



HAL
open science

Développement clinique d'un vaccin antipaludique de stade sanguin et diversité antigénique de Plasmodium Falciparum à Bandiagara, Mali

Mahamadou Ali Théra

► **To cite this version:**

Mahamadou Ali Théra. Développement clinique d'un vaccin antipaludique de stade sanguin et diversité antigénique de Plasmodium Falciparum à Bandiagara, Mali. Microbiologie et Parasitologie. Institut Supérieur de Formation et de Recherche Appliquée, ISFRA-USJPB, Bamako- Mali, 2015. Français. NNT: . tel-01531585

HAL Id: tel-01531585

<https://theses.hal.science/tel-01531585>

Submitted on 1 Jun 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - ShareAlike 4.0 International License

INSTITUT SUPERIEUR DE FORMATION
ET DE LA RECHERCHE APPLIQUEE (ISFRA)
BAMAKO, MALI

Année Universitaire : 2014-2015

N° _____

**DOCTORAT D'UNIVERSITE DE L'INSTITUT SUPERIEUR DE
FORMATION ET DE LA RECHERCHE APPLIQUEE (ISFRA)**
OPTION : Parasitologie et Entomologie Médicales

THEME

Développement Clinique d'un Vaccin Antipaludique de
Stade Sanguin et Diversité Antigénique
de *Plasmodium falciparum* à Bandiagara, Mali

Thèse présentée et soutenue publiquement le **15 avril 2015**

devant le jury de l'ISFRA

Par Mr. Mahamadou Ali THERA

JURY

Président : Pr Oumar GAYE
Directeur : Pr Ogobara K DOUMBO
Rapporteurs: Pr Renaud PIARROUX
Pr Hamar A TRAORE
Examineurs: Pr Abdoulaye DABO
Pr Hubert BALIQUE

REMERCIEMENTS

Ma profonde reconnaissance et mes sincères et chaleureux remerciements aux personnes et groupes de personnes suivantes, sans lesquelles ce travail, fruit d'un véritable effort collectif n'aurait vu le jour :

- Prof Ogobara Doumbo, pour la rigueur scientifique, la clarté de la vision et l'appui constant dans la mise en œuvre ;
- Prof Dapa Diallo, pour la rigueur scientifique et les conseils éclairés ;
- A l'équipe Clinique BMP : soldats infatigables et dévoués à la lutte quotidienne contre le paludisme et aux progrès de la recherche: soyez infiniment remerciés pour l'extraordinaire esprit d'équipe et la productivité ;
- Aux équipes du Laboratoire Clinique de Bandiagara Malaria Project (BMP), du Laboratoire d'Immunologie et du Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Résistance aux Antipaludiques du Malaria Research and Training Center (MRTC), pour l'appui et le travail de qualité ;
- A la population de Bandiagara et aux Thérapeutes Traditionnels pour leur ouverture d'esprit, leur disponibilité et leur hospitalité ;
- Aux partenaires américains, en particulier au Pr Chris Plowe et à l'ensemble du Groupe Malaria du Center for Vaccine Development (CVD) de l'Université de Maryland, pour le mentoring éclairé, l'appui constant et de qualité, la richesse du réseau de partenaires ;
- Aux partenaires techniques et financiers: le WRAIR sous le leadership de Gray D Heppner, GSK-Bio sous le leadership de Nadia Tornieporth et d'Amanda Leach pour la partie Clinique et de Joe Cohen pour la partie biologie, USAID sous le leadership de Carter Diggs et de Lorraine Soisson, DoD, NIAID, dont les deux composantes *Intramuros* et *Extramuros* ont collaboré dans une entente exceptionnelle à bâtir les capacités du MRTC et au site de Bandiagara pour la conduite d'essais vaccinaux
- A ma famille tant chérie, qui m'a permis d'avoir la persévérance nécessaire et dont le soutien moral inconditionnel malgré mes absences innombrables, ne m'a jamais manqué ;

Aux membres du Jury,
Professeur Omar Gaye
Professeur Renaud Piarrroux
Professeur Hamar A Traore
Professeur Abdoulaye Dabo
Professeur Hubert Balique
Pr Ogobara K Doumbo

Veillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance, mes remerciements sincères et l'assurance de mon profond respect, pour avoir consacré au jugement de ce travail, une partie de votre temps si précieux.

ABBREVIATIONS

- AS02_A : Adjuvant System 02_A
- AUC : Area Under the Curve (en français, Aire sous la courbe, ASC)
- BMP : Bandiagara Malaria Project
- CVD : Center for Vaccine Development
- DDT : Dichloro-Diphényle-Trichloroéthane
- DEAP : Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires
- DMID : Division of Microbiology and Infectious Diseases
- DoD : Department of Defense (Ministère de la Défense des Etats-Unis d'Amérique)
- EIs : Evènements Indésirables
- FMPOS : Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie
- GSK-Bio : GlaxoSmithKline Biologicals
- MPL : Monophosphoryle lipide
- MRTC : Malaria Research and Training Center
- NIAID : National Institute of Allergy and Infectious Diseases
- NIH : National Institutes of Health
- OMS: Organisation Mondiale de la Santé
- OR : Odds Ratio (en français, Rapport des côtes)
- PDP : Plan de Développement Clinique du Produit
- PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme
- QS21 : *Quillaja saponaria 21*
- RR : Risque Relatif
- TDR : Tropical Disease Research (Programme Spécial de l'OMS, de Formation et de Recherche sur les Maladies Tropicales)
- USAID : United States Agency for International Development
- WRAIR : Walter Reed Army Institute of Research

RÉSUMÉ

Un vaccin efficace contre le paludisme constitue un outil puissant dans la lutte contre ce fléau. L'antigène 1 de la membrane apicale du mérozoïte, AMA1 est une protéine indispensable à la biologie du parasite qui a été associé à l'inhibition de la croissance de *P. falciparum in vitro*. Les anticorps anti-AMA1 ont aussi été corrélés à la protection contre le paludisme clinique dans les études séro épidémiologiques en Afrique. La protéine AMA1 de la souche 3D7 a été exprimée dans *Escherichia coli* et associée à l'adjuvant AS02A, pour constituer le vaccin candidat dénommé FMP2.1/AS02A. Nous avons réalisé le développement clinique de FMP2.1/AS02A en testant l'hypothèse de son innocuité et de sa capacité à protéger les enfants âgés de moins de 5 ans à Bandiagara contre l'épisode clinique de paludisme, dans un contexte de polymorphisme antigénique majeur.

Nous avons réalisé une séquence logique d'essais vaccinaux à Bandiagara d'abord chez les adultes, puis dans la population pédiatrique cible du vaccin candidat. Dans un essai de phase 1b portant sur l'adulte, nous avons montré que la demi dose (0,25µg dans 0,25ml d'AS02A) du produit FMP2.1/AS02A ainsi que sa dose complète (0,5µg dans 0,5ml d'AS02A) ont été bien tolérées et ont induit une production importante et significative d'anticorps anti-AMA1 de type IgG, après trois administrations espacées d'un mois. Les anticorps des sujets vaccinés ont montré au test *in vitro* d'inhibition de la croissance des parasites, une activité inhibitrice significative de la souche 3D7 mais aussi de la souche FVO.

L'étude de phase 1b dans la population pédiatrique avec sélection de dose a permis d'évaluer la tolérance et l'immunogénicité de trois doses du produit (10µg d'antigène dans 0,1ml d'AS02A, 25µg d'antigène dans 0,25ml d'AS02A, et 50µg d'antigène dans 0,5ml d'AS02A), administrées en trois prises espacées d'environ un mois. Trois cohortes ont été constituées correspondant chacune à une dose sélectionnée du produit. Les enfants ont été inclus et suivis pendant 12 mois. Le taux de maintien dans l'étude était de 96% après 12 mois. Le vaccin candidat a été bien toléré dans cette population d'enfants. Au niveau local, les douleurs et les œdèmes au site d'injection étaient plus fréquents dans les trois groupes ayant reçu le vaccin candidat FMP2.1/AS02A que dans celui du vaccin antirabique. Les œdèmes de grade 3 observés au site d'injection étaient plus fréquents dans le groupe ayant reçu 50µg/50ml de FMP2.1/AS02A et ils étaient aussi associés à la douleur de grade 1 ou 2. La fréquence des EIs locaux a diminué progressivement au cours des vaccinations suivantes. Ces EIs locaux ont été temporaires et ont disparu dans les 7 jours suivant la vaccination. La fièvre était l'EI général le

plus fréquemment rapporté. Sa fréquence était plus élevée dans la cohorte 2. Tous les EIs généraux observés étaient de grade 1 ou 2 et ont été résolus dans les 7 jours suivant la vaccination. Toutes les doses de FMP2.1/AS02A ont induit une forte et durable augmentation du taux des IgG totaux (100 fois plus que le niveau de base) comparé avec les taux des IgG dans le groupe témoin. De la sorte, le taux des IgG observé chez les enfants était comparable ou supérieur à celui des adultes.

L'essai pédiatrique de phase 1b a permis d'initier l'essai pédiatrique pivot de phase 2b. Quatre cent enfants ont été inclus et suivis pendant 24 mois. Les enfants ont été randomisés dans un ratio 1:1 pour recevoir FMP2.1/AS02A, 50µg d'antigène associé à 0,5ml d'adjuvant ou le vaccin témoin antirabique. L'analyse intérimaire au Jour 240 d'étude a montré selon le critère de jugement primaire, une incidence cumulée du paludisme de 48,4% dans le groupe FMP2.1/AS02A et de 54,4% dans le groupe témoin. L'efficacité brute du candidat vaccin, estimée par la régression de Cox était de 17,4% pour un risque ratio du critère de jugement primaire de 0,83 IC à 95% [0,63-1.09], $p=0,18$. Vingt deux épisodes cliniques causés par des parasites ayant l'haplotype 3D7 au niveau du groupe c1L ont été observés: 16 épisodes sont survenus dans le groupe témoin montrant une efficacité contre AMA1 3D7 au niveau c1L de 64,3%. Le risque ratio de l'incidence spécifique d'allèle dans le groupe FMP2.1/AS02A vs. le groupe antirabique était de 0,36 IC à 95% [0,08-0.86], $p=0,03$. L'efficacité contre les épisodes multiples de paludisme était de 20%; RR= 0,80 IC à 95% [0,36 - 1,02]. Le vaccin a par ailleurs réduit la densité parasitaire. En analyse en Intention de Traiter (ITT), la médiane cumulée des aires sous la courbe (ASC) individuels était de 168,600 parasites par mm³ dans le groupe FMP2.1/AS02A et de 376,900 parasites par mm³ dans le groupe antirabique, $p=0,01$. En analyse conforme au protocole (ATP), la médiane cumulée des ASC était de 97,700 parasites par mm³ dans le groupe FMP2.1/AS02A et de 308,600 parasites par mm³ dans le groupe antirabique, $p=0,01$. Une bonne tolérance et une réactogénicité locale acceptable comparables à celles des essais précédents ont été observées. Un mois après l'administration de la première dose de FMP2.1/AS02A, le titre des IgG anti-AMA1 a été multiplié par 54 chez les enfants, puis par 479 comparé au niveau de base, 30 jours après la troisième vaccination. Mais, en dépit de cette forte production d'IgG, ni le titre des anticorps de base, ni le taux maximal d'IgG n'étaient associés à la protection contre le paludisme.

Le vaccin candidat FMP2.1/AS02A est la première démonstration du concept d'efficacité clinique d'un vaccin de stade sanguin contre le paludisme maladie à *P. falciparum* chez l'enfant vivant en zone d'endémie palustre. La protection induite a été spécifique de souche.

La restriction de la protection aux parasites appartenant à la souche dont dérive l'antigène, limite le développement clinique ultérieur de ce candidat. Toutefois nos travaux ouvrent la voie à la recherche des vaccins de stades sanguins. La compréhension et la prise en compte de la diversité antigénique de *P. falciparum* permettront d'avancer plus rapidement et plus sûrement vers un vaccin antipaludique efficace.

SUMMARY

An effective malaria vaccine will be a powerful tool in the fight against this scourge. The apical membrane antigen 1 of the merozoite, AMA1 is a protein essential to parasite biology and was associated with parasite growth inhibition *in vitro*. Anti-AMA1 antibodies have also been correlated with protection against clinical malaria in sero epidemiological studies in Africa. Expressed in *Escherichia coli* and in combination with the adjuvant AS02A, the AMA1 antigen derived from strain 3D7, constitute the malaria vaccine candidate FMP2.1/AS02A. We undertook the clinical development of FMP2.1/AS02A and tested the hypothesis of its safety and ability to protect children aged less than 5 years against clinical malaria, in a context of major antigenic diversity in Bandiagara.

We conducted a logical sequence of vaccine trials in Bandiagara beginning with the adult population, before reaching the target pediatric population. In a Phase 1b trial that enrolled adults, we showed that the product half-dose (0.25µg in 0.25ml of AS02A) and its full dose (0.5µg in 0.5ml of AS02A) were well tolerated and induced an important and significant production of anti-AMA1 IgG antibodies after three administrations one month apart. Antibodies induced showed a significant inhibitory activity of the 3D7 strain but also of the FVO strain when *in vitro* Growth Inhibition assay was performed.

Then we conducted the first study of FMP2.1/AS02A in a pediatric population. This was a Phase 1b study with dose selection in which we evaluated the safety and immunogenicity of three doses of the product (10µg antigen in 0.1ml of AS02A, 25µg antigen in 0.25ml of AS02A and 50µg antigen in 0.5ml of AS02A) administered in three doses. Three cohorts were formed each corresponding to a level of the product dose. Children were included and followed for 12 months. Retention rate in the study was 96% after 12 months. The candidate vaccine was well tolerated. Pain and swelling at the injection site were the most common local Adverse Events (AEs) reported in the three malaria vaccine dose groups as compared with the control rabies vaccine group. Grade 3 injection site swelling were more common in the FMP2.1/AS02A high-dose group and were often associated with grade 1 or 2 local pain. The frequency of local AEs tended to decrease in all groups after following vaccinations. These local AEs were all temporary and resolved within 7 days after vaccination. Fever was the most frequently reported general AEs. Its proportion was highest in cohort 2. All general AEs were of grade 1 or 2 intensity and all resolved within 7 days after vaccination. All FMP2.1/AS02A doses induced a strong and sustained increase in total IgG levels in

comparison with the level in the control group and also in comparison with the low baseline levels determined at the beginning of study. FMP2.1/AS02A recipients showed a 100-fold increase in IgG levels when compared to baseline. These children IgG levels were increased to levels comparable or higher than levels observed in adults.

The Phase 1b pediatric trial allowed to initiate the pediatric pivotal Phase 2b trial. Four hundred children were included and followed for 24 months. Children were randomized in a 1: 1 ratio to receive FMP2.1/AS02A, 50µg antigen associated with 0.5ml of adjuvant or rabies control vaccine. An interim analysis was planned and done at study Day 240. It showed a cumulative incidence of malaria as defined by the primary endpoint of 48.4% in the FMP2.1/AS02A group and 54.4% in the control group. This gives an unadjusted protective efficacy estimated by Cox regression equal to 17.4%; risk ratio of the primary endpoint was 0.83, 95% CI [0,63-1.09], $p = 0.18$. Twenty two clinical episodes with parasites harboring the c1L 3D7 haplotype were counted: 16 occurred in the control group showing a protective efficacy against AMA1 c1L 3D7 of 64.3%, yielding a risk ratio of allele specific malaria of 0.36 95% CI [0,08-0.86], $p = 0.03$ in the FMP2.1/AS02A group vs. the rabies control group. The efficacy against multiple malaria episodes was 20%, risk ratio 0.80, 95% CI [0.36 to 1.02]. The vaccine reduced parasite density: the cumulative median individual AUC was 168.600 parasites per mm³ in the FMP2.1/AS02A group and 376.900 parasites per mm³ in the rabies group, $p = 0.01$. According to protocol analysis showed that the cumulative median AUC was 97.700 parasites per mm³ in the FMP2.1/AS02A group and 308.600 parasites per mm³ in the rabies group, $p = 0.01$. The safety profile was similar to that seen in previous trials, *i.e.*, good tolerance and acceptable local reactogenicity. In the FMP2.1/AS02A group anti-AMA1 IgG antibodies titers increased by a magnitude of 54 times a month after the first dose, peaking at a level of 479 times the baseline level 30 days after the third vaccination. However, this high antibody production was not associated with protection against clinical malaria.

The FMP2.1/AS02A malaria vaccine candidate is the first to demonstrate the concept of clinical efficacy of a blood stage malaria vaccine in children living in endemic malaria area. Protection was strain specific. Restricting protection to parasites belonging to the strain from which the vaccine antigen was derived, limit the further clinical development of this candidate. However, our work opens the way for research of the blood stages of vaccines. Understanding and recognition of *P. falciparum* antigenic diversity and its impact will help advance more quickly and surely toward an effective malaria vaccine.

Table des matières

REMERCIEMENTS	2
ABBREVIATIONS.....	4
RÉSUMÉ.....	5
SUMMARY	8
1 Introduction	11
2 Généralités sur le paludisme	16
2.1 Problématique du paludisme	16
2.2 Historique des efforts pour un vaccin antipaludique (1940-2013).....	23
2.3 Cycle biologique de <i>Plasmodium falciparum</i> et candidats vaccins	34
2.4 Méthodes d'analyse de la diversité antigénique d'AMA1.....	49
2.5 Développement clinique d'un vaccin antipaludique	55
2.5.1 Les essais de Phase I.....	56
2.5.2 Les essais de Phase II.....	56
2.5.3 Les essais de Phase III	56
2.5.4 Les essais de phase IV.....	56
2.5.5 Les conditions de réalisation des essais cliniques	57
2.5.6 Les Bonnes Pratiques Cliniques (BPCs).....	57
2.5.7 Les considérations éthiques	59
2.5.8 Eléments de préparation des sites	60
2.5.9 La formation du personnel	60
2.5.10 Le réseau de partenaires	60
2.5.11 La communauté comme partenaire	61
2.5.12 Les ressources matérielles	62
3 Nos travaux: matériel et méthodes	63
3.1 Description du site d'étude de Bandiagara.....	63
3.1.1 Contexte et justification du choix	63
3.1.2 Historique, population, système de santé et caractéristiques épidémiologiques	63
3.1.3 Projet BMP et préparation du site	64
3.1.4 Carte détaillée/GIS.....	65
3.1.5 Apport personnel de l'impétrant.....	67
3.2 Matériel et méthode par phases pour le vaccin candidat FMP2.1/AS02 _A	68
3.2.1 Essai clinique contrôlé randomisé en double aveugle de phase 1 chez l'adulte	68
3.2.2 Essai clinique contrôlé et randomisé en double aveugle de phase 1b chez l'enfant.....	70
3.2.3 Essai clinique contrôlé et randomisé en double aveugle de phase 2b chez l'enfant.....	73
4 Résultats des essais cliniques à Bandiagara.	80
4.1 Essai clinique contrôlé randomisé de phase 1b chez l'adulte	80
4.2 Essai clinique contrôlé et randomisé de phase 1b chez l'enfant	93
4.3 Essai clinique contrôlé et randomisé de phase 2b chez l'enfant	107
4.4 Le bout du tunnel de la recherche du vaccin antipaludique?.....	119
5 Discussion des Résultats, Perspectives et Analyse du développement des vaccins antipaludiques.....	134
6 Autres articles de l'impétrant en relation avec le thème.....	137
7 Conclusion.....	138
8 Références	139

1 Introduction

Le paludisme reste encore de nos jours la première des affections parasitaires par la charge de morbidité et de mortalité qu'il impose plus particulièrement aux populations africaines vivant au sud du Sahara. Des estimations plus récentes ont montré le caractère optimiste et incomplet de celle donnée par l'OMS dans son rapport de 2011 (1) en indiquant un taux de mortalité double, d'environ 1 230 000 décès par an (2). Dans les deux estimations toutefois, une réduction des cas cliniques et des décès liés au paludisme est notée au cours des dix dernières années, traduisant l'efficacité des mesures de lutte disponibles.

En 2007, sous l'impulsion de Bill et de Melinda Gates, la communauté internationale s'est engagée dans la voie de l'élimination et de l'éradication du paludisme de la surface de la terre (<http://www.gatesfoundation.org/media-center/speeches/2007/10/bill-gates-malaria-forum>). Un vent d'optimisme a soufflé, soutenu par l'OMS et basé essentiellement sur l'annonce de l'efficacité dans le Lancet d'un vaccin de stade pré érythrocytaire, dénommé RTS,S (3). Développé par la firme GlaxoSmithKline Biologicals (GSK-Bio) en association avec l'adjuvant AS02A, cet antigène a induit dans un essai clinique de phase 2 chez les enfants âgés de 1-14 ans au Mozambique un prolongement du temps au premier épisode clinique de paludisme simple traduisant une efficacité contre le paludisme simple de 29.9% (IC à 95% 11,0-44,8; p=0,004). En plus le vaccin a induit une protection de 57.7% (95% CI 16.2-80.6; p=0.019) contre le paludisme grave (3). Avec l'efficacité reconnue des Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTAs) et des moustiquaires imprégnées d'insecticides de longue durée (MILDs), ces résultats rendaient à portée de main l'atteinte de l'objectif d'élimination du paludisme. Un agenda pour l'éradication du paludisme a été alors, élaboré, malERA pour « malaria eradication agenda » (4-12). L'initiative malERA a mobilisé l'essentiel des expertises africaines, européennes, américaines et asiatiques pour réfléchir sur les stratégies de lutte et les axes de recherche prioritaires qui pourraient conduire à l'élimination et aller vers l'éradication. Dans ce contexte, le vaccin antipaludique apparaît comme l'outil qui permettra d'éliminer voire éradiquer le paludisme en s'intégrant harmonieusement aux autres stratégies.

L'histoire de la recherche du vaccin antipaludique est riche en rebondissements, espoirs, déceptions et découvertes. Les expériences sur le modèle murin des années 60s ont montré que l'immunisation avec *P. berghei* atténué par irradiation aux rayons X conférait une protection stérile aux animaux immunisés (13). Ces études ont ouvert la voie à la recherche du

vaccin antipaludique. A la suite de ces travaux, plusieurs auteurs ont utilisé le modèle du sporozoïte entier atténué par irradiation chez l'homme, démontrant l'efficacité de cette approche à induire une protection complète chez les personnes immunisées (14;15). Puis les efforts ont porté sur l'identification des antigènes parasitaires cibles de la protection observée. La protéine de surface du sporozoïte, la Circum Sporozoïte (CS) s'est distinguée comme un antigène prometteur. Certains essais cliniques ont été réalisés dans les années 80s (16). Toutefois l'absence de protection a constitué un handicap bloquant. Depuis, le domaine de la recherche du vaccin antipaludique était resté dormant, comme si les chercheurs étaient tétanisés par l'ampleur de la tâche.

A la fin des années 80s, une équipe colombienne dirigée par Manuel Patarroyo a mis au point un cocktail synthétique de peptides correspondant à des antigènes parasitaires de stade sanguin et la région répétitive NANP de la CS servant de lien entre les peptides (17;18). Ce produit dénommé SPf66, a été validé dans le modèle primate, *Aotus*, comme potentiel vaccin antipaludique. SPf66 a fait l'objet d'un développement clinique qui a inclus plus de 9600 participants en Amérique du Sud, en Afrique et en Asie du Sud-est (19)). SPf66 a été bien toléré et a induit une réponse immunitaire significative chez les sujets vaccinés. En Amérique Latine SPf66 a réduit de 28% [RR=0,72 ; IC à 95% 0,63-0,83] l'incidence du premier épisode clinique de paludisme simple à *P. falciparum*. En Asie (20) et en Afrique (21;22) le vaccin candidat n'a pas fait preuve d'efficacité. L'échec de SPf66 en Afrique où la charge de morbidité liée au paludisme à *P. falciparum* est la plus élevée au monde, a renforcé les doutes sur la possibilité de mettre au point un vaccin antipaludique efficace. Toutefois le développement clinique de SPf66 a permis de mûrir la réflexion sur les modalités pratiques d'évaluation d'un vaccin contre le paludisme. Plusieurs contributions dans la méthodologie des essais cliniques de vaccins antipaludiques ont préparé la voie à l'évaluation de meilleurs candidats.

Vers la même période dans un laboratoire à Rixensart, Belgique, Joe Cohen et ses collaborateurs tentaient l'expérience d'exprimer une partie de la CS en fusion avec le virus recombinant de l'hépatite B, en utilisant une technique de génie génétique à la base du vaccin contre l'hépatite B de la firme SmithKline Beecham. Ces chercheurs ont obtenu une protéine qui forme naturellement des particules, RTS,S. Cette protéine recombinante a été associée à un adjuvant puissant à base de MPL et de QS21 pour constituer le candidat vaccin RTS,S/ASX. AS signifie Adjuvant System, dénommant une famille d'adjuvants développés par GlaxoSmithKline Biologicals. X représente une variable qui a eu plusieurs valeurs dont

nous retenons 02_A, 02_D, puis 01, traduisant les différentes formulations de l'adjuvant. RTS,S/ASX a fait l'objet de plusieurs essais cliniques de phase 1 et 2 (23). Le profil global de tolérance du produit après son administration à plusieurs milliers d'individus est décrit dans la littérature comme acceptable (23). RTS,S/ASX a montré une impressionnante protection contre le premier épisode clinique de paludisme simple variant selon les études de 30 à 50% (24-26). Dans certaines études l'effet protecteur du produit contre le paludisme grave était de 50% (23). Depuis 2009, un partenariat international pour le développement clinique de RTS,S/AS01, a entrepris avec GSK-Bio un essai clinique pivot couvrant 11 institutions dans 9 pays d'Afrique, et ayant inclus plus de 15 000 enfants (24;25). Les résultats préliminaires sont encourageants et les résultats définitifs de cette large étude d'efficacité sont attendus en début 2015.

Si RTS,S/ASX a suscité beaucoup d'espoirs, il reste cependant une étape intermédiaire vers l'atteinte d'un vaccin dont le niveau de protection sera d'au moins 80% contre les formes cliniques du paludisme. L'effort de recherche d'un vaccin contre le paludisme demeure une question d'une brûlante actualité.

Les obstacles aussi demeurent nombreux. La complexité du parasite dont le génome haploïde de 14 chromosomes partiellement décrypté en 2002 (27), comprend plus de 5000 gènes, la complexité de sa biologie et de son interaction avec l'hôte humain et le moustique vecteur contribuent aux difficultés.

Différentes approches vaccinales ciblent le parasite à différentes étapes de son cycle biologique en fonction des antigènes candidats au vaccin. Nous avons travaillé sur le stade sanguin qui est responsable des signes cliniques, et par conséquent de la morbidité, des séquelles neurologiques et de la mortalité liée au paludisme.

La protéine AMA1, « Apical Membrane Antigen 1 » pour antigène 1 de la membrane apicale a été décrite en 1989 (28). Elle est localisée au niveau du complexe apical et joue un rôle dans l'invasion du globule rouge par le mérozoïte. Les études *in vitro* ont montré que les anticorps anti-AMA1 inhibent l'invasion des globules rouges (29). Dans le modèle primate non humain, les anticorps anti-AMA1 ont protégé les singes Rhésus contre l'épreuve d'infection à *P. knowlesi* (30). Ensuite la protéine recombinante exprimée dans *Pichia pastoris* ou *Escherichia coli*, a induit dans le modèle murin des anticorps anti-AMA1 protecteur contre le paludisme de la souris (31). Ces arguments précliniques ont constitué la justification

principale du développement clinique des vaccins à base d'AMA1. Différentes études séro-épidémiologiques ont par la suite montré une association entre un titre élevé en anticorps anti-AMA1 et la protection de l'homme contre le paludisme à *Plasmodium falciparum* (32;33). Différentes formulations d'AMA1 ont été développées et testées par différentes équipes de recherche en phase préclinique dans différents modèles, et chez l'homme en essais cliniques .

Le stade intra érythrocytaire est responsable d'une immunité anti-toxine et anti-maladie et présente une extraordinaire plasticité antigénique. A ce stade le parasite exprime des antigènes exposés au système immunitaire. De ce fait ces antigènes sont le siège d'une diversité génétique et expriment une variation antigénique importante. La pression antigénique sur le système immunitaire d'*Homo sapiens*, résulte d'une coévolution homme-parasite depuis au moins 8000 ans (34). Cette diversité antigénique a été interprétée comme un mécanisme d'adaptation et d'échappement du parasite. La diversité antigénique entraînerait une réponse immunitaire forte, suscitant un « nuage immunologique » (35) souvent pathogène pour l'hôte humain.

Même si la diversité antigénique pose le problème de l'efficacité d'un vaccin de stade sanguin qui soit spécifique à un allèle, les antigènes de stade sanguin présentent un potentiel intéressant comme candidat vaccin antipaludique. Notre travail s'inscrit dans le cadre du développement clinique d'un vaccin de stade sanguin contre le paludisme. Notre objectif principal était de tester l'innocuité, l'immunogénicité et l'efficacité au Mali d'un candidat vaccin à base d'AMA1 associé à l'adjuvant AS02A. Dans le contexte de la diversité génétique que nous avons décrit au niveau de l'antigène parasitaire AMA1 à Bandiagara (36), nous nous sommes posés les questions de recherche suivantes :

- Quelle est la tolérance, l'immunogénicité et l'efficacité d'un vaccin de stade sanguin dérivé de la protéine AMA1 dans la population de Bandiagara?
- Quel impact aura la diversité génétique d'AMA1 sur l'effet d'un vaccin basé sur AMA1?

Nous formulons l'hypothèse que notre candidat vaccin serait bien toléré dans la population cible à Bandiagara et qu'une réponse immunitaire suffisante sera induite. Cela pourrait se traduire par une efficacité protectrice contre le paludisme (parasitémie asymptomatique, paludisme simple, anémie, forme graves). Nous vérifierons par la suite si

l'extrême diversité génétique d'AMA1 est un obstacle ou s'il y a une protection croisée entre différentes allèles. Notre travail est présenté selon le plan ci-après:

- 1- Introduction
- 2- Généralités sur le paludisme
 - 2.1- Rappel sur la problématique épidémiologique du paludisme
 - 2.2- Rappel historique du développement des vaccins antipaludiques de 1940-2013
 - 2.3- Cycle biologique de *Plasmodium falciparum*, différents antigènes exprimés et différents candidats vaccins
 - 2.4- Méthodes d'analyse de la diversité antigénique : cas particulier de la protéine AMA1
 - 2.5- Développement Clinique d'un vaccin antipaludique
- 3- Nos travaux: matériel et méthodes : phases des essais cliniques pour l'évaluation de l'immunogénicité, de la tolérance et de l'efficacité
- 4- Résultats
 - 4-1 Article 1 (synthèse en français et version complète originale)
 - 4-2 Article 2 (synthèse en français et version complète originale)
 - 4-3 Article 3 (synthèse en français et version complète originale)
 - 4-4 Article 4 (synthèse en français et version complète originale)
- 5- Discussion des Résultats, Perspectives et Analyse du développement des vaccins antipaludiques
- 6- Autre articles de l'impétrant
- 7- Conclusion

2 Généralités sur le paludisme

2.1 Problématique du paludisme

Le paludisme résulte de la présence et de la multiplication chez l'hôte humain des plasmodies appartenant à des espèces pouvant infecter *Homo sapiens*. Il s'agit de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium vivax*. Une cinquième espèce, parasite habituel du singe Macaque (*Macaca fascicularis* ou *M. nemestrina*), *Plasmodium knowlesi* a été incriminé dans les infections humaines (37) en Malaisie. Très récemment, une sixième espèce simienne, *Plasmodium cynomolgi* a été identifié dans une infection naturelle chez un hôte humain en Malaisie (38). En dépit de la découverte de son agent pathogène par Laveran en 1842 et de la mise en évidence du mode de transmission via les moustiques par Ross en 1882, le paludisme, essentiellement à *P. falciparum* reste une maladie endémique majeure qui exerce une charge de morbidité à nulle autre pareille sur l'homme parmi les maladies parasitaires.

L'espèce la plus dangereuse est *P. falciparum*. Elle est responsable de 300 à 500 millions de cas cliniques par an et provoque le décès de plus d'un million d'individus par an, dont 90% en Afrique au sud du Sahara. Les enfants âgés de moins de cinq ans et les femmes enceintes lui payent un lourd tribut. Toutefois, des estimations récentes montrent que les adultes non immuns (urbains, non résidents en zone d'endémie, troubles sociaux, coinfections avec le VIH) dans la population générale endémique, contribuent significativement aux décès attribuables au paludisme (Murray *et al.*, 2012) ; selon cet auteur, l'Afrique au sud du Sahara a déploré en 2010 parmi les individus âgés de 5 ans et plus, 435 000 IC 95% [307 000-658 000] décès liés au paludisme. Les individus âgés de 15-49 ans ont représenté environ 20% des décès liés au paludisme en 2010. Ces estimations récentes montrent une mortalité liée au paludisme plus forte que prévue en Afrique au sud du Sahara (2) ; mais aussi une atteinte plus importante d'autres groupes d'âges et l'impact sur la relance économique du continent.

Le paludisme exerce une charge de morbidité multiforme sur les populations des pays endémiques. Au niveau des services de santé, le paludisme constitue dans beaucoup de pays la première cause de consultation et une des principales causes d'hospitalisation. Les formes graves de paludisme constituent le gros lot des hospitalisations liées au paludisme (39); en plus, chez la femme enceinte le paludisme provoque une anémie, une augmentation du risque

de petit poids à la naissance, de naissances prématurés et d'avortements (40). Finalement plus de 25% des enfants rescapés de neuropaludisme peuvent présenter des séquelles neurologiques (41). Des séquelles cognitives sont aussi suspectées entraînant un déficit d'idéation et une lenteur des processus cognitifs chez les personnes affectées (42). Le paludisme exerce donc un impact négatif important sur la capacité économique des pays endémiques. Selon l'OMS cela représente une perte en produit national brut (PNB) de l'ordre de 2 milliards de dollars US par an pour l'ensemble des pays d'Afrique au Sud du Sahara. Sans le paludisme, ces pays auraient probablement déjà avancé de façon significative dans leur développement économique et social respectifs (43).

Au Mali, on déplore chaque année 25 000 décès par liés au paludisme (Rapport annuel PNLP, 2012). Comme dans beaucoup d'autres pays en Afrique au sud du Sahara, le système d'information sanitaire sous estime la mortalité liée au paludisme. Selon Murray *et al.*, 2012, environ 39 283 décès, IC à 95% [19 774-77 017] sont survenus en 2010 au Mali. Selon le Programme National de Lutte contre le Paludisme du Mali (Rapport annuel d'activités 2012 du PNLP), le système d'information de routine a rapporté pour l'année 2012, 1 181 127 cas de paludisme clinique présomptif et 1069 décès à l'échelle nationale. En plus des limites structurelles de sous notification de ce système, à partir de la 13^{ème} semaine la crise militaire a exclu les informations des régions du nord du Mali.

Les manifestations cliniques du paludisme résultent de la multiplication dans les globules rouges des plasmodies selon un cycle biologique qui nous révèle encore des aspects nouveaux. Le parasite sous forme de sporozoïte est injecté dans le sang chez l'homme par la piqûre de la femelle de l'anophèle, diptère culicidé et vecteur, à l'occasion d'un repas sanguin. Les sporozoïtes gagnent le système veineux porte qui les véhicule vers le foie en trente minutes – une heure. Des travaux ont montré que certains sporozoïtes restent plus longtemps au niveau des ganglions lymphatiques, constituant un premier point d'interaction avec le système immunitaire de l'hôte (44). Arrivés au niveau du foie, le sporozoïte traverse plusieurs membranes cellulaires y compris celle des cellules Küpffer et d'autres hépatocytes, pour finalement choisir un hépatocyte dans lequel le développement du parasite se poursuit (45-47). Une multiplication intense se produit formant un corps bleu. Dans le cas de *P. vivax*, certains sporozoïtes restent à l'état latent sous formes dormantes, dénommées hypnozoïtes, responsables des accès de reviviscence à distance. A maturité le corps bleu est lysé et il libère à partir de chaque sporozoïte, 20-30000 mérozoïtes. Ces mérozoïtes sont libérés en paquets sous forme d'amas nommés mérosomes qui circulent dans le sinus hépatique et arrivés au

niveau du capillaire extra hépatique, les mérozoïtes individuels sont libérés dans le torrent circulatoire. Chaque mérozoïte va envahir un érythrocyte et entamer le cycle de la schizogonie érythrocytaire. A l'intérieur de l'érythrocyte, chaque mérozoïte va former un anneau, ensuite un trophozoïte mur, puis un schizonte. A maturité l'érythrocyte infecté éclate et libère les mérozoïtes de seconde génération. En fonction de l'espèce, chaque schizonte donnera 8 à 32 mérozoïtes. L'éclatement synchrone des érythrocytes infectés est accompagné de libération de médiateurs chimiques qui déclenchent l'accès fébrile. Dans le cas de *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* cet évènement se produit toutes les 48 heures donnant la fièvre tierce. Dans le cas de *P. malariae* l'éclatement synchrone survient toutes les 72 heures engendrant la fièvre quarte. Pour *P. knowlesi*, l'éclatement synchrone des schizontes survient toutes les 24 heures. Au bout d'un certain nombre de cycles érythrocytaires, certains mérozoïtes se différencient en formes sexuées : les gamétocytes mâle et femelle. Ces formes sont infectantes pour le moustique, hôte vecteur, permettent le cycle sporogonique et l'échange génétique entre les populations parasitaires (une des sources de diversité génétique) et la transmission à l'hôte humain.

Au moment d'un repas sanguin, en absorbant le sang la femelle anophèle ingère tous les stades parasitaires et les éléments du sang. Seuls les gamétocytes échapperont en partie à la digestion en se transformant en zygote/ookinète. Le gamétocyte femelle suivra un processus biologique de maturation pour se transformer en macrogamète femelle à n chromosomes. Le gamétocyte mâle va subir un processus d'exflagellation, et donner des gamètes mâles à n chromosomes. Chaque gamétocyte mâle donne naissance à 6-8 microgamètes filiformes qui vont entrer en compétition pour féconder le macrogamète femelle ; un seul y parviendra formant le zygote. Le zygote évolue en œuf mobile ou ookinète qui se déplace, traverse la membrane péritrophique et échappe ainsi à la digestion du contenu de l'estomac du moustique. L'ookinète se fixe sur la paroi externe de l'abdomen du moustique et se transforme en oocyste. L'oocyste se développe et à maturité, éclate pour libérer plusieurs centaines de sporozoïtes. Les sporozoïtes sont fusiformes et mobiles ; ils se déplacent vers la glande salivaire du moustique qu'ils envahissent. Ici ils deviennent infectants, en l'attente d'un prochain repas de sang au cours duquel ils seront injectés avec la salive du moustique chez un hôte humain, bouclant ainsi le cycle évolutif du parasite.

Le cycle évolutif des plasmodies dépend de l'écologie des hôtes vecteur et humain pour sa réalisation. Le déroulement du cycle est favorisé par la chaleur et la présence d'eau. L'expression épidémiologique du paludisme se caractérise par sa stabilité dans une zone. La

stabilité traduit la fixation et l'enracinement du paludisme. Elle est fonction de l'intensité de la transmission du paludisme chez l'homme (nombre de piqûres infectées reçues) et de la durée de vie de la population anophélie. On distingue schématiquement 3 zones de stabilité :

(i) zone à paludisme stable : la transmission est intense et permanente. Elle correspond à la quasi-totalité des zones équatoriales où la pluviométrie est importante et quasi permanente. l'indice de stabilité de McDonald, $I_{St} > 2,5$

(ii) zone à paludisme instable : la transmission y est faible et épisodique. L'indice de stabilité de McDonald, $I_{St} < 0,5$

(iii) zones de stabilité intermédiaire : la transmission connaît une recrudescence saisonnière; dans ces zones I_{St} est compris entre 0,5 et 2,5 (48).

Au Mali, Doumbo *et al.*, ont décrit en 1992 cinq faciès épidémiologiques de la transmission du paludisme :

(i) une zone à transmission saisonnière longue de 6 mois ou plus (dans la région de Sikasso avec plus de 1000mm d'eau/an)

(ii) une zone à transmission saisonnière courte de 4 mois ou moins (correspond au Sahel avec une pluviométrie de 600 - 800mm d'eau/an)

(iii) une zone à transmission bimodale (zone de retenue d'eau, riziculture, barrage et delta intérieur du fleuve Niger)

(iv) une zone hypo-endémique peu propice à la transmission (dans les villes)

(v) une zone de non transmission avec des épidémies de paludisme (correspond aux régions saharo-sahéliennes, avec une pluviométrie de moins de 200mm d'eau/an)

Le paludisme présente une grande diversité résultant de la coévolution du parasite avec son hôte humain et des différentes adaptations en jeu. Certains auteurs (48;49) ont parlé des paludismes pour souligner la diversité des populations cibles, des manifestations cliniques variant de l'infection asymptomatique bien tolérée à l'accès pernicieux rapidement mortelle, des expressions épidémiologiques dans les populations humaines qui varient aussi en fonction des conditions géographiques, climatiques, sociales, comportementales et économiques. Cette notion est traduite par le concept de faciès épidémiologique. A différents faciès correspondent différents paramètres écologiques avec différents types d'interactions entre le parasite, l'homme et le vecteur, et se traduisant par différentes expressions morbides du paludisme.

Ainsi dans les zones à paludisme stable, on rencontre :

(i) le faciès équatorial des forêts et savanes post-forestières en Afrique centrale. La transmission anophélienne y est intense et permanente, pouvant atteindre 1000 piqûres infectantes (par des anophèles femelles porteurs de sporozoïtes) par personne et par an. Cela permet une acquisition précoce de la prémunition, vers l'âge de 5 ans. Chez l'enfant, 30% à 50% des fièvres sont attribuées au paludisme. La morbidité s'étale sur toute l'année. Les formes graves de paludisme, en particulier anémiques, sont fréquentes chez le jeune enfant, mais rares chez l'adulte, ce dernier étant habituellement prémuni.

(ii) le faciès tropical des savanes humides d'Afrique de l'ouest et de l'est. La transmission y suit une recrudescence saisonnière longue (6 à 8 mois), avec 100 à 400 piqûres infectantes par homme et par an. La prémunition apparaît plus tardivement, vers l'âge de 10 ans. La morbidité est plus importante en saison des pluies (environ 80 % des cas de fièvre chez l'enfant). Les formes graves de paludisme sont décrites jusqu'à un âge plus avancé.

Dans les zones à paludisme intermédiaire, on observe :

(iii) le faciès sahélien des savanes sèches. La transmission y est à recrudescence saisonnière courte (inférieure à 6 mois), avec 2 à 20 piqûres infectantes par homme et par an. En saison de transmission, près de 70 % des fièvres sont d'origine palustre. La prémunition est beaucoup plus longue à apparaître, expliquant les nombreux cas de neuropaludisme chez l'adulte.

Dans les zones à paludisme instable, on note :

(iv) le faciès désertique des steppes, le faciès austral des plateaux du sud de l'Afrique et le faciès montagnard des zones situées au dessus de 1000 m d'altitude. Dans ces 3 faciès, la période de transmission est très courte et il peut y avoir des années sans transmission. Il n'y a pas acquisition de prémunition. Le paludisme s'exprime sous forme d'épidémies apparaissant en période de transmission et pouvant toucher la quasi totalité de la population.

Dans chacun des faciès décrits, on peut observer des particularités, des variations de transmission créant de véritables enclaves épidémiologiques. Quelques exemples illustrent ce concept d'enclave épidémiologique: les zones de riziculture, de barrages pour irrigation, les zones lagunaires côtières avec eau saumâtre, les situations où la destruction de la forêt "primaire" crée une zone de savane. Dans les zones de barrage comme c'est le cas à Sélingué,

on observe une transmission intense et bi modale correspondant aux périodes de présence d'eau dans les parties irriguées.

En Afrique, le paludisme est une endémie essentiellement rurale. Il n'existe pas de vecteur spécifiquement urbain. En milieu urbain, la transmission est globalement beaucoup plus faible qu'en milieu rural. Ceci explique le niveau d'immunité plus faible des populations urbaines. On assiste depuis quelques années à une urbanisation accélérée : de plus en plus de personnes naissent et vivent en permanence dans les villes où la transmission anophélienne est faible voire nulle et n'acquerront pas de prémunité. Ils s'infecteront essentiellement à l'occasion de brefs séjours en zone rurale (vacances, mariages, deuils, etc.) et pourront développer à tout âge des formes graves de paludisme. Ainsi, cette accélération de l'urbanisation en Afrique pourrait avoir deux effets fondamentaux antagonistes : un effet favorable, du fait de la possible diminution dans les années prochaines des taux d'incidence du paludisme ; mais aussi un effet néfaste, avec une augmentation de la proportion des formes graves du paludisme liée à l'absence de prémunité. Selon *Baudon et al.*, 1996, pour l'Afrique, "le paludisme en milieu urbain, c'est le paludisme de demain" (50). La possible sélection d'anophèles pouvant se développer dans des gîtes à eau polluée comme ceux des *Culex*, avec une transmission intense touchant des populations non prémunies donnerait un scénario catastrophe de l'évolution du paludisme urbain.

La diversité des paludismes justifie l'approche micro-épidémiologique du paludisme. Elle signifie que la distribution du paludisme et des facteurs qui la déterminent sont hétérogènes, variables à une faible échelle exigeant une évaluation en foyers à l'intérieur d'un même faciès de transmission. La transmission du paludisme dans une zone donnée est hétérogène par excellence et sa compréhension nécessite l'étude des interrelations des populations de parasites et celles d'hôtes (anophèles et hommes) et l'étude de leurs écosystèmes. Une telle compréhension est importante pour permettre la mise au point des outils efficaces de lutte contre le paludisme.

Prenant en compte cette réalité, l'OMS a, depuis 1997, recommandé d'adapter la lutte contre le paludisme (LCP) aux caractéristiques épidémiologiques et socio-éco-climatiques locales.

Les outils de la lutte ont permis la baisse de la mortalité du pic de 2004 aux niveaux de 2010 ; ces outils sont les médicaments antipaludiques efficaces et les insecticides de différente

nature. Leur combinaison variée en fonction des paramètres locaux de la transmission du paludisme a constitué la pierre d'angle de la LCP depuis le sommet mondial de 1997. Les médicaments sont essentiellement constitués par les dérivés de l'artémisinine et les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine. Les insecticides ciblent le vecteur et sont utilisés sur des supports dans le cas des moustiquaires imprégnés d'insecticides de longue durée (MILD) ou dans les stratégies d'aspersion intra domiciliaire. Plus rarement, les insecticides associés ou pas à d'autres méthodes, sont utilisés pour traiter les gîtes larvaires. Enfin un effort important est consenti au niveau des systèmes de santé pour rendre accessible ces outils aux personnes malades et/ou à risque de paludisme à travers différentes stratégies : la prise en charge adéquate des cas avec diagnostic biologique rapide, la chimio prévention chez les groupes cibles (femmes enceintes, enfants d'âges scolaires en zone de transmission saisonnière, nourrissons), la réduction du contact homme-vecteur, la lutte anti vectorielle ciblée. Elles sont accompagnées par d'autres stratégies qui ont aussi une importance capitale, à savoir la communication pour l'information et le changement de comportement, la recherche opérationnelle et le partenariat intersectoriel. La lutte contre le paludisme repose sur les médicaments antipaludiques et les insecticides. Ces produits sont aujourd'hui menacés par le phénomène de chimiorésistance des parasites et des moustiques. L'émergence et la propagation de la chimiorésistance à la chloroquine et des moustiques au DDT ont constitué l'obstacle majeur qui a découragé les acteurs engagés dans l'élimination du paludisme dans les années 50' sous la houlette de l'OMS. Il s'agit par conséquent d'un danger sérieux qui mérite une attention particulière. Si des efforts significatifs ont été accomplis dans la recherche & développement de nouveaux médicaments antipaludiques au cours des dix dernières années, le nombre de molécules en développement n'est pas proportionnel à l'ampleur du paludisme. Ce constat s'applique aussi aux outils de la lutte anti-vectorielle. Par conséquent la lutte contre le paludisme a besoin de nouvelles approches et d'un renouveau accru dans l'engagement politique, national et international.

La vaccination s'est avérée être l'arme au meilleur rapport coût-efficacité dans la lutte contre les maladies infectieuses. La seule parmi les maladies infectieuses éliminée de la surface de la terre, la variole, l'a été grâce à la vaccination. La poliomyélite et la rougeole ont été éliminées de l'hémisphère nord développé grâce aux vaccins. Les vaccins du Programme Elargi de vaccination ont permis une réduction phénoménale dans l'incidence des affections cibles de ces vaccins. Un vaccin efficace contre le paludisme sera probablement un outil majeur de santé publique, pour son éradication.

Les vaccins disponibles visent des organismes procaryotes. Il s'agit de virus, comme l'agent pathogène de la rougeole, de la variole; de bactéries comme dans les cas de la méningite, de la diphtérie, de la coqueluche, du tétanos. Le parasite responsable du paludisme est eucaryote avec 3 types d'ADN (ADN nucléaire à 14 chromosomes, l'apicoplaste, l'ADN mitochondrial), une biologie complexe et il a co-évolué avec son hôte humain depuis le néolithique (8000-10000 ans) (51). Son cycle évolutif passe par plusieurs stades qui expriment chacun des antigènes spécifiques de stades ; à certains stades, tel le stade sanguin s'ajoute la complexité supplémentaire de la variation antigénique.

En plus le développement d'un vaccin est un processus long et coûteux. Par exemple, le vaccin antipaludique le plus avancé aujourd'hui dans la voie de son développement clinique, le RTS,S a pris 15 ans pour arriver à ce stade et coûté plusieurs centaines de millions de dollars.

2.2 Historique des efforts pour un vaccin antipaludique (1940-2013)

L'espoir ferme d'obtenir un vaccin antipaludique se base sur certains arguments objectifs. Le premier faisceau d'arguments se base sur les observations de l'état de semi-immunité conférant naturellement une protection partielle aux populations adultes vivant dans les pays endémiques (52). Dans ces pays une protection contre les formes graves de paludisme est acquise après un nombre limité d'infections survenant tôt dans la vie (53). Selon l'intensité de la transmission, les expressions cliniques graves du paludisme se limitent aux enfants jusqu'à l'âge de 10 ans. Par contre, la protection contre l'accès clinique simple est acquise après plusieurs années d'exposition, nécessite une exposition continue pour se maintenir et se perd en quelques mois si les personnes ne sont plus exposées, par exemple en cas de voyage en dehors de la zone endémique. L'état de semi immunité permet aux sujets adultes vivants en zone d'endémie de tolérer les parasites dans leur sang sans symptômes cliniques manifestes. L'observation minutieuse et rigoureuse de l'état de semi immunité a permis de déterminer que les anticorps anti-MSP3 (MSP3 étant une protéine exprimée à la surface du mérozoïte) sont associés à la protection des sujets semi immuns contre l'infection et la maladie palustre (54;55). Ces études ont permis l'identification de MSP3 et d'autres antigènes comme candidats vaccin antipaludiques. De même, ces études séro-épidémiologiques ont permis de décrire un mécanisme particulier de la réponse immunitaire contre le paludisme, l'inhibition cellulaire dépendante des anticorps en anglais, Antibody Dependent Cell Inhibition acronyme ADCI.

Le second faisceau d'arguments se base sur l'expérience de protection passive contre *P. falciparum* obtenue par le transfert d'immunoglobulines purifiés du sang de personnes adultes qui vivent en zone endémique en Afrique de l'Ouest (56). Plus récemment l'administration d'immunoglobulines G provenant d'adultes Oueest Africains aux enfants Thaï souffrant de paludisme causé par des souches multi résistantes de *P. falciparum* a entraîné une baisse de 99% de la parasitémie périphérique (57). Ces observations indiquent le rôle important que joue l'immunité humorale à travers l'action des anticorps dans la protection contre le paludisme. Elles permettent aussi d'indiquer le type de réponse immune que l'on veut d'un vaccin antipaludique.

Le troisième faisceau d'arguments se base sur les données des modèles animaux de paludisme dans lesquelles les vaccinations expérimentales ont été effectuées. Dans le modèle simien, l'administration d'extraits de stades sanguins de *P. knowlesi* associés à l'adjuvant complet de Freund a protégé les singes contre l'infection (58). La protection conférée par la vaccination avec des sporozoïtes irradiés dans le modèle avien (59), rongeur (13), primate et chez l'homme (60) a constitué un argument de poids supportant la faisabilité du vaccin antipaludique. Le premier résultat obtenu par Clyde et collaborateurs en 1973, a été confirmé par d'autres (15;61;62). Dans ces études, une protection stérile plus efficace que celle observée naturellement a été induite de façon répétée donnant une indication significative de la possibilité de mettre au point un vaccin antipaludique efficace.

Les progrès dans la quête d'un vaccin contre le paludisme ont été tributaires des avancées scientifiques et technologiques. Les modèles animaux bien qu'imparfaits et ne mimant pas le paludisme à *falciparum* chez l'homme ont été utiles à la compréhension des mécanismes de la défense immunitaire chez l'homme contre le paludisme. Jusqu'aux années 40, le modèle avien du paludisme était le seul disponible. Ce modèle a donné la preuve de la possibilité expérimentale d'induire une réponse immunitaire efficace. Freund et collaborateurs ont publié en 1945 une étude au cours de laquelle le canard de Pékin immunisé par une association de *P. lophurae* et d'un adjuvant, a été protégé contre un défi homologue (63). Par la même occasion, Freund s'inscrivait en tête de la liste des pionniers en introduisant l'utilisation d'un adjuvant pour stimuler la réponse immunitaire à un vaccin contre le paludisme. En plus, Freund et ses collaborateurs ont eu recours aux stades sanguins des parasites pour immuniser les animaux devenant les pionniers dans ce domaine. L'adjuvant qu'il a utilisé, devenu depuis le fameux adjuvant de Freund était fait d'un mélange d'huile de

paraffine, de lanoline avec ou sans mycobactéries. Dans la même lancée l'adjonction de l'adjuvant a permis d'obtenir une protection contre *P. knowlesi* chez le primate Rhésus (64).

La découverte de *Plasmodium berghei* au Congo en 1948 par Vincke et Lips (65) et la possibilité de reproduire son cycle biologique au laboratoire (66) ont permis de développer le modèle murin du paludisme, modèle très pratique de paludisme chez un mammifère au laboratoire et beaucoup plus simple à maintenir que le modèle simien. Ce modèle a servi aux premières études de vaccination avec les sporozoïtes irradiés et à identifier le rôle capital de la protéine circumsporozoïte (CSP) dans la mise en place de la réponse immunitaire aux antigènes parasitaires. Puis le recours au modèle simien, reproduisant une interaction hôte-plasmodie plus proche de celle observée entre *P. falciparum* et l'homme, a connu un regain d'emploi dans les années 70. La protection des singes écureuils saïmiri contre le défi parasitaire suite à l'administration de sporozoïtes irradiés en 1970 (67), a ouvert la voie aux tests chez l'homme. Les chercheurs de l'Université de Maryland sous le leadership de David Clyde ont été les premiers à administrer chez l'homme des sporozoïtes irradiés (60). Au cours de cette première expérience un participant sur 3 a été complètement protégé contre l'infection expérimentale parasitaire. Plus tard d'autres auteurs ont obtenu des niveaux de protection stérile contre le défi parasitaire de l'ordre de 94% (n=34), avec une durée de protection étendue à 10 mois et une efficacité croisée de souche (62).

Le modèle de protection induit par le sporozoïte irradié chez l'homme a nécessité l'administration d'au moins 1000 piqûres infectantes par des moustiques élevés en laboratoire et irradiés aux rayons Gamma, et une multiplication des sessions d'immunisation (au moins 6 fois). Une exposition massive et répétée aux antigènes parasitaires a permis d'obtenir une protection de plus de 90% des individus immunisés. Ces contraintes techniques ont constitué un obstacle pour le développement d'un vaccin basé sur les sporozoïtes irradiés. Toutefois, ces contraintes techniques ont aussi favorisé la compréhension du rôle des sous unités protéiques impliquées dans la protection observée et le développement des approches vaccinales basées sur les antigènes parasitaires uniques ou en association. A partir des études sur l'immunisation avec les sporozoïtes irradiés, plusieurs épitopes de la réponse immunitaire médiée par les cellules T et B ont été identifiés. Les antigènes correspondants ont été caractérisés et clonés à l'aide du développement des techniques de génie génétique.

En 1985, un système d'infection expérimentale à l'aide d'anophèles nourris par membrane et hébergeant une souche caractérisée de *P. falciparum* permettant d'infecter des

volontaires humains de façon reproductible et contrôlée a été établi, signant l'entrée dans l'ère de l'infection d'épreuve expérimentale de l'homme (68). Plusieurs souches de parasites à sensibilité connue aux antipaludiques ont été générés et le modèle de l'infection expérimentale a été validé pour évaluer les vaccins, mais aussi les médicaments antipaludiques dans un environnement contrôlé (69). Ce modèle de défi parasitaire a permis l'infection d'épreuve de plus de 1300 volontaires à ce jour. L'introduction de la PCR quantitative en temps réel a permis une détection plus précoce de la parasitémie, 2 à 4 jours plus tôt que par la classique microscopie. Cela a aussi permis de déterminer par des approches statistiques l'inoculum parasitaire au niveau du foie et aussi le taux de multiplication des parasites au stade sanguin (70;71).

Si l'obtention d'un modèle animal au laboratoire a été critique aux premières heures de la recherche du vaccin antipaludique, la disponibilité du matériel parasitaire en quantité suffisante est restée longtemps un obstacle majeur. La publication en 1976 des travaux de l'équipe de Trager, décrivant une méthode de culture continue *in vitro* de *P. falciparum* (72) a ouvert une nouvelle ère dans la recherche sur le paludisme. A partir des années 60, 70 et 80 la biologie moléculaire de façon générale a réalisé des avancées révolutionnaires, notamment avec le développement des techniques de l'ingénierie génétique, dont une revue magistrale est donnée par Paul Berg (73). Le développement des techniques de séquençage, de la biochimie, de la bioinformatique a permis le décodage du génome humain dont la première séquence quasi complète a été publiée en 2001 (74). Il faut aussi noter que la synergie des efforts pour le décryptage du génome humain a servi de puissant catalyseur dans le développement des techniques de séquençage de nouvelle génération. Dans la foulée, le génome de la souche 3D7 de *P. falciparum* a été publié en 2002 (75). Et celui de la souche PEST du vecteur *Anophèles gambiae* également (76). Ces progrès ont stimulé la recherche vaccinale contre le paludisme. Les antigènes spécifiques parasitaires impliqués dans les mécanismes de protection ont été isolés, caractérisés et reproduits. Qu'il s'agisse d'antigènes identifiés dans l'étude du modèle de l'immunité naturelle contre le paludisme ou lors des études sur le modèle de défi parasitaire au laboratoire. En parallèle les avancées technologiques sans précédent eurent lieu à partir des années 80 dans les domaines de la biologie moléculaire, de la biologie cellulaire, de la génétique, de la bioinformatique. Cela a révolutionné la biologie en inaugurant l'ère des sciences "omiques", pour génomique, protéomique et autres.

Le défi de l'expression des protéines plasmodiales a été une étape riche en problèmes mais aussi en capacité d'innovation des chercheurs. Les antigènes parasitaires ont souvent une

multitude de ponts bisulfites et une structure tertiaire dans l'espace que les systèmes d'expression ont du mal à reproduire. En plus les gènes parasites sont riches en nucléotides A-T rendant ardu leur expression dans les systèmes les plus utilisés, et basés sur *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia pastoris*. Le recours aux gènes synthétiques dont les codons ont été optimisés a permis une expression plus appropriée des structures tertiaires (77).

Du fait de la longue coévolution homme-plasmodie, le parasite a développé des approches pour échapper à la pression immunitaire de l'homme. Parmi ces mécanismes d'échappement nous retenons le polymorphisme antigénique, et la faible immunogénicité de plusieurs antigènes parasites (78). Cela justifie l'utilisation de substances stimulatrices de l'immunité que sont les adjuvants, comme Freund l'avait fait en 1942. Les adjuvants peuvent stimuler la réponse immunitaire en renforçant la réponse effectrice. Ils peuvent aussi moduler la réponse immunitaire en l'orientant vers une réponse de type Th1 avec une réponse cellulaire accrue ou vers une réponse Th2 avec une production accrue d'anticorps. Les adjuvants sont classés en deux catégories: (i) les véhicules avec effet de dépôt qui transportent l'antigène et ralentissent sa dispersion, optimisant sa présentation aux cellules effectrices de l'immunité et (ii) les substances immunostimulantes avec effet d'activation cellulaire, qui agissent sur les macrophages, ou stimulent la production de cytokines en interagissant avec les récepteurs Toll (TLRs) (79). Le rôle déterminant de l'adjuvant été démontré par le développement clinique du vaccin RTS,S/AS02 entre 1984 et 2009 (77). L'alun a été utilisé comme adjuvant il y a près de 80 ans et reste aujourd'hui encore le seul adjuvant approuvé par la FDA (Food and Drugs Administration), l'agence américaine de réglementation de l'utilisation des médicaments pour usage chez l'homme (77). Avec l'accroissement des antigènes malariques en développement pré cliniques il devient nécessaire de développer de nouveaux adjuvants capables de permettre au vaccin antipaludique d'induire une réponse immunitaire forte, durable avec une composante humorale et cellulaire qui soit protectrice contre de multiples antigènes parasites (79)

Dans les années 90's la recherche vaccinale contre le paludisme s'est orienté dans l'exploration des gènes et des virus sans capacité de répliquer comme vecteurs. Ces vecteurs ont démontré leur capacité à induire une forte réponse cellulaire T (80-82). Des études précédentes avaient montré que la protection observée dans le modèle du sporozoite irradié était due aux lymphocytes T CD8+ (83) et que ces lymphocytes T reconnaissait un épitope au niveau de la CSP (84). La protection par les cellules T n'a pas été observée de façon

consistante dans les études de l'état de semi immunité. Induire la protection en renforçant une composante de la réponse immunitaire non activée par l'infection naturelle est apparue comme une voie prometteuse dans la recherche du vaccin contre le paludisme.

Dans les années 2000, le nombre d'antigènes antipaludiques formant le pipeline des développeurs de vaccins augmentait. Toutefois on ne disposait d'aucun corrélat de la réponse immunitaire qui soit protectrice contre le paludisme. Aucun des modèles animaux ne permettait de prédire le comportement d'un antigène chez l'homme. Il devenait nécessaire de tester les vaccins candidats sur les sujets humains. Le modèle de l'épreuve d'infection par piqûres infectantes d'anophèles de laboratoire avait bien fait ses preuves. Toutefois les réponses immunitaires observés dans un environnement expérimental doivent être validés sur le terrain du fait des différences inhérentes aux deux approches. Ensuite l'exposition naturelle au paludisme est susceptible d'influencer l'impact d'un potentiel vaccin antipaludique. Il devenait nécessaire d'envisager l'évaluation des antigènes parasitaires dans les pays endémiques. Ces pays endémiques, pauvres le plus souvent avec un état embryonnaire de leur recherche avaient une très faible capacité de répondre aux besoins de tester un vaccin antipaludique en 2000. Des capacités importantes existaient dans certains pays, tels le Kenya ou la Gambie, mais il s'agissait d'une forte présence expatriée travaillant sur place plutôt que d'une capacité de recherche endogène. Il devenait évident qu'un renforcement des capacités des institutions de recherche en Afrique serait indispensable. Cette évidence a mis du temps avant de s'imposer, toutefois le mouvement était lancé et a pris de plus en plus d'ampleur.

L'avènement du troisième millénaire en 2000 a donné l'occasion aux Nations Unies de présenter une stratégie globale acceptée par tous pour résoudre les problèmes les plus critiques auxquels les hommes sont confrontés. Au couronnement d'une préparation qui avait été initiée depuis 1998, du 6 au 8 septembre 2000, à New York, 189 États membres des Nations Unies se sont rassemblés lors du Sommet du millénaire et ont adopté la Déclaration du millénaire. La déclaration comporte notamment des engagements relatifs à la réduction de la pauvreté, au développement et à la protection de l'environnement. Beaucoup de ces engagements sont inspirés d'accords et de résolutions adoptés suite à des conférences et sommets mondiaux organisés par les Nations Unies au cours de la décennie précédente. Un an plus tard, la Feuille de route du Secrétaire général de l'ONU pour la mise en application de la Déclaration du millénaire a fait officiellement connaître huit objectifs, soutenus par 18 cibles quantifiées et assorties d'un calendrier et 48 indicateurs. Ces derniers sont désormais connus sous le nom d'Objectifs de développement pour le Millénaire (ODM). Les ODM centrent les

efforts de la communauté internationale sur la réalisation d'améliorations significatives et mesurables dans la vie des personnes concernées d'ici 2015. Ils établissent des cibles et des normes de comparaison pour mesurer les résultats et ce, non seulement pour les pays en développement mais également pour les pays riches qui les aident à financer leurs programmes de développement et pour les institutions multilatérales qui aident à mettre en œuvre ces programmes. (<http://www.banquemondiale.org/omd/>, accédé le 17 avril 2014)

Les huit ODM sont les suivants : (i) Réduire l'extrême pauvreté et la faim ; (ii) Assurer l'éducation primaire pour tous ; (iii) Promouvoir l'égalité des sexes et l'autonomisation des femmes ; (iv) Réduire la mortalité infantile ; (v) Améliorer la santé maternelle ; (vi) Combattre le VIH/SIDA, le paludisme et d'autres maladies ; (vii) Préserver l'environnement ; (viii) Mettre en place un partenariat mondial pour le développement. La lutte contre le paludisme est citée à l'ODM VI ; elle est aussi un élément critique de l'atteinte des ODM IV et V, du fait que les femmes enceintes et les enfants sont particulièrement affectés par le paludisme. La lutte contre le paludisme se retrouve ainsi au centre de l'attention des nations. Le résultat a été une augmentation considérable, sans précédent, des ressources humaines et financières allouées à la lutte contre le paludisme tout au long des années 2000 et suivantes.

Avec l'afflux de ressources et le regain d'intérêt, la nécessité d'établir des partenariats privés-publics (PPP) s'est fait ressentir pour mobiliser les énergies dans la lutte contre le paludisme et profiter des synergies. La nécessité d'une implication à tous les niveaux de chercheurs compétents venant des pays d'endémie qui avait été reconnue comme essentielle quelques années plus tôt (85-87) est devenue une actualité brûlante. Cette actualité a profité du constat que le paludisme était en train de progresser. La morbidité et la mortalité ne reculaient plus (88;89). C'était la période de développement et de propagation de la chimiorésistance à la chloroquine qui était alors le médicament de première intention dans le traitement du paludisme. La découverte de nouveaux outils prenait un caractère urgent. Parmi les multiples initiatives entreprises pour renforcer les capacités en recherche et en recherche dans les domaines du paludisme des pays Africain (86;90), nous retenons celle de l'OMS/TDR et de GlaxoSmithKline Biologicals (GSK-Bio) mis en place avec une nouvelle approche en 2000. Ce programme de formation consistait à établir un lien entre une firme pharmaceutique, un institut de recherche en Afrique et le programme TDR de l'OMS, dans le but de favoriser l'acquisition de compétences et de savoir-faire dans les domaines de la recherche clinique et de la recherche et développement des produits. Ces compétences

devraient être disponibles pour stimuler la recherche clinique et le développement des produits dans leurs pays respectifs, mais aussi aider la composante recherche clinique et développement de produits sur les maladies négligées de TDR. En pratique le programme a effectué chaque année la sélection d'un jeune chercheur africain, qui était placé en formation/activités auprès de GSK-Bio dans un environnement industriel pendant une année. L'objectif était de le former par une approche pratique et pragmatique au développement des produits, à la recherche et développement clinique des produits y compris du vaccin antipaludique, à la conduite et à la gestion des essais cliniques, selon les normes internationales de bonne pratique clinique, et d'éthique. Nous avons eu la chance d'être sélectionné en 2000, comme premier candidat dans ce programme de formation (91). Quatorze ans après, le programme a connu un tel succès qu'il a reçu un financement substantiel de la fondation Bill & Melinda Gates, en 2008 pour l'étendre à d'autres compagnies pharmaceutiques et augmenter le nombre chercheurs par an. Après notre formation, et avec d'autres chercheurs envoyés en formation aux Etats-Unis, dans des environnements académiques plus classiques de recherche sur le vaccin, nous avons bâti sous le leadership du Pr Ogobara K Doumbo, et l'appui du NIAID/NIH et du CVD-Maryland, le premier centre de recherche clinique du vaccin antipaludique en Afrique sous la responsabilité entière d'Africains. Ce centre, le Malaria Research and Training Centre (MRTC), matérialisait alors une approche de renforcement des capacités autochtones en Afrique plaidée par Doumbo & Krogstad (85) en 1998 et a servi de modèle dans beaucoup d'instances.

En 2001, AMANET, African Malaria Network Trust est né à Ouagadougou, des cendres de l'AMVTN (African Malaria Vaccine Testing Network), œuvre du Pr Wenceslaw Kilama, un visionnaire originaire de la Tanzanie qui avait compris avant beaucoup que la mise à l'échelle africaine des interventions était indispensable pour engranger et maintenir les avancées significatives dans la lutte contre le paludisme. La création d'AMANET répondait au souci de rendre fonctionnel une organisation pan africaine dédiée à la recherche et développement de vaccins, médicaments mais aussi de produits (diagnostiques et autres) nécessaires à la lutte contre le paludisme. AMANET a constitué un forum qui a porté haut la voix des chercheurs africains à l'échelle internationale en exprimant leurs préoccupations. En plus cette organisation a contribué à former un nombre important de chercheurs africains et elle a renforcé de façon significative la prise en compte des aspects éthiques et réglementaires dans la conduite des essais cliniques.

AMANET a pu exister grâce aussi au soutien financier d'une organisation européenne dédiée au développement des vaccins contre le paludisme, EMVI, acronyme pour European Malaria Vaccine Initiative. EMVI est devenu EVI, European Vaccine Initiative en octobre 2009, traduisant l'évolution de l'organisation qui tout en continuant à privilégier son rôle de catalyseur du développement des vaccins antipaludiques, a élargi son spectre d'interventions pour couvrir aussi les vaccins et les plateformes ciblant les maladies liées à la pauvreté (<http://www.euvaccine.eu/about-us/strategy>, accédé le 27 avril 2014). EVI est devenu un acteur majeur du domaine, étant le principal canal par lequel passe les financements européens et de la Commission Européenne consacrés à la recherche du vaccin contre le paludisme.

En 2004 le bras dédié à la recherche sur le vaccin antipaludique PATH Malaria Vaccine Initiative (MVI) de la fondation Bill & Melinda Gates, le Wellcome Trust et l'OMS, ont sponsorisé une rencontre d'experts pour mobiliser les énergies et dégager une vision dans la recherche du vaccin contre le paludisme. Cette initiative a concerné 230 scientifiques à travers 35 nations et a abouti en 2006 à la publication de la Feuille de Route pour la Technologie du vaccin antipaludique (en anglais, Malaria Vaccine Technology Roadmap, MVTR (http://www.malariavaccine.org/files/Malaria_Vaccine_TRM_Final_000.pdf). La Feuille de route visait à identifier un but commun à atteindre, à harmoniser les approches dans l'effort de développement du vaccin antipaludique en standardisant les protocoles des essais cliniques, les procédures de mesures des réponses immunitaires, les aspects réglementaires et éthiques. L'objectif était d'obtenir en 2025, un vaccin offrant une protection d'au moins 80% contre le paludisme maladie et qui dure plus de 4 ans. Une étape avait été acceptée qui consistait à obtenir un vaccin de première génération en 2015, offrant au moins 50% d'efficacité protectrice contre le paludisme grave pendant au moins 12 mois. La Feuille de route a été modifiée en novembre 2013, suite à un large processus de consultation initiée cette fois-ci par l'OMS. Au processus s'est jointe la communauté mondiale de la recherche vaccinale contre le paludisme et des concepteurs de produits. La Feuille de route est soutenue par un groupe informel, le groupe des bailleurs de fonds du vaccin antipaludique, qui regroupe la Fondation Bill & Melinda Gates (BMGF), le partenariat Europe-Pays en Développement pour les essais cliniques (EDCTP), l'initiative européenne pour les vaccins (European Vaccine Initiative - EVI), la Commission européenne, l'initiative pour un vaccin antipaludique du Programme PATH (MVI), l'USAID (US Agency for International Development), le US National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), la

fondation Wellcome Trust et l'OMS. La nouvelle vision proposée par la Feuille de route cible l'horizon 2030 et se focalise sur l'élaboration de vaccins contre *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*, sûrs et efficaces, ayant une action préventive sur la maladie, les décès et la transmission pour permettre l'éradication du paludisme. Elle s'articule autour de deux objectifs stratégiques : (i) l'élaboration de vaccins antipaludiques efficaces ayant une action protectrice d'au moins 75% contre le paludisme clinique, et adaptés à une administration aux groupes à risque dans les zones d'endémie palustre; et (ii) l'élaboration de vaccins antipaludiques limitant la transmission du parasite et réduisant ainsi l'incidence de l'infection palustre chez l'homme, ce qui favorisera l'élimination du paludisme dans un grand nombre d'environnements. Les vaccins destinés à réduire la transmission devraient être adaptés à l'administration généralisée dans le cadre de campagnes de masse.

L'agenda pour l'éradication du paludisme, malERA (4-12), a été, à partir de 2009, un contributeur important dans la mise en évidence du besoin de reformuler la Feuille de route. Cet agenda a mis l'accent sur la réduction de la transmission pour éradiquer le paludisme. L'objectif primaire des développeurs de vaccins passait de la réduction de la morbidité et de la mortalité, à la réduction de la transmission. Cette approche traduisait un grand vent d'optimisme résultant des progrès réalisés dans certains pays dans la lutte contre le paludisme. Dans ces pays, la mise à échelle des interventions existantes, atteignant des taux de couverture de l'ordre de 80% des populations cibles, avait entraîné une baisse significative de la morbidité et de la mortalité liées au paludisme (92;93). En plus les progrès du candidat vaccin RTS,S avaient ouvert la possibilité de l'accès à l'outil vaccinal. L'agenda malERA a été proposé pour organiser l'optimisme et traduire en résultats concrets les promesses que portaient ces avancées. L'initiative a été portée par un processus consultatif qui a impliqué plus de 250 scientifiques venant de 36 pays, en vingt rencontres culminant avec une rencontre dans la semaine du zénith tenue à Washington en mars 2010. Cela a été un processus scientifique rigoureux pour identifier les besoins en connaissances et les nouveaux outils qui seront indispensables pour éradiquer le paludisme. Le processus a donné un agenda de la recherche pour l'éradication du paludisme publié dans PLoS (www.ploscollections.org/malERA2011, accédé le 27 avril 2014). Selon malERA, le vaccin peut être un outil crucial dans l'éradication du paludisme si ce vaccin a un impact sur la transmission du paludisme. L'initiative a introduit la notion de vaccin qui interrompt la transmission, dont l'acronyme en anglais est VIMT pour Vaccine that Interrupt Malaria Transmission. Ce vaccin idéal selon malERA devra

interrompre la transmission en ciblant les antigènes de différents stades parasitaires, et pas seulement les stades sexués des vaccins classiques visant à bloquer la transmission.

Le candidat vaccin RTS,S était le produit phare qui a attiré le plus de ressources grâce au soutien financier de la Fondation Gates. Son développement clinique a stimulé le développement des capacités en recherche clinique en Afrique. Ainsi en 2006, l'initiative dénommée Alliance pour les Essais Cliniques pour le Paludisme en anglais Malaria Clinical Trial Alliance (MCTA) a été mis en place. Promue par le Pr Fred Binka du Ghana cette alliance a bénéficié des fonds BMGF via le MVI pour renforcer les capacités des sites en Afrique où les essais cliniques de RTS,S en phase 3 devaient être effectués. Le plateau technique, les infrastructures et les compétences du personnel ont été significativement améliorés dans 7 pays d'Afrique. Une partie de ces pays ont contribué à l'essai clinique pivot du candidat RTS,S/AS01 dont les résultats publiés (24) ont encouragé les promoteurs à envisager une mise sur le marché vers 2015.

Une autre initiative, européenne, le partenariat Europe - Pays en développement pour les essais cliniques, EDCTP a joué un rôle majeur dans la sculpture du paysage du développement clinique du vaccin antipaludique en Afrique. Lancée en 2004 par les pays européens et africains, EDCTP a favorisé l'émergence et le renforcement de capacités de recherche clinique endogènes dans les pays d'Afrique autant francophones qu'anglophones. Cet aspect particulièrement intéressant, le démarque des initiatives précédentes qui ont nettement favorisé les pays anglophones d'Afrique. Dans une approche intégrée, le support d'EDCTP a porté sur le développement des réseaux d'excellence, la formation doctorale et de niveau Master II, le renforcement des comités d'éthiques et des organes règlementaires, le développement clinique de plusieurs antigènes candidats vaccins. Par exemple dans le domaine règlementaire, EDCTP a financé en 2007, la mise en place du Registre Pan Africain des Essais Cliniques (acronyme en anglais PACTR). Le PACTR est une base de données pour l'enregistrement des essais cliniques endossée par l'OMS ainsi que par le Comité International des Editeurs de Journaux Médicaux (ICMJE). Les essais cliniques doivent tous être enregistrés dans le PACTR avant leur mise en œuvre. Les revues internationales affiliées à ICMJE, et les revues sérieuses en général ne publient pas les résultats des essais cliniques non enregistrés dans un registre public quelconque.

Dans la seconde décennie du troisième millénaire, des progrès énormes ont été accomplis dans la recherche du vaccin antipaludique. La contribution des chercheurs africains

est devenue de plus en plus visible et importante. Si les premières générations de chercheurs africains ont aiguisé leur expertise en épidémiologie, en biostatistiques et en sciences sociales, les générations montantes maîtrisent les domaines de la biologie moléculaire, de la biologie cellulaire, de la bioinformatique, des sciences « omiques », mais aussi la génétique, l'épidémiologie génétique et génomique. Ces tendances nourrissent l'espoir que la vision 2030 de la Feuille de route pour la technologie du vaccin antipaludique sera atteinte avec un apport significatif des chercheurs d'Afrique au sud du Sahara.

2.3 Cycle biologique de *Plasmodium falciparum* et candidats vaccins

A chaque étape de son cycle biologique complexe, *P. falciparum* exprime des antigènes spécifiques de stades, plus ou moins immunogènes, qui ont été plus ou moins caractérisés et dont certains représentent un potentiel intéressant de devenir un vaccin antipaludique. En l'absence d'un modèle de laboratoire fiable et de marqueurs immunitaires associés à la protection, les développeurs de vaccins ont travaillé sur une multitude d'antigènes parasitaires. Parfois, la disponibilité du matériel de laboratoire a orienté le choix des antigènes étudiés.

La protection observée dans le modèle du défi de sporozoïtes a constitué une source d'inspiration importante. Les antigènes et les mécanismes immunitaires en jeu chez les personnes protégées ont permis d'identifier en particulier la CSP comme antigène prometteur et aussi la réponse immunitaire médiée par les anticorps. En plus, ce modèle d'épreuve d'infection a été à la base du développement récent de technologies appropriées pour un vaccin basé sur le sporozoïte entier. En parallèle, les approches sur l'organisme parasitaire entier ont été stimulées aussi, notamment les vaccins basés sur le mérozoïte entier (94), et les parasites entiers génétiquement modifiés (sporozoïte ou mérozoïte).

L'observation de la protection conférée par le transfert passif de sérum a confirmé le rôle des anticorps dans la réduction de la masse parasitaire circulante. L'élucidation des pans entiers des mécanismes immunitaires en jeu dans l'état de semi immunité a permis d'identifier les antigènes cibles de la réponse immunitaire et de les reproduire par techniques de génie génétique et de fabriquer des vaccins candidats.

Les études *in vitro* pour mieux comprendre l'immunité naturellement acquise ont été une source d'inspiration féconde. La capacité de la protéine AMA1 à inhiber *in vitro* la

croissance des parasites dans le Growth Inhibition Assay (GIA) a constitué un argument de poids en faveur du développement clinique d'un vaccin basé sur cette protéine (77).

L'immunité cellulaire médiée par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ a été observée dans le modèle de l'épreuve d'infection par le sporozoïte, comme associé à la protection (80;83). Une telle association n'a pas été systématiquement rapportée dans les observations de l'immunité acquise naturellement (77;95). Les efforts pour stimuler ce type de réponse immunitaire a entraîné le développement des approches vaccinales basées sur les vecteurs viraux (96) et les adjuvants stimulant spécifiquement la réponse immunitaire cellulaire (77).

Parmi les approches non observées dans la nature les recherches ont porté sur les vaccins ciblant des antigènes parasitaires exprimés chez le vecteur et induisant une réponse immunitaire chez l'homme : les antigènes des vaccins candidats bloquant la transmission. Dans ces approches l'hôte humain est vacciné pour induire une réponse immunitaire qui cible un antigène du parasite exprimé chez le vecteur. L'effet de la réponse immunitaire s'observe chez le vecteur par le blocage de la formation des sporozoïtes. Il en résulte un arrêt de la transmission du parasite au prochain hôte.

Une autre approche prometteuse se propose d'induire une réponse immunitaire protectrice non observée dans les conditions d'exposition naturelle au parasite. Ces approches visent à générer une réponse cellulaire forte en ayant recours aux vecteurs viraux (97), exprimant des antigènes parasitaires de stades pré érythrocytaire ou de stade sanguin et en adoptant un schéma de primo vaccination suivi de rappel (en anglais prime-boost). La primo vaccination est effectuée par un vecteur viral, par exemple un adénovirus et le rappel utilise un autre vecteur viral, par exemple le MVA (Modified Vaccinia Virus Ankara). Les deux vecteurs viraux encodent des protéines parasitaires similaires (98). Ces approches ont retenu une leçon critique de l'expérience du développement clinique du candidat RTS,S/AS01, à savoir l'importance du véhicule de type VLP (Virus Like Particule, pour particule de type viral) qui doit délivrer l'antigène vaccinal au niveau des cellules présentatrices du système immunitaire. Les particules de type viral stimulent fortement la réponse immunitaire cellulaire.

Une approche prometteuse se base sur l'hypothèse que le parasite présente un talon d'Achille, une protéine essentielle à sa survie, peu immunogène, protégé par des antigènes ayant des épitopes dominants et qui détournent la réponse immunitaire. Dans cette théorie un

tel antigène serait sujet à un polymorphisme limité car non ou peu exposé au système immunitaire de l'hôte humain. La découverte récente du récepteur basigine correspondant au groupe sanguin O et de son ligand parasite spécifique, la protéine PfRH5, ligand peu variable et commun à 15 espèces plasmodiales, tendrait à soutenir cette théorie (99).

Une autre approche qui profite des progrès en épidémiologie génomique consiste à mieux comprendre la dynamique de la diversité antigénique parasite dans le but de déterminer des constantes et de fabriquer des antigènes recombinants couvrant le répertoire de la diversité possible. Plusieurs équipes ont appliqué une telle approche à l'antigène parasite AMA1 (36;100-102). Dans le même effort d'améliorer l'efficacité d'un candidat vaccin basé sur AMA1, d'autres ont identifié des antigènes bloquant l'interaction AMA1-RON2 critique pour l'invasion des érythrocytes (103). Certaines équipes ont plutôt laissé le côté polymorphique d'AMA1 et se sont concentrés sur les antigènes invariables non exposés à la surface du parasite, mais critiques à sa survie (104).

Il est de plus en plus admis que le vaccin antipaludique protecteur devra être multi-épitopes, multi-stades et éventuellement consister en la combinaison de plusieurs antigènes (105). Nous allons passer en revue quelques antigènes en fonction des stades du cycle biologique du parasite, ayant fait l'objet des investigations les plus approfondies et qui présentent un intérêt pour le développement d'un vaccin contre le paludisme.

Les candidats vaccins ciblant les stades pré-érythrocytaires visent à obtenir une immunité stérile, anti-infectieuse. Ces antigènes peuvent être la cible d'anticorps qui préviennent l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes. Elles peuvent aussi constituer la cible des effecteurs de l'immunité cellulaire qui détruisent l'hépatocyte infecté. Les antigènes ciblés sont ceux présents à la surface du sporozoïte et au niveau de l'hépatocyte infecté.

CSP: la protéine la plus abondante présente à la surface du sporozoïte est la circumsporozoïte (*CSP*). La *CSP* est aussi l'antigène parasite le mieux étudié. Il s'agit d'une protéine d'environ 42KDa composée de 412 acides aminés, dont 41 se répètent en tandem de quatre peptides: 37 répétitions de type *Asn-Ala-Asn-Pro* et 4 répétitions de type *Asn-Val-Asp-Pro*. La protéine comprend une séquence signal à l'extrémité N-terminale constituée de 16 acides aminés, une région intermédiaire de 53 acides aminés (région I), la région répétitive centrale, une autre région intermédiaire (Région II), la région C-terminale constituée de 21 acides aminés hydrophobes, qui est une séquence d'ancrage de type glycosyl phosphatidyl

inositol (GPI) pour cette protéine de surface (106). Les régions I et II sont conservées entre les différentes espèces plasmodiales alors que la région centrale répétitive est le lieu d'une variation importante entre les espèces plasmodiales. La variation concerne la taille et aussi la séquence d'acides aminés de la région. La CSP est la cible d'anticorps spécifiques (107;108). La région centrale contient des épitopes immunodominants reconnus par les anticorps monoclonaux, mais aussi les épitopes spécifiques aux lymphocytes T et B (109). La fonction de la protéine a fait l'objet de nombreuses études. D'après *Coppi et al.*, 2011, la CSP permet au parasite d'interagir avec les cellules des glandes salivaires du moustique, et les hépatocytes pour l'ancrage du parasite et la pénétration à l'intérieur de l'hépatocyte (110).

Plusieurs vaccins candidats ont été fabriqués à partir de la CSP. Le vaccin candidat RTS,S, seul, a démontré une protection sur le terrain contre différentes formes de paludisme. Fruit du génie génétique, RTS,S est basé sur deux polypeptides exprimés dans le modèle *Saccharomyces cerevisiae*. RTS comprend les acides aminés 207-395 de la CSP, souche 3D7, qui a été fusionné avec la partie N-terminale du sérotype adw de l'antigène de surface de l'hépatite B, HBsAg. La partie CS comprend 19 répétitions NANP et la région C-terminale sans la séquence hydrophobe d'ancrage. S comprend tous les 226 acides aminés de la séquence de HBsAg. RTS et S s'assemblent spontanément dans la cellule du champignon pour former des particules. Cette propriété particulière à former des particules semble avoir une importance critique dans la protection conférée par le candidat vaccin RTS,S. L'essai clinique pivot d'évaluation de l'efficacité de RTS,S a inclus 15460 enfants, dont plus de 6000 dans la tranche d'âge de 6-14 semaines où la co-administration avec les vaccins de routine du Programme Elargi de Vaccination (PEV) a été évaluée. Les résultats complets de cette étude d'une ampleur sans précédent, devraient être disponibles en début 2015 avec les informations suivantes: la tolérance et l'innocuité du vaccin contenant un nouveau adjuvant, les données de la co-administration avec le vaccin pentavalent DTwP/HepB/Hib et le Polio oral, l'efficacité de RTS,S dans différents niveaux de transmission, l'efficacité après 30 mois de suivi, l'effet d'une dose de rappel à 18 mois et l'efficacité contre les formes graves de paludisme (111). Le premier des trois lots de résultats a été publié le 18 octobre 2011 et est resté conforme aux attentes, tel que l'on pouvait l'anticiper à partir des résultats des essais cliniques de phase 2b. L'incidence des épisodes cliniques de paludisme avait été réduite de 55% IC à 95% [51-59] pendant douze mois après la troisième dose du vaccