de una unidad de cuidados intensivos. Nosotros elegimos el Hospital Militar Central de Bogotá, lo cual fue aceptado por las fuerzas militares y por el comité de Ética constituido por el ministerio de Salud Pública de Colombia.

Cada uno de los soldados voluntarios fue inoculado con un millón de glóbulos rojos infectados con una cepa salvaje de *P. falciparum*. Cada una de las formas infectantes tiene la capacidad de generar 16 merozoitos que son liberados al torrente circulatorio. A cada voluntario, para determinar la parasitemia, se le tomó control de gota gruesa y naranja de Acridina cada 12 horas. Siempre permanecieron bajo cuidados médicos y de enfermería las 24 horas del día. Cuando los niveles de parasitemia subían por encima 0.5 % se inició tratamiento igualmente cuando fue por ellos solicitado, como fue el caso de uno de los individuos inmunizado con la molécula SPf 66.

La Tabla 1 muestra el desarrollo de las parasitemias de los vacunados. De los cinco vacunados con SPf66, tres se protegieron, uno se retiró en la mitad del estudio y solamente uno requirió tratamiento. La eficacia de la vacuna mostró una tendencia cercana al 75% (30).

**Fase IIB.** De acuerdo a las guías proporcionadas por la OMS, la eficacia de la vacuna debe ser ensayada por exposición natural al parásito en áreas endémicas. Para esta fase del estudio, 399 voluntarios hombres, entre 18 y 21 años pertenecientes a la Fuerzas Armadas de Colombia, fueron escogidos. De estos, 85 fueron vacunados con el polímero híbrido sintético SPf66 y los restantes, 214 individuos, sirvieron como controles. Los soldados, quienes tenían muy poca exposición previa al parásito, estaban en misiones de patrullaje en una vasta área endémica en la costa Pacífica de Colombia. Esta área presenta un índice anual parasitológico (API) de 12 +/- 2%, con una incidencia de 80 - 90% de *P. falciparum*.

Los voluntarios vacunados fueron cuidadosamente monitoreados, y cualquiera que desarrollara síntomas febriles fue evacuado al centro de salud regional para que se le hicieran exámenes clínicos y de laboratorio. Las gotas gruesas de estos individuos fueron ciega e independientemente leídas por los miembros del centro médico de la base de infantería de marina de Tumaco y por los microscopistas del servicio de erradicación de la malaria (SEM) de Tumaco. Los resultados fueron confirmados por el personal del laboratorio central de control de calidad del SEM en Santafé de Bogotá, quienes confirmaron o descartaron el diagnóstico original.

Para evaluar la seguridad de la vacuna, a cada uno de los voluntarios se les llevó a cabo un examen clínico detallado a la primera hora después de la inmunización, y luego a las 24 y 48 horas después de la inmunización y se realizaron pruebas de autoinmunidad y química sanguínea, para cada vacunado 10 días después de cada inmunización. Los resultados demuestran que no existe ninguna diferencia estadística cuando se comparan los grupos control y vacunados, y que la eficacia de la vacuna fue calculada en 82.3% contra *P. falciparum* y 60.6% contra *P. vivax* (1).

La cinética de producción de anticuerpos IgG contra la vacuna SPf66 fue establecida en un estudio paralelo. Se vio que el nivel de estos anticuerpos se incrementaba 15 a 30 días después de la segunda y tercera dosis, mostrando claramente un efecto de refuerzo después de la tercera dosis. Se demostró también, por Western blots, que los anticuerpos reconocían proteínas nativas del parásito. Sin embargo, la respuesta no fue igual en todos los individuos. Después de la segunda inmunización, se observó por FAST-ELISA un patrón característico de la respuesta IgG, mediante el cual los vacunados se clasificaron en tres grupos. El primer grupo, los altos respondedores, presentaron títulos de anticuerpos que variaban entre 1:1.600 y 1:25.600. Un segundo grupo de respondedores intermedios presentó títulos entre 1:200 y 1:800, y un tercer grupo, los bajos respondedores, en donde se clasificaron todos los individuos con títulos menores a 1:100 (37).

