

ESTRATEGIA PARA EL DESARROLLO DE UNA VACUNA SINTETICA CONTRA LOS ESTADIOS SANGUINEOS ASEXUALES DE LA MALARIA CAUSADA POR *P. FALCIPARUM**

Alberto Moreno
Manuel E. Patarroyo

Por varias décadas la malaria, principalmente la causada por *P. falciparum* se ha esparcido en los países en vías de desarrollo no sólo por la dificultad para erradicar el vector, sino también por la resistencia del parásito a las drogas.

Para la obtención de métodos inmunoprolácticos que puedan ofrecer protección contra esta enfermedad muchos laboratorios, incluido el nuestro, han investigado las moléculas proteínicas de los diferentes estadios del parásito (esporozoito, merozoito y gametocito), susceptibles al ataque del sistema inmune. Las proteínas específicas de los esporozoitos y merozoitos han sido bien estudiadas (1-4). En este artículo describimos los resultados de la fase preclínica y el inicio de la fase clínica en la investigación del desarrollo de una vacuna efectiva contra la malaria producida por el *P. falciparum*.

Nuestro grupo ha centrado su estudio en el merozoito, Western Blotts de lisados de merozoitos analizados con sueros de pacientes hiperinmunes, demostraron su gran complejidad antigénica, pudiéndose identificar gran número de proteínas de diferentes Pesos Moleculares. En nuestro Instituto las proteínas con Pesos Moleculares de 195K (Kilodaltons), 155K, 135K, 115K, 112K, 97K,

93K, 83K, 75K, 72K, 63K, 60K, 55K, 52K, 50K, 42K, 40K, 35K, 30K y 22K (Figura 1) han sido aisladas con alto grado de pureza en cantidades entre 200 y 400 ugrs. Mediante radiomarcage metabólico con (75 S) Metionina, se ha demostrado que estas proteínas son sintetizadas por el parásito y no son proteínas de eritrocito; el radiomarcage de las proteínas de superficie mediante técnica de lactoperoxidasa y 125 I demostró que las moléculas de 195K, 155K, 145K, 115K, 83K, 80K, 55K, 42K y 35K son las proteínas más prominentes en la membrana del merozoito (5,6).

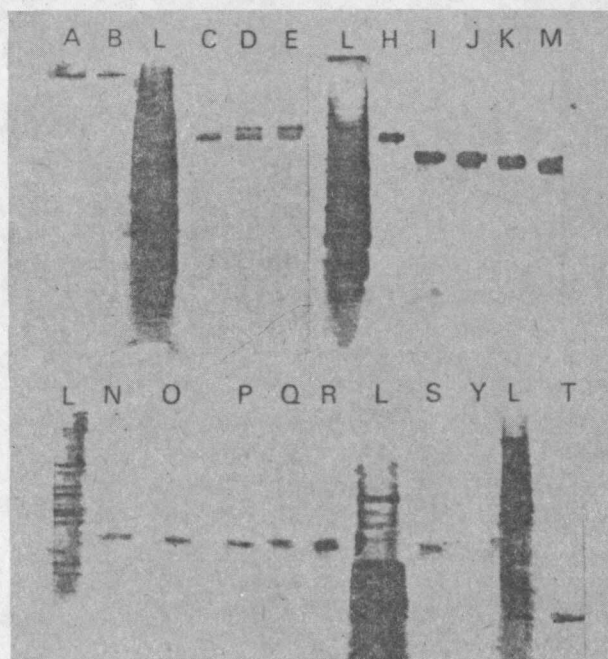


Figura 1
Proteínas aisladas de merozoitos de *P. falciparum*, analizados por Western Blott: A, B) 195K, C, D, E) 145K, 155K, H) 112K, I) 97K, J) 96K, K) 95K, M) 83K, N, O, P) 63K, 60K, Q) 55K, R) 54K, S) 52K, Y) 50K, T) 35K, L) Lisados de Merozoitos de *P. falciparum*.

* Financiado por la presidencia de Colombia - BID ICFES, Programa de Desarrollo e Investigación, Ministerio de Salud Pública, La Occidental Petroleum Co. de Colombia, y la Asociación Alemana de Ayuda contra la Lepra. Agradecemos al Dr. Belisario Betancur, anterior Presidente de Colombia, Diego Pizano, José Granada, Bruce Merrifield, Richard Houghten, y Richard Lerner por su apoyo, las Fuerzas Militares de Colombia especialmente los voluntarios, y el Cuerpo Médico. Agradecemos también a los doctores Mats Wahlgren, José Félix Patiño, Señora Fanny Calvo de Simón, Lida Londoño, Claudia Rocha, Marcela Rodríguez y Aure León por sus útiles sugerencias.

Estudios de protección con proteínas aisladas

Un grupo de proteínas fue elegido para los estudios inmunológicos con los siguientes criterios: 1) Se encontró que eran sintetizadas por los parásitos, 2) Estaban predominantemente expresadas en la membrana del merozoito y 3) Se habían obtenido en cantidades suficientes. Para inducir una protección inmune contra el parásito, se utilizaron micos del género *Aotus*, altamente susceptibles a la malaria experimental. Cada animal recibió tres inoculaciones subcutáneas de 15 ugr de proteína, la primera emulsificada 1:1 en Adyuvante Completo de Freund (ACF) y las otras en Adyuvante Incompleto de Freund (AIF). De 2 a 3 micos fueron inmunizados por proteína aislada, mientras que los micos del grupo control recibieron solución salina en ACF o AIF. Los micos fueron inmunizados en los días 0, 15 y 30 y luego retados en el día 45 con una inyección intravenosa de 5 millones de glóbulos rojos infectados con *P. falciparum* (cepa F.V.O.) en un volumen de 0.5 c.c. Estos parásitos habían sido mantenidos mediante pases en micos *Aotus* o criopreservados en Nitrógeno líquido. La parasitemia fue monitorizada por exámenes diarios de extendidos de sangre periférica con tinción de Giemsa y examen en fresco mediante tinción con Naranja de Acridina. Los análisis serológicos llevados a cabo con sueros obtenidos 5 días antes del reto, demostraron que todos los animales poseían anticuerpos con títulos variables contra *P. falciparum*. Esto fue detectado por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) con Esquizontes y por ELISA con sonicados de esquizontes puros de *P. falciparum*.

La tabla 1 muestra que los animales control se enfermaron 5 a 6 días después del reto y desarrollaron una parasitemia alta que requirió el uso de Quinina durante 10 a 15 días posteriores al reto. Los micos inmunizados con las proteínas 155K y 55K se enfermaron solamente entre los días 10-11, lo que hizo necesario iniciar el tratamiento entre los días 16-19, demostrando un retraso de 4-5 días en el comienzo de la enfermedad. De los tres micos inmunizados con moléculas de 83K, uno (AO125) no desarrolló la enfermedad durante el experimento; el segundo mico (AO130) tuvo una parasitemia leve de 3.6% en el día 12, recuperándose espontáneamente en el día 17; el tercer mico (AO144) alcanzó su más alto grado de parasitemia, 0.5% en el día 15 y como el segundo mico se recuperó espontáneamente. Una respuesta similar se observó en los micos inmunizados con la proteína 35K. Estos micos desarrollaron grados

bajos de parasitemia, indicando efecto protector positivo de estas dos proteínas. Las otras proteínas no dieron ninguna actividad protectora en los micos *Aotus* que desarrollaron una enfermedad similar a la de los controles, requiriendo también tratamiento.

Nuestro grupo había determinado previamente la secuencia parcial de aminoácidos de 25 de las proteínas aisladas. La proteína 155K llamada RESA (ring infected erythrocyte surface antigen) fue identificada previamente por Perlmann et al (7) y secuenciada por Cowman et al (8), es una molécula importante contra la cual se puede inducir inmunidad protectora. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la molécula de 195K, precursora de tres moléculas, 83K, 42K y 19K fueron reportadas por Holder et al (9) y por Mackay et al (10). Con base a la secuencia de aminoácidos reportada por dichos autores, fue llevada a cabo la síntesis química de un sinnúmero de péptidos correspondientes a diferentes fragmentos de la proteína 83K que representa un total del 47% de toda la proteína. Doce péptidos más correspondientes a las secuencias parciales de aminoácidos de las moléculas 35K, 42K y 155K fueron también sintetizadas. En vista de que estas proteínas inducían inmunidad protectora, sintetizamos las sondas de oligonucleótidos de acuerdo a las secuencias parciales de aminoácidos para buscar los genes codificantes de estas proteínas en una librería genómica de *P. falciparum* construida en el fago Lambda gt 11. Los clones positivos fueron aislados, un fragmento de 5 Kb correspondiente al gen de la proteína 35K y fragmentos de 0.5 Kb y 0.3 Kb correspondientes al gen de la proteína 55K fueron obtenidos y están siendo secuenciados.

Estudios de protección con péptidos sintéticos

Los péptidos sintetizados químicamente de acuerdo a las secuencias de aminoácidos antes referidas, fueron utilizados en la inmunización de otro grupo de micos *Aotus*. 4 micos fueron inoculados por péptido en una concentración de 250 ugr. acoplados a 250 ugr. de Albumina Bovina Sérica y emulsionados 1:1 en ACF para la primera inoculación y en AIF para las subsiguientes inoculaciones. Los micos fueron inoculados en los días 0, 30, 45, 60 y 75. La mayoría de los animales desarrollaron anticuerpos contra esquizontes de *P. falciparum* antes del reto, como se pudo determinar por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y en la prueba péptido-antipéptido, determinada por

TABLA No. 1

Parasitemia postreto en micos inmunizados

Inmunógeno	Mico número	Porcentaje de Parasitemia en los días (después del reto)														
		6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
155K	087	0	0	0	0	0.88	0.30	2.0	3.0	5.35	8.8	Q				
	090	0	0	0	0	0	0	0.8	0.2	0.45	0.9	1.5	1.6	2.0	3.4	10.3
115K	085	0	0.46	0.84	3.48	3.0	9.93	Q								
	150	0	0.05	0.20	1.12	1.67	n.d.	6.57	Q							
105K	165	0	0.33	1.92	3.72	10.9	Q									
	168	0	0.81	1.64	3.33	11.5	Q									
90K	160	0	0.13	1.2	3.39	4.14	13.65	Q								
	170	-	0.10	1.1	1.20	5.09	5.40	14.7	Q							
83K	125	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	130	0	0	0	0.6	0.2	0.3	3.63	1.6	1.1	0.6	n.d.	0	0	0	
	144	0	0	0	0	0	0	0	0.1	0.05	0.5	0.3	0.07	0.03	0.01	0
60K	119	0	0	0	0.1	0.80	0.15	4.5	1.25	15.3	Q					
	122	0	0.13	0.25	0.15	0.80	2.5	17.5	Q							
55K	0.81	0	0	0	0	0	0.18	0.24	0.8	1.57	3.0	3.5	4.4	7.4	Q	
	102	0	0	0	0	0	0.05	0.05	0.5	0	0.1	0.6	0.9	5.4	7.3	Q
50K	029	0	0.45	1.50	3.6	4.67	10.0	Q								
	056	0	0.66	5.6	4.43	6.42	4.20	11.3	Q							
	131	0	0.31	1.50	0.50	3.93	2.0	16.5	Q							
40K	111	0	0	0	0	1.02	0.20	2.7	3.2	14.3	Q					
	114	0	0	0	0	0.8	0.5	2.0	2.0	2.0	7.6	Q				
35K	135	0	0	0	0	0	0	0.01	0.03	0.03	0.1	0.012	0.01	0	0	0
	159	0	0.25	0.25	1.3	2.23	1.03	2.5	2.1	4.0	2.1	1.6	0.7	0.08	0.01	0
30K	093	0	0.05	1.52	2.5	4.75	3.45	2.54	4.8	9.4	Q					
	171	0	0.1	2.5	1.6	2.63	2.05	13.0	Q							
23K	112	0	0.06	0	1.0	0	3.60	6.37	6.60	12.0	Q					
	137	0	0.05	0.05	0.20	0	1.1	3.2	n.d.	+						
Control.	501	0.40	0.76	3.0	2.0	7.82	9.07	Q								
	502	0.03	0.06	0.43	0.47	3.6	3.4	5.9	8.92	Q						
	199	1.0	4.3	3.11	9.8	26.0	Q									

Parasitemias postreto en micos del género *Aotus* inmunizados con proteínas purificadas aisladas de *P. falciparum*. La parasitemia es expresada como el porcentaje de eritrocitos infectados. N.D., No determinado; Q, Quimioterapia; +, Muerte.

ELISA. El reto se llevó a cabo el día 90 por medio de la inyección intravenosa de 5 millones de glóbulos rojos infectados con *P. falciparum*, cepa F.V.O. de otro mico *Aotus*. Los controles se hicieron con solución salina en ACF o AIF siguiendo el mismo esquema.

Se encontró que la mayoría de péptidos individuales no inducían protección alguna contra la infección experimental, no obstante el título de anticuerpos detectados por IFI y ELISA. Sin embargo, la inmunización con algunos péptidos (83.1, 55.1, 35.1, 83.2, 83.26, 83.18, 83.30 y 82.23) retrasó la aparición de la enfermedad en algunos animales vacunados demostrando que inducían una protección parcial (figura 2).

Teniendo en cuenta estos datos, se decidió desarrollar otro esquema de inmunización usando una combinación de 2 o 3 de los péptidos parcialmente protectores (11). Tal como en el experimento anterior, los micos desarrollaron un alto título de anticuerpos detectados por las técnicas descritas anteriormente (Inmunofluorescencia Indirecta y la reacción de péptido-antipéptido detectado por ELISA). Cuando se llevó a cabo el reto de este nuevo grupo de micos *Aotus* así inmunizados, 4 de los 8 animales vacunados con la mezcla de dos péptidos (SPf 35.1 y SPf 55.1) desarrollaron una enfermedad similar a la de los controles. Los 4 animales restantes desarrollaron la enfermedad recuperándose espontáneamente. De los 6 animales inmunizados con la mezcla de tres

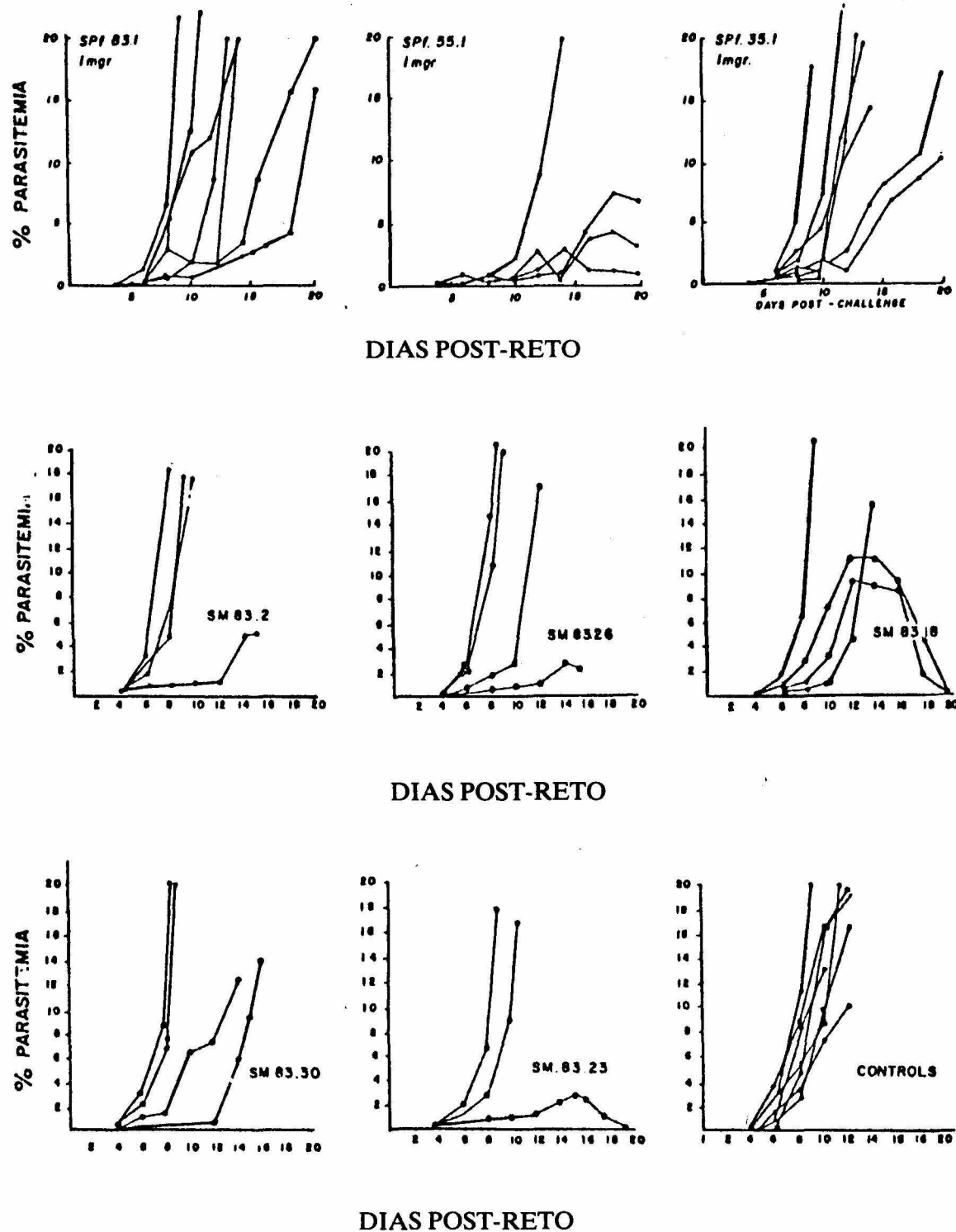


Figura 2

Desarrollo de parasitemias en micos inmunizados con péptidos sintéticos correspondientes a diferentes segmentos de las proteínas 83K, 55K y 35K. La parasitemia es expresada como el porcentaje de eritrocitos infectados. Cada línea representa el curso de la parasitemia en un animal.

péptidos (SPf 35.1, SPf 55.1 y SPf 83.1), tres desarrollaron parasitemias muy discretas con pico entre el día 10 y el día 15, más tardíamente que el de los controles y se recuperaron espontáneamente; los tres animales restantes nunca desarrollaron parasitemias (Tabla 2). El Experimento fue reproducido con 24 animales más, utilizando como

inmunógeno la mezcla de tres péptidos sintéticos antes descrita, encontrándose nuevamente que el 60% de este nuevo grupo de animales se protegían completamente, 20% desarrollaban parasitemia discretas que se recuperaban espontáneamente y el 20% restante se comportaban como los controles (Datos no mostrados).

TABLA No. 2

Grupo	Mico número	Porcentaje de Parasitemia en los días (después del reto)																											
		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	22	24	26	28	30	35	40	45	60	75	90	
Control	358	.1	0	.9	.9	5.3	7.9	10.2	28.4	Q																			
	357	0	0	.1	0	.5	1.6	1.6	3.0	7.4	19.0	Q																	
	359	.1	0	.5	.9	.9	2.4	2.5	5.4	9.0	9.0	4.5	11.5	12.0	19.0	Q													
2 peptidos (SP1351) (SP1551)	229	0	0	.8	.5	1.5	5.0	6.6	32.5	Q																			
	255	0	0	.6	1.0	3.7	6.7	10.9	31.0	Q																			
	287	0	0	.6	.8	1.0	1.6	4.1	6.0	11.8	9.6	9.8	10.0	10.5	Q														
	251	0	0	0	0	0	0	0	.2	.2	1.2	3.2	n.d.	11.6	Q														
	275	0	0	0	.1	.5	.5	.5	2.0	4.0	6.5	6.0	6.6	n.d.	8.3	.9	.6	.5	.4	.1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	288	0	0	0	0	.2	.1	0	1.0	.8	2.3	n.d.	4.5	5.7	3.1	1.0	1.0	.5	.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	289	0	0	0	.2	.1	.2	1.0	2.3	5.4	10.4	6.8	2.7	5.4	n.d.	.2	.2	.2	.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	286	0	0	.1	0	.1	.4	.4	3.5	3.7	3.2	n.d.	.2	.2	0	.2	.2	.2	.2	0	0	0	*						
	295	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	.1	0	.3	4.4	5.5	2.1	.2	0	0	0	0	0	0	0	
3 peptidos (SP1351) (SP1551) (SP1831)	298	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	.3	1.3	4.6	.9	.4	.1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	290	0	0	0	.1	0	0	0	.3	0	.7	.1	.7	.4	2.5	1.1	.6	0	0	0	0	0	0	0	0	*			
	291	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	297	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Parasitemias postreto en micos del género *Aotus* inmunizados con mezclas de péptidos sintéticos. La parasitemia es expresada como el porcentaje de eritrocitos infectados. a) N.D., No determinado; Q, Quimioterapia; +, Muerte. b) SPf35.1 tiene 11 residuos de aminoácidos, SPf55.1 tiene 13 residuos de aminoácidos. c) SPf35.1 tiene 11 residuos de aminoácidos, SPf55.1 tiene 13 residuos de aminoácidos, SPf83.1 tiene 11 residuos de aminoácidos.

Estudios en humanos (20)

Basados en estos datos diseñamos dos proteínas híbridas poliméricas (Fig. 3a) conteniendo los epitopes o fragmentos antigénicos sintéticos que habían mostrado inducir protección parcial o total en los modelos experimentales infectados y/o que habían sido previamente estudiados como buenos candidatos para la vacuna contra la malaria (6, 11, 12, 13, 20). Estas moléculas eran puras como se observa en el HPLC (Fig. 3b). Se logró su polimerización mediante la adición de cisteína en sus extremos amino y carboxiterminales utilizando glicina y prolina como espaciadores. El Peso Molecular relativo (PM) de SPf (66) 30 fue 150K y SPf (105) 20, 100K, indicando que los polímeros eran de 30 y 20 unidades respectivamente (Fig. 3c).

La eficacia, inmunogenicidad y protectividad de SPf (66)30 así como también sus péptidos indi-

viduales habían sido previamente ensayados en micos como se muestra en el estudio anterior y ninguna anomalía histopatológica, de comportamiento o de laboratorio clínico se observó en ninguno de los animales inmunizados y sacrificados para análisis. La inmunogenicidad y protectividad de los péptidos individuales del SPf(105)20 habían sido previamente ensayados por nosotros (11) y por otros autores (12,13) en animales de experimentación. Para examinar la eficacia, seguridad, atoxicidad e inmunogenicidad de esas proteínas sintéticas en humanos y la protección suministrada contra la malaria se seleccionaron 13 soldados bachilleres sanos, de un total de 109 soldados voluntarios de las Fuerzas Militares de Colombia.

Basados en sus historias clínicas, procedencia de áreas no endémicas, estado clínico y pruebas de laboratorio: (cuadro hemático completo, Química sanguínea completo uroanálisis y pruebas

3A

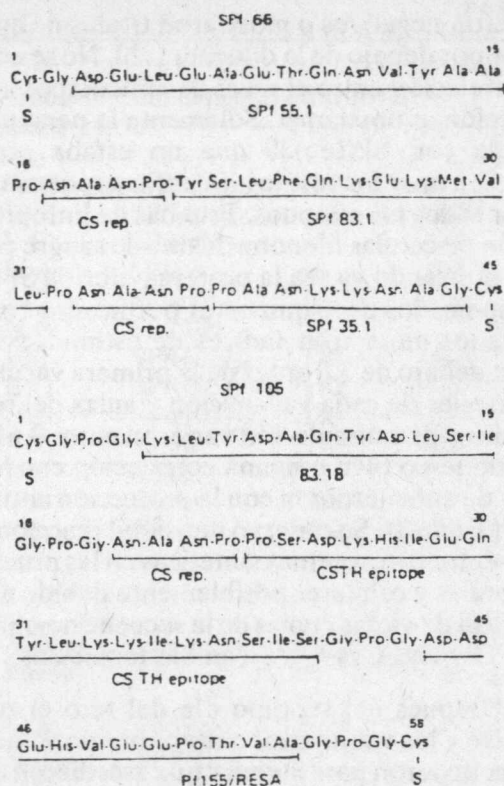
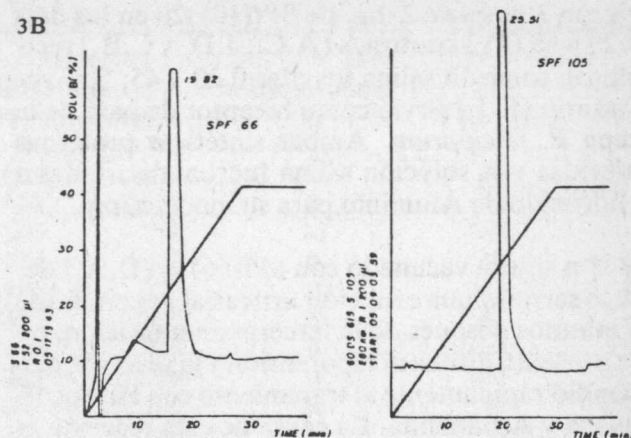


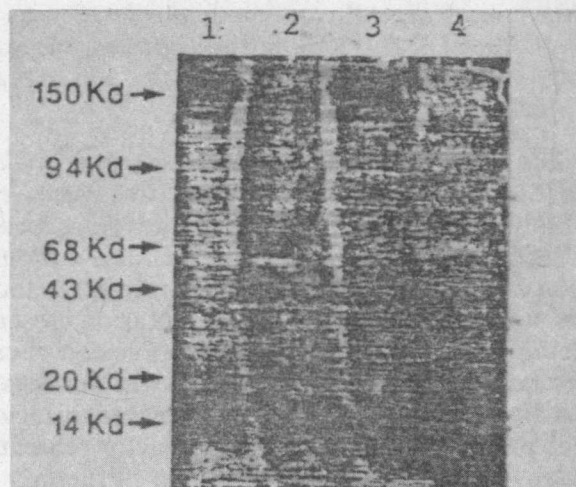
Figura 3

a) Secuencia de aminoácidos de las moléculas híbridas sintéticas. Las moléculas usadas para la inmunización fueron sintetizadas químicamente por el método de Merrifield (19). Los péptidos fueron purificados por cromatografía líquida de alta presión en columnas de ODS en fase reversa. La polimerización se obtuvo con oxigenación vigorosa mediante burbujeo de oxígeno durante 6 a 10 horas. Los péptidos fueron dializados bajo condiciones estériles y desalinizados con SPHADEX G-25. b) Se muestran los cromatogramas de HPLC de las proteínas poliméricas híbridas sintéticas. c) Electroforesis en PAGE-SDS con gradiente del 15-5% de SPf(66)30, mostrándose el grado de polimerización de esta proteína; c.1 Polímero, c.2 Marcadores de Peso Molecular, c.3 Polímero y c.4 Monómero.

3B



3C



para la presencia de anticuerpos a virus de hepatitis B y *P. falciparum*) se aceptaron 13 voluntarios quienes habían decidido cooperar en este estudio. No se ofrecieron incentivos económicos o promocionales. Todos presentaron pruebas de laboratorio normales y gozaban de una excelente condición física y mental. Basados en las recomendaciones de la OMS para ensayos en humanos, (14,15) y con la aclaración de que los voluntarios eran libres de retirarse en cualquier instante de la investigación, se obtuvo el consentimiento escrito después de haberse explicado la naturaleza de la investigación y sus potenciales riesgos y beneficios. Este estudio fue aprobado por el comité médico de las FFMMAA de Colombia y el Ministerio de Salud Pública. Para el estudio del resto los voluntarios fueron hospitalizados en el Hospital Militar Central en Bogotá, con un completo acceso a todos los servicios médicos y de cuidados intensi-

vos (uno de los autores del estudio es especialista en cuidados intensivos). Adicionalmente, durante el período de hospitalización, seis médicos, autores del artículo, estaban disponibles 24 horas al día. Extendidos de sangre periférica de los voluntarios fueron analizados por triplicado independientemente por nosotros, por el personal científico del hospital Militar y por el SEM (Servicio de Erradicación de la Malaria). Nos impusimos el criterio de que los vacunados que desarrollaran parasitemia de más de 0.5% serían tratados con Cloroquina seguido por Sulfadoxina y Pirimetamina o Quinina.

Los voluntarios fueron divididos en 5 grupos: 1. 2 (D.A. y J.C.) recibieron 3 dosis de 2 mg. de SPf(66)30 en los días 0, 60 y 80; 2. 3 (W.D., W.G. y L.C.) recibieron la misma proteína y dosis en los días 0 y 60; 3. 4 (H.A., J.S., E.O., y H.B.) reci-

bieron 3 dosis de 2 mg. de SPf(105)20 en los días 0,20 y 45 (4) 3 controles (A.C., J.D. y C.B.) recibieron solución salina los días 0,20 y 45; 5. 1 voluntario (E.J.) sirvió como receptor de pase de la cepa *P. falciparum*. Ambas sintéticas proteínas híbridas y la solución salina fueron absorbidas a Hidróxido de Aluminio para su inoculación.

Un sujeto vacunado con SPf(66)30 (D.A.) desarrolló una erupción urticarial generalizada 5 minutos después de la tercera inmunización, no se presentó disnea ni hipotensión y la reacción respondió rápidamente al tratamiento con Hidrocortisona y Adrenalina. La causa de esta reacción es desconocida pero fue atribuida a problemas durante la diálisis de un lote de SPf(66)30 que se realiza con el fin de remover Sales, Tris y Ditiotritol (DTT). Debido a que no se pudo detectar anticuerpos específicos tipo inmunoglobulina E dirigida contra el polímero mediante la técnica de Dot-Blot ELISA, esta diálisis fue omitida del protocolo de purificación y la desalinización se realizó mediante filtración en gel.

Ningún sujeto vacunado tres veces con otro lote de SPf(66)30 ni los vacunados tres veces con SPf(105)20 desarrollaron efectos adversos locales o sistémicos. Dolor leve, eritema local e induración en el sitio de inoculación se presentó en todos los sujetos. Ninguno de los voluntarios presentó fiebre o mostró cambios significativos en el cuadro hemático, química sanguínea y uroanálisis en los días -1, 1, 3 y 5 después de cada inmunización. Las pruebas de autoinmunidad (factor reumatoideo, anticuerpos antinucleares, Pruebas de Coombs y anticuerpos antifibra miocárdica) fueron todos negativos. Para estudiar la dinámica de la respuesta inmune humoral y celular, muestras sanguíneas fueron tomadas el día previo, a los 15 días siguientes a cada inmunización y el día anterior al reto. En esta última muestra los títulos de anticuerpos fueron determinados por técnicas inmunoenzimáticas en reacción de péptido antipéptido (ELISA) usando las moléculas de proteína sintética como antígeno. No se detectaron anticuerpos dirigidos contra la forma repetitiva (NANP) de la molécula del circumsporozoito mediante ELISA en ningún suero o contra Pf155/RESA por la técnica de Inmunofluorescencia indirecta, (7,13) en suero de los individuos inmunizados con SPf(105)20 (Tabla 3). De la misma manera todos los sueros presentaron títulos de anticuerpos contra merozoitos-esquizontes detectados por IFI que oscilaron entre 1:20 y 1:160. Todos los sueros preinmunes al igual que el suero de los controles y de los receptores no inmunizados

fueron negativos o mostraron títulos de anticuerpos por debajo de la dilución 1:20. No se encontró correlación entre el nivel de anticuerpos y la protección antimalárica. Solamente la persona vacunada con SPf(66)30 que no estaba protegida (J.C.) tuvo los niveles de anticuerpos más bajos por todos los métodos. Pruebas de linfoproliferación de células mononucleares de sangre periférica utilizando ya sea la proteína híbrida SPf(66)30 o sonicados de esquizontes purificados como antígenos mostraron índices de estimulación (IE) por debajo de 3.0 antes de la primera vacunación. Después de cada vacunación y antes del reto, los índices de estimulación variaron entre 0.61 y 35.1 aunque no tuvo ninguna correlación con los títulos de anticuerpos ni con la protección antimalárica (Tabla 3). Se observó una débil reacción cruzada entre las proteínas sintéticas en las pruebas humorales y celulares posiblemente debido a la presencia de varias copias de la secuencia polimerizada Gly-Cys-Cys-Gly en ambas moléculas.

Después del séptimo día del reto el receptor naive y los voluntarios que recibieron solución salina tuvieron parasitemias que ascendieron en doce horas desde niveles muy bajos hasta >1.0% (Tabla 4). Se les suministró quimioterapia inmediatamente con una rápida respuesta clínica, y sin secuelas o efectos residuales. De los cuatro voluntarios (H.A. y J.S.) vacunados con SPf(105)20 mostraron control parcial de la infección con conteo bajo de parásitos por 13-14 días, seguido por el desarrollo de parasitemias mayores a 0.5%. Ellos recibieron quimioterapia y se recuperaron sin ningún problema clínico o complicaciones. Los otros dos se comportaron como los controles y fueron tratados similarmente (Tabla 4). Tres de los cinco voluntarios (W.B., W.G. y L.C.) vacunados con SPf(66)30 tenían infección débil con un decrecimiento estable en el conteo de parásitos y una recuperación total para el día 21 (Tabla 4). Entre ellos (W.B.) tenía un pico de parasitemia de (0.007%) en el día séptimo pero los parásitos no fueron vistos nuevamente en su sangre. Los otros dos (W.G. y L.C.) desarrollaron parasitemias por debajo de 0.5% que se autolimitaron en el día 18 y 20 posterior al reto. Aunque las formas asexuales sanguíneas habían desaparecido, unos cuantos gametocitos (un promedio de 0.004%) permanecían; debido a que muy pocas formas asexuales sanguíneas (menos de 0.004%) eran ocasionalmente vistas en la sangre, se les administró quimioterapia profiláctica en el día 35. El día 40 no se presentaron formas asexuales sanguíneas o gametocitos y las condiciones clínicas de los voluntarios así como los resultados de laboratorio fueron ex-

TABLA No. 3

Voluntarios	Inmunógeno	ELISA				IFI	
		SPf(66) ₃₀	PR	SPf(105) ₂₀	PR	Esquizontes	PR
		PI		PI		PI	
W.B.	SPf(66) ₃₀	.140	.580	.160	.300	0	40
W.G.	SPf(66) ₃₀	.260	.570	.310	.545	0	40
L.C.	SPf(66) ₃₀	.340	.640	.160	.210	20	160
D.A.	SPf(66) ₃₀	.08	.750	.100	.320	0	40
J.C.	SPf(66) ₃₀	.160	.170	.110	.170	0	20
H.A.	SPf(105) ₂₀	.240	.270	.300	1.000	20	40
J.S.	SPf(105) ₂₀	.170	.480	.110	.440	0	160
E.O.	SPf(105) ₂₀	.110	.120	.240	.720	0	160
H.B.	SPf(105) ₂₀	.180	.570	.00	1.200	20	40
A.C.	Saline	.240	.280	.210	.190	0	0
J.D.	Saline	0	0	.007	0	0	0
C.B.	Saline	.200	2.70	.160	.440	0	0
J.E.	Naive	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0	0

Voluntarios	Inmunógeno	Ensayos de Linfoproliferación - CMSP				Esquizontes	
		SPf(66) ₃₀	PR	SPf(105) ₂₀	PR	PI	PR
		PI		PI			
W.B.	SPf(66) ₃₀	0.6	3.1	N.D.	3.1	2.0	1.5
W.G.	SPf(60) ₃₀	1.7	5.6	N.D.	4.1	1.7	5.6
L.C.	SPf(66) ₃₀	0.6	5.5	N.D.	3.0	1.4	12.4
D.A.	SPf(66) ₃₀	1.1	13.9	N.D.	7.8	1.1	6.6
J.C.	SPf(66) ₃₀	1.0	16.1	N.D.	9.5	1.1	9.1
H.A.	SPf(105) ₂₀	0.4	18.9	N.D.	18.3	0.7	35.1
J.S.	SPf(105) ₂₀	1.3	12.0	N.D.	5.3	1.1	13.4
E.O.	SPf(105) ₂₀	1.7	0.6	N.D.	0.6	3.0	0.8
H.B.	SPf(105) ₂₀	N.D.	1.8	N.D.	2.3	N.D.	3.3
A.C.	Saline	0.1	1.3	N.D.	1.3	0.2	1.4
J.D.	Saline	2.1	1.7	N.D.	0.8	2.5	1.0
C.B.	Saline	1.3	3.5	N.D.	3.4	1.8	4.0
J.E.	Naive	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Respuesta Inmune Humoral y Celular en voluntarios vacunados con las Proteínas Poliméricas Híbridas Sintéticas. Los títulos de anticuerpos fluorescentes se expresan como el recíproco de la dilución final del suero. Para las pruebas de inmunofluorescencia indirecta se utilizaron cultivos de eritrocitos infectos con *P. falciparum* con una parasitemia del 10% y secados al aire. Para las pruebas del IFI para Pf155/RESA se utilizaron eritrocitos infectados con formas anulares con una parasitemia del 12% y fijados con glutaraldehído. La densidad óptica utilizada para la lectura de las pruebas de ELISA fue 490 nm y se consideró positiva por encima de 0.2. Todos los sueros fueron negativos en los ensayos anti-NANP. Las pruebas de linfoproliferación se efectuaron con células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y sólo los índices de estimulación por encima de 5.0 fueron consideradas positivas. ND, No determinado; PI, Preimmune; PR, Prereto.

celentes. El cuarto voluntario (D.A.) tenía parasitemia menor de 0.45% el día 10 y decidió abandonar el estudio recibiendo pronta quimioterapia. El quinto (J.C.) desarrollo una parasitemia similar a la del grupo control (Tabla 4).

Los síntomas clínicos de la malaria (fiebre, dolor de cabeza y náusea) estuvieron presentes en todos los voluntarios infectados con el parásito. Es interesante mencionar que los síntomas aparecieron más pronto en los individuos protegidos que en los controles y los naive (Día 6). Pequeños cambios clínicos o de laboratorio fueron

observados en todos los voluntarios pero retornaron a niveles normales después de la quimioterapia. Ninguno de los vacunados desarrolló enfermedad severa y por lo tanto no requirieron ninguna forma de cuidado especial o intensivo.

Hay varios hechos que vale la pena recalcar en el presente estudio: Utilizamos moléculas sintéticas híbridas que contienen epitopes de diferentes estadios infecciosos del parásito. Esta estrategia puede ser utilizada en el futuro para el diseño de vacunas con epitopes de múltiples patógenos. Los epitopes fueron polimerizados para formar gran-

TABLA No. 4

Desarrollo de Parasitemia postreto en los vacunados														
Porcentaje de parasitemia después del reto														
	5		6		7		8		9		10		11	
	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.
SPf(66) ₃₀														
W.B.	0	0	0	0	0.002	0.007	0	0	0	0	0	0	0	0
W.G.	0.015	0.036	0.040	0.002	0.440	0.289	0.020	0	0.171	0.368	0.019	0.006	0.190	0.120
L.C.	0	0.034	0.008	0	0.052	0.142	0.030	0.002	0.214	0.465	0.011	0.006	0.051	0.175
D.A.	0.006	0.010	0.028	0.011	0.410	0.400	0.066	0.007	0.288	0	0.014			
J.C.	0	0.006	0.007	0	0.002	0.171	0.183	0.002	0.078	2.150				
SPf(105) ₂₀														
H.A.	0	0.005	0.02	0	0.016	0.103	0.118	0.004	0.330	0.236	0.092	0.027	0.022	0.660
J.S.	0.010	0.180	0.025	0	0.002	0.220	0.013	0.005	0.603	0.660	0.011	0.02	0.384	0.420
E.O.	0	0.006	0.002	0.004	0.015	0.112	0.100	0.005	1.200					
H.B.	0.002	0.100	0.054	0.002	0.110	0.400	0.460	0.008	2.120					
Controles														
A.C.	0	0.032	0.022	0.007	0.016	0.270	0.150	0	0.115	1.600				
J.D.	0	0.033	0.026	0.005	0.008	0.870	0.780	0.017	4.260					
C.B.	0	0.120	0.072	0	0.300	2.300								
J.E.	0.008	0.100	0.115	0.010	1.700	1.700	3.600							
	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.	a.m.	p.m.								
SPf(66) ₃₀														
W.B.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W.G.	0.015	0.166	0.292	0.094	0.075	0.072	0.001	0	0.020	0.030	0	0.020	0	0
L.C.	0.130	0.013	0.120	0.242	0.060	N.D.	0.02	0.064	0	0	0	0	0	0
SPf(105) ₂₀														
H.A.	0.110	0.180	0.486	0.500	0.354	0.675								
J.S.	0.06	0.190	1.050											

Grupo 2 (W.B., W.G. y L.C.) recibieron la segunda de las dos dosis de SPf(66)30 80 días antes del reto. Grupo 1 (D.A. y J.C.) recibieron la última de las tres dosis de SPf(66)30 60 días antes del reto, así como los individuos vacunados con SPf(105)20 o solución salina. El día del reto los voluntarios fueron inoculados intravenosamente con una cepa salvaje Colombiana de *P. falciparum*, con resistencia grado I a cloroquina y completa sensibilidad a sulfadoxina y pirimetamina. Los eritrocitos infectados fueron obtenidos de un voluntario no inmunizado (EG) previamente inoculado con la cepa que se había mantenido congelada. Este donador de grupo sanguíneo O+ fue compatible con todos los receptores y con excelentes condiciones médicas, clínicas y de laboratorio adicionalmente todas sus pruebas serológicas fueron negativas. El inoculo infectante fue de 1 millón de eritrocitos infectados con formas anulares diluidos en solución salina estéril en un volumen final de 4 cc. La parasitemia fue monitorizada después del tercer día mediante extendidos de sangre periférica, gota gruesa y examen en fresco tenidos mediante las técnicas de Giemsa, Field y Naranja de Acridina respectivamente; estas muestras fueron tomadas cada 12 horas y los resultados comunicados a los voluntarios por el cuerpo médico para que éstos se sintieran libres de continuar o retirarse de la investigación. Los voluntarios con parasitemias superior a 0.5% recibieron pirimetamina. Debido a su excelente condición clínica tres voluntarios (H.A., J.S., y J.D.) con parasitemias levemente superiores a 0.5% no fueron tratados por 24 a 80 horas. Durante este tiempo estos voluntarios mostraron control parcial de la parasitemia.

des proteínas sintéticas conteniendo varios epítopes, siendo estas altamente inmunogénicas sin recurrir al uso de transportadores (16,17). Las proteínas sintéticas fueron utilizadas sin inmunopotenciadores especiales, la adición de tales inmunomoduladores puede incrementar aún más sus capacidades protectivas. Sorpresivamente, sin embargo, no hubo correlación entre los diferentes parámetros inmunológicos humorales y celulares medidos y la protección antimalárica observada.

Un retardo considerable en el proceso infeccioso se observó en la mitad de los individuos vacunados con SPf(105)20. Debido a su diseño, esta molécula puede ser efectiva también contra el reto con esporozoitos. El SPf(66)30 proporcionó una fuerte protección en la mayoría de los voluntarios vacunados, aún en aquellos que sólo recibieron dos dosis, sugiriendo que con adyuvantes más potentes o formulación ligeramente mejorada el efecto protectorio pudiera ser casi completo.

Se han obtenido resultados promisorios mediante vacunación con la proteína CS (18,19) al igual que con PF155/RESA y otras moléculas (13). La proteína híbrida polimérica sintética SPf(66)30 utilizada aquí es la primera vacuna sintética para uso en humanos contra los estadios asexuales sanguíneos de malaria por *Plasmodium falciparum*.

Bibliografía

1. BALLOW, W.R. et al. Science 228: 996-999 (1985).
2. COWMAN, A. F. et al. Cell 40: 75-80 (1985).
3. PERRIN, L.H. et al. J. Clin. Invest. 75: 1718-1721 (1985).
4. ZAVALA, F. et al. Science 228: 1436-1440 (1985).
5. HEIDRICH, H. G. et al. Z. Parasitenk. 69: 715-725 (1983).
6. PATARROYO, M.E. et al. in Vaccines 87. (eds. Chanock, R. M., Lerner, R. A., Brown, E. and Ginsberg, H.) 117-124 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1987).
7. PERLMANN, H. K., J. Exp. Med. 159: 1686-1704 (1984).
8. COWMAN, A. F. et al. Mol. Bio. Med. 2: 207-221 (1984).
9. HOLDER, A.A. et al. Nature 317: 270-273 (1985).
10. MACKAY M. et al. EMBO J. 4: 3823-3829 (1985).
11. PATARROYO M.E. et al. Nature 328: 629-632 (1987).
12. GOOD, M. F. et al. Science 235: 1059-1062 (1987).
13. COLLINS, W.E. et al. Nature: 323: 259-262 (1986).
14. W.H.O. International Digest of Health Legislation 36: 825-829 (1985).
15. T.D.R. Document TDR/IMMAL/FIELDMAL/VAC 85.3.
16. HERSENBERG, H. and TUKUHISA, T. J. Exp. Med. 155: 1730-1740 (1982).
17. BALLOW, W.R. et al. Lancet i, 1277-1281 (1987).
18. HERRINGTON, D. A. et al. Nature 328: 257-259 (1987).
19. BARANY, G. and MERRIFIELD, R. B. The peptides (eds. Gross, E. and Meinhofer, J.) 2: 1-284 (Academic Press, New York, 1980).
20. PATARROYO M.E. et al. Nature 332: 158-161 (1988).