Un estudio posterior mostró una distribución bimodal de estos anticuerpos en la población vacunada, sugiriendo un control genético de la respuesta inmune a esta proteína. Por esta razón se llevó a cabo la tipificación de los alelos HLA A, B, DR y DQ de 105 individuos vacunados y 47 controles (31). La distribución de los alelos DQ y DR de los altos respondedores fue similar a la del grupo control. Sin embargo, la población de individuos HLA DR4 dentro del

Desarrollo de las Parasitemias Post-Reto en Voluntarios Vacunados (Porcentaje de Parasitemias en los Días Post-Reto)																	
Voluntarios Vacunados con SPf66																	
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
W.B.	0	0	.007	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W.G.	.036	.002	.289	0	.368	.006	.120	.166	.094	.072	.001	0	.020	.030	0	.020	0
L.C.	.034	0	.142	.002	.465	.006	.175	.013	.242	ND	.020	.116	.064	0	0	0	0
D.A.	.010	.011	.400	.007	0	.014	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J.C.	.006	0	.171	.002	2.150*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controles																	
A.C.	.032	.007	.270	0	1.600*												
J.D.	.033	.005	.870	.017	4.260*												
C.B.	.120	0	2.300*														
J.E.	.100	.010	3.600*														

\* Voluntarios tratados con droga antimalárica

**Tabla 1.** Parasitemias de voluntarios vacunados con tres dosis de la vacuna SPf66. El día del reto los voluntarios fueron inoculados por vía intravenosa con una cepa silvestre de *P. falciparum*. Los globulos rojos infectados fueron obtenidos de un voluntario control en quien la cepa había sido previamente inoculada. El inóculo inyectado consistía en un millón de eritrocitos infectados con anillos del parásito diluidos en 4 ml de solución salina. Las parasitemias se determinaron cada 12 horas a partir del tercer día por gota gruesa teñidas con coloraciones de Giemsa, Field y Naranja de Acridina. Voluntarios con parasitemias mayores al 0.5% recibieron tratamiento inmediato con cloroquina, seguida de sulfadoxina y pirimetamina. Debido a su excelente condición clínica, J.D. no fue tratado sino 24 horas después que el nivel de parasitemia alcanzó el 0.5%.

grupo de los bajos respondedores (68%) se incrementó significativamente cuando se comparó con el grupo control (36.2%) y el grupo de los altos respondedores (25%). Utilizando métodos de oligotipificación después de la amplificación del exon DR4 B-1, se procedió a la subtipificación de 20 voluntarios DR4 clasificados como altos, intermedios o bajos respondedores. No se halló correlación entre el subtipo DR4 y la respuesta inmune de los vacunados (24).

Por lo tanto, nuestro grupo decidió investigar si la restricción genética a la vacuna se encontraba presente a nivel del receptor de células T (RCT). Veinte clones de células T fueron analizados, 12 de los cuales correspondían a voluntarios clasificados como altos respondedores, y los ocho restantes como bajos respondedores. Se encontraron preferencias específicas y para los arreglos Variable Beta (VB) del RCT en cada uno de los grupos. El VB ha sido asociado con el proceso de reconocimiento del antígeno, y varios reportes han demostrado asociaciones preferenciales de ciertos genes VB como respuesta a antígenos específicos. Nuestros resultados muestran que los clones de células T de los altos respondedores se asocian preferiblemente con los rearrreglos VB 8, aunque también con los genes 2, 5, 6 y 7. En contraste, los clones de células T de los bajos respondedores no involucran ninguno de los genes asociados con los altos

respondedores. Se encontró que expresaban principalmente los genes VB 10, y con una frecuencia más baja, los genes VB 3 y 11 (25). Los mecanismos moleculares involucrados en esta restricción genética están siendo actualmente estudiados por nuestro grupo (5, 22).

Los siguientes ensayos de fase IIB fueron nuevamente llevados a cabo por nuestro grupo en soldados jóvenes y voluntarios provenientes de zonas no endémicas, quienes fueron llevados a patrullar áreas endémicas después de inmunización. El objetivo de estos estudios fue definir el número de dosis requeridas, el intervalo entre las aplicaciones de cada dosis, la concentración de la vacuna y el adyuvante a utilizar. Los resultados de los ensayos de Tumaco A, B, C y D muestran que, en nuestras manos, el mejor esquema de inmunización para los adultos consistía en tres dosis de la vacuna (en los días 0, 30 y 180), cada uno con 2 mg del polímero sintético SPf66 absorbido a 1 mg de hidróxido de aluminio (35).

Debido a que los estudios de campo previos habían sido llevados a cabo con números pequeños de individuos originarios de áreas no endémicas, se planeó un estudio bajo condiciones más representativas, con individuos residentes en áreas endémicas. Se escogió el municipio de Majadas, en el estado de Bolívar, en

el oriente de Venezuela, para este estudio. El área es endémica para *P. falciparum*, con un IPA de 22%, y una fórmula parasitaria de 55% para *P. falciparum*. Siguiendo las consideraciones éticas, se decidió no excluir ningún individuo mayor de 11 años (excepto las mujeres embarazadas) que manifestara el deseo de recibir la vacuna. 976 habitantes fueron inmunizados tres veces con la vacuna SPf66, y el resto de la población (938) se tomó como un grupo control. El objetivo inicial era evaluar cualquier cambio en las características epidemiológicas de la población vacunada al compararla con el grupo control, y describir la diferencia en los efectos de la vacunación. Ningún otro grupo de investigación había reportado un estudio de campo tan grande utilizando péptidos sintéticos como vacunas, y como consecuencia no existían experiencias previas, salvo la nuestra, y muy pocas guías internacionales de ética médica para vacunas contra la malaria, sobre las cuales diseñar un protocolo de vacunación. Los resultados preliminares indican que la vacuna es, como esperado, atóxica e inmunogénica para la mayoría de la población y al realizar un análisis estadístico de casos y controles se observa una protección contra la infección por *P. falciparum* de 60% (datos sin publicar).

Antes de poder aplicar la vacuna indiscriminadamente a individuos de cualquier edad, se llevó a cabo un estudio en niños entre 1 y 14 años, habitantes de la zona rural de Tumaco, Colombia (27). 94.6% de los niños que recibieron las tres dosis de la vacuna no mostraron ningún tipo de reacción secundaria atribuible a la vacuna. El resto, 12 niños, presentaron reacciones locales leves que no persistieron en chequeos subsecuentes. No se detectó ninguna reacción adversa en los 62 niños que se evaluó un año después de la primera dosis. El suero obtenido de estos niños 20 días después de la tercera inmunización muestra que el 93.7% desarrolló altos títulos contra la vacuna, variando entre 1:100 y 1 en 12:800. En ambos estudios, la reactividad a las proteínas nativas fue alta, como se presenció por Western Blot, especialmente contra las proteínas de 135, 115 y 83 kDa. Los resultados de estos estudios establecen, fuera de toda duda, la inmunogenicidad y seguridad de la vacuna SPf66. Con este resultado, el grupo se sintió confiado en llevar a cabo un estudio grande con una vacunación universal, aunque se excluyó a las mujeres embarazadas. 9.957 personas, todas ellas mayores de un año, habitantes de la municipalidades de Tumaco y Francisco Pizarro, fueron vacunadas con tres dosis de la vacuna bajo el esquema previamente establecido. 95.7% de los vacunados no presentó reacciones adversas a la vacuna. En el restante 4.3% la induración local y el eritema fueron las reacciones más frecuentes. De un

grupo de vacunados escogidos al azar, los títulos de anticuerpos anti-SPf66 fueron medidos por FAST-ELISA, demostrando que el 55% de estos individuos presentó títulos por encima de 1:1.600. Es interesante anotar que en este estudio las mujeres de edad fértil mostraron el más alto número de reacciones adversas. Nosotros creemos que una combinación entre los sistemas inmune y endocrino en las mujeres causa estos efectos indeseados (2). Este aspecto necesita ser mejor estudiado en futuros ensayos.

### Fase III

Como resultado de una reunión celebrada en Bogotá, Colombia, entre nuestro grupo de investigación y el grupo consultor de la OMS (40), se vió la necesidad de iniciar ensayos doble ciego placebo bajo diferentes condiciones epidemiológicas de malaria. Estos se están llevando a cabo en conjunto con otros grupos de investigación internacionalmente reconocidos, en Colombia, Venezuela, Ecuador, Brasil, Tanzania, Gambia y las Filipinas, los cuales involucran entre 500 y 30.000 personas. Se observa una eficacia de la vacuna cercana al 70% aplicada a diferentes poblaciones, e inclusive a subgrupos distintos dentro de una misma población, debido a las inherentes diferencias en el estado inmune de cada individuo, el mecanismo de transmisión e intensidad de la enfermedad, las diferentes cepas del parásito, etc. Por esta razón es esencial llevar a cabo estudios duplicados bajo diferentes condiciones epidemiológicas.

Algunos de los aspectos de la manera como se han conducido estos estudios, y que son el resultado de nuestra previa experiencia en ensayos de campo, merece ser mencionada.

**Determinación de la población a estudiar:** Inicialmente, varias localidades son escogidas en las cuales se puede conducir los estudios, de acuerdo a criterios tales como el comportamiento de la enfermedad durante los años previos, los índices malariométricos (IPA para *P. falciparum* y *P. vivax*), los cuales necesitan ser suficientemente altos para que se pueda observar una diferencia entre los grupos vacunados y control, la infraestructura de la localidad, el acceso, el deseo de la comunidad de participar en un ensayo de esta naturaleza, etc. Es un hecho ampliamente conocido que, para muchas áreas remotas en los países de Sur América, los casos de malaria son altamente subregistrados. Por esta razón, en muchos casos nuestro grupo, o el grupo que lleva a cabo la vacunación, escogió la localidad que mejores registros llevara, con el ánimo de determinar una línea de base epidemiológica adecuada. Sin embargo, como en algunos casos esta información no se encontraba disponible, nos

vimos obligados a hacer proyecciones que semejaran la realidad basados en esta información incompleta.

Con los líderes de la comunidad nosotros determinamos la importancia que los habitantes daban a la enfermedad. Debe notarse que Colombia es líder en los programas ampliados de inmunización (PAI) organizados por la OMS, y por lo tanto la vacunación es vista por la mayoría de las comunidades de manera positiva. Una vez que alguna de las localidades se seleccionaba, los trabajadores sociales, en contacto estrecho con los líderes de la comunidad, lograban la participación de la comunidad entera. La importancia de los trabajadores sociales y su interacción con la comunidad no debe ser subestimada. Estos individuos, habían tenido entrenamiento extensivo en malaria, al igual que en las características socioeconómicas.

Para el estudio de La Tola en el departamento de Nariño, se tomaron ocho localidades, en la rivera del río La Tola. Para Agosto de 1990 se determinó la población en 2942 habitantes (mujeres el 52.2%). Los indicadores malariométricos mostraban un IPA de 19.2 x 1000 habitantes desde 1984 con un incremento para 1989 de 130.4 x 1000 habitantes.

El estudio fue aleatorizado, doble ciego placebo. Los voluntarios recibieron las tres dosis los días 0, 30 y 180. Cada dosis era de 2 mg de la molécula SPf66 absorbida a 1 mg de gel de hidróxido de aluminio, en un volumen final de 0.5 ml. El grupo control recibió en la primera dosis toxoide tetánico y en las siguientes hidróxido de aluminio en solución salina.

La detección de los casos se realizó en forma continua durante un año luego de la administración de la tercera dosis, mediante la combinación de búsqueda pasiva y búsqueda activa. La búsqueda activa fue realizada por el personal del estudio mediante la visita a cada una de las casas mensualmente y una verificación visual de cada uno de los individuos vacunados y la toma de la temperatura para la detección de un caso febril. Se tomó gota gruesa a cada individuo con temperatura igual o mayor a 37.5°C

La detección de casos en forma pasiva se realizó a través de cuatro puestos de control localizados en el área de estudio. Estos puestos son atendidos por colaboradores voluntarios de la comunidad. El episodio de malaria se definió entre la asociación de signos clínicos unidos al diagnóstico microscópico de las formas asexuales de *P. falciparum* o *P. vivax*.

El total de láminas positivas para *P. falciparum* fue de 168 dentro de los 738 vacunados y de 297 en los 810 del grupo control. El estimativo crudo de la eficacia fue de 38.8%. Las eficacias variaron según el grupo de edad de uno a cuatro años 77.2, de cinco a nueve 23.9, de 10-14 23.5, de 15-44 21.8, de más de 45 fue de 67.

Un segundo estudio fase III que ya se finalizó, se realizó en la localidad de la T, una comunidad rural, altamente endémica para malaria en la provincia de Esmeraldas, al nor-oriente del Ecuador. Para este estudio fueron inmunizados aleatoriamente 468 individuos de ambos sexos mayores de un año, con la molécula SPf66 y con solución salina, con el esquema 0, 30 y 180, quedando finalmente 230 con la molécula SPf66 y 237 del grupo control. La detección de los casos se realizó en forma similar a la realizada en la Tola, Tumaco. La protección a la infección por *P. falciparum* para este estudio dio una eficacia de 66.8% (3).

Con los resultados obtenidos en estos estudios de campo se confirmó que la molécula SPf66 es protectora contra la malaria producida por *P. falciparum* en una población semimune de una área malárica. Por esto la vacuna SPf 66 es la primera generación de las vacunas multiantigénicas, multiestadio y sintética contra la malaria e igualmente la primera para controlar una infección parasitaria en los humanos, lo que constituye en una nueva herramienta para las campañas de control y erradicación de la malaria de nuestros países del tercer mundo e igualmente se constituye en un ejemplo de las capacidades con que contamos para solucionar nuestros propios problemas.

## REFERENCIAS

1. Amador R, Moreno A, Valero V, Murillo LA, Mora A, Rojas M, Rocha C, Salcedo M, Guzmán F, Espejo F, Nuñez F, and Patarroyo ME. 1992a. The first field trials of the chemically synthesized malaria vaccine SPf66: safety, immunogenicity and protectivity. *Vaccine* 10; 179 - 184.
2. Amador R, Moreno A, Murillo LA, Sierra O, Saavedra D, Rojas M, Mora AL, Rocha CL, Alvarado F, Falla JC, Orozco M, Coronell C, Ortega N, Molano A, Velásquez JF, Valero MV, Franco L, Guzmán F, Salazar LM, Espejo F, Mora E, Frafán R, Zapata N, Rosas J, Calvo JC, Castro J, Quiñones T, Nuñez F, and Patarroyo ME. 1992b. Safety and immunogenicity of the synthetic malaria vaccine SPf66 in a large field trial. *J Infect Dis* 166; 139-44.
3. Sempértegui F., Estrella B., Moscoso F., Piedrahita L., Hernandez D., Gaybor J., Naranjo P., Mancero O., Arias S., Bernald R., Espinoza M., Suarez J., Zicker F. 1993. Safety, immunogenicity and protectivity effect of the SPf66 malaria synthetic vaccine against *P. falciparum* infection in a randomized double-blind placebo-controlled field trial in an endemic area in Ecuador. Submitted to *Vaccine*.
4. Ballou WR, Sherwood JA, Neva FA, Gordon DM, Writz RA, Wasserman GF, Diggs CL, Hoffman SL, Hollingdale MR, Hockmeyer WT, Schneider I, Young JF, Reeve P, and Chulay JD. 1987. Safety and efficacy of a recombinant DNA *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *Lancet* i; 1277 - 1281.
5. Calvo M, Guzmán F, Perez E, Segura CH, Molano A, and Patarroyo ME. 1991. Specific interactions of synthetic peptides derived from *P. falciparum* merozoite proteins with human red blood cells. *Peptide Res.* 4; 324 - 332.
6. Clyde DF, McCarthy VC, Miller RM, and Woodward WE. 1975. Immunization of man against *falciparum* and *vivax* malaria by use of attenuated sporozoites. *Am J Trop Med Hyg* 24; 397 - 401.
7. Collins WE, Anders RF, Papaioanou M, Campbell GH, Brown GV, Kemp DT, Coppel RL, Skinner JC, Andrysiak PM, Favaloro JM, Corcoran LM, Broderson JR, Mitchell GF, and Campbell CC. 1986. Immunization of Aotus monkeys with recombinant proteins of an erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 323; 259 - 262.
8. Deres K, Schild H, Wiesmuller K-H, Jung G, and Rammensee H-G. 1989. In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature* 342; 561 - 564.
9. Cheung A, Leban J, Shaw, A, Merkli B, Stocker J, Chizzolini C, Sander C, and Perrin LH. 1986. Immunization with synthetic peptides of a *Plasmodium falciparum* surface antigen induces antimerozoite antibodies. *Proc Nat Acad Sci USA* 83; 8328 - 8332.
10. Guerin-Marchand C, Druilhe P, Galey B, Londoño A, Patarapotikul J, Beaudoin RL, Dubeaux C, Tartar A, Mercerau- Puijalon O, and Langsley G. 1987. A liver-stage-specific antigen of *P. falciparum* characterized by gene cloning. *Nature* 329; 164- 169
11. Herrington DA, Clyde DF, Losonsky G, Cortesia M, Murphy JR, Davis J, Baqar S, Felix AM, Heimer EP, Gillessen D, Nardin E, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Hollingdale M, and Levine MM. 1987. Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Nature* 328; 257 - 259.
12. Hoffman SL, Isenbarger D, Long GW, Sedegah M, Szarfman A, Waters L, Hollingdale MR, van der Meide PH, Finbloom DS, and Ballou WR. 1989. Sporozoite vaccine induces genetically restricted T cell elimination of malaria from hepatocytes. *Science* 224; 1078 - 1081.
13. Holder AA and Freeman RR. 1984. The three major antigens on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites are derived from a single high molecular weight protein. *J Exp Med* 160; 624 - 629.
14. Holder AA, Freeman RB, and Nicholls SC. 1988. *Parasite Immunol.* 10; 607 - 618.
15. Institute of Medicine. 1991. Vaccines. In "Malaria: Obstacles and Opportunities" (Oaks CS, Pearson GW, Carpenter CCJ, eds.). National Academy Press, Washington, DC.; 169 - 256.
16. Kemp DJ, Coppel RL, Stahl HD, Bianco AE, Corcoran LM, McIntyre-Crewther PE, Brown GV, Mitchell GF, Culvenor JG, and Anders RF. 1986. The Wellcome Trust Lectures. Genes for antigens of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol.* 91; 583.
17. Khusmith S, Charoenvit Y, Kumar S, Sedegah M, Beaudoin RL, and Hoffman SL. 1991. Protection against malaria by vaccination with sporozoite surface protein 2 plus CS protein. *Science* 252; 715 - 718.
18. Knapp B, Nau U, Hundt E, and Küpper HA. 1991. A new blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* highly homologous to the serine-stretch protein SERP. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44; 1 - 14.
19. Malik A, Egan JE, Houghten RA, Sadoff JC, and Hoffman SL. 1991. Human cytotoxic T lymphocytes against the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Proc Nat Acad Sci. USA* 88; 3300 - 3304.
20. Merrifield RB. 1963. Solid phase peptide synthesis. I. Synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc.* 85; 2149 - 2154.
21. Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, and McGinniss MH. 1976. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood- group genotype, FyFy. *New Eng Jour Med.* 295; 302 - 304.
22. Molano A, Segura C, Guzmán F, Lozada D, and Patarroyo ME. 1992. In human malaria protective antibodies are directed mainly against the Lys-Glu ion

- pair within the Lys-Glu-Lys motif of the synthetic vaccine SPf66. *Parasite Immunol.* 14; 111 - 124.
23. Moreno A and Patarroyo ME. 1989. Development of an asexual blood stage malaria vaccine. *Blood* 74; 537 - 546.
  24. Murillo LA, Rocha CL, Mora AL, Kalil J, Goldemberg AK, and Patarroyo ME. 1991. Molecular analysis of each HLA DR4 B-1 gene in malaria vaccinees. Typing and subtyping by PCR technique and oligonucleotides. *Parasite Immunol.* 13; 201 - 210.
  25. Murillo LA, Tenjo F, Clavijo O, Orozco M, Sampaio S, Kalil J, and Patarroyo ME. 1992. A specific T-cell receptor genotype preference in the immune response to a synthetic *Plasmodium falciparum* malaria vaccine. *Parasite Immunol.* 1992 14; 87 - 94.
  26. Murphy VF, Rowan WC, Page MJ, and Holder AA. 1990. Expression of hybrid malaria antigens in insect cells and their engineering for correct folding and secretion. *Parasitol.* 100(Pt. 2); 177 - 183.
  27. Patarroyo G, Franco L, Amador R, Murillo LA, Rocha CL, Rojas M, and Patarroyo ME. 1992. Study of the safety and immunogenicity of the synthetic malaria SPf66 vaccine in children aged 1-14 years. *Vaccine* 10; 175 - 178.
  28. Patarroyo ME, Romero P, Torres ML, Clavijo P, Andrew D, Lozada D, Sanchez L, del Portillo P, Pinilla C, Moreno A, Alegria A, and Houghten R. 1987a. Protective synthetic peptides against experimental *P. falciparum* induced malaria. In "Vaccines '87" (Chanock RM, Lerner RA, Brown F, and Ginsberg H, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA; 117.
  29. Patarroyo ME, Romero P, Torres ML, Clavijo P, Moreno A, Martínez, Rodríguez R, Guzmán F, and Cabezas E. 1987b. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature* 328; 629 - 632.
  30. Patarroyo ME, Amador R, Clavijo P, Moreno A, Guzmán F, Romero P, Tascón R, Franco A, Murillo LA, Pontón G, Trujillo G. 1988. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stage of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 332; 158 - 161.
  31. Patarroyo ME, Vinasco J, Amador R, Espejo F, Silva Y, Moreno A, Rojas M, Mora AL, Salcedo M, Valero V, Goldberg AK, and Kalil J. 1991. Genetic control of the immune response to a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunol.* 13; 509 - 516.
  32. Peterson MG, Coppel RL, McIntyre P, Langford CJ, Woodrow G, Brown GV, Anders RF, and Kemp JD. 1988. Variation in the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27; 291 - 302.
  33. Playfair JHL, Taverne J, Bate CAW, and de Souza JB. 1990. The malaria vaccine: anti-parasite or anti-disease? *Immunol Today* 11; 25 - 27.
  34. Perrin LH, Merkli B, Loche M, Chizzolini C, Smart J, and Richle R. 1984. Antimalarial immunity in saimiri monkeys. *J Exp Med.* 160; 441 - 451.
  35. Rocha CL, Murillo LA, Mora AL, Rojas M, Franco L, Cote J, Valero MV, Moreno A, Amador R, Nuñez F, Coronell C, and Patarroyo ME. 1992. Determination of the immunization schedule for field trials with the synthetic malaria vaccine SPf66. *Parasite Immunol.* 14; 95 - 109.
  36. Salcedo M, Barreto L, Rojas M, Moya R, Cote J, and Patarroyo ME. 1991. Studies on the humoral immune response to a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol.* 84; 122 - 128.
  37. Satterthwait AC, Chiang LC, Arrhenius T, Cabezas E, Zavala F, Dyson HJ, Wright PE, Lerner RA. 1990. The conformational restriction of synthetic vaccines for malaria. *Bull. WHO* 68(Suppl); 17 - 25.
  38. Schoefield L, Nussenzweig R, and Nussenzweig V. 1988. Immunity to malaria sporozoites requires CD8+ (suppressor / cytotoxic) T cells and gamma-interferon. In "Vaccines '88" (Chanock RM, Lerner RA, Brown F, and Ginsberg H, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA; 71.
  39. Siddiqui W, Tam L, Kramer J, Hui GS, Case S, Yamaga K, Chang EB, and Kan SC. 1987. Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkeys against *P. falciparum* malaria. *Proc Nat Acad Sci. USA* 84; 3014 - 3018.
  40. Smith PG, and Hayes RJ. 1991. Design and conduct of field trials of malaria vaccines. Paper presented in the First Annual Public Health Forum at the London School of Hygiene and Tropical Medicine on "Malaria: waiting for the vaccine". 14 - 17 April.
  41. Takahashi H, Takeshita B, Morein B, Putney S, Germain RN, and Berzofsky JA. 1990. Induction of CD8+ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs. *Nature* 344; 873 - 875.
  42. Trager W and Jensen JB. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193; 673.
  43. World Health Organization. 1985a. Principles of malaria vaccine trials. WHO, Geneva. Document TDR/IMMAL-FIELDMAL/VAC/85.3.
  44. World Health Organization. 1985b. Report of the Informal Consultation on Stratification for Planning Antimalaria Action. WHO, Geneva. Document INF.CON.S./WP/85.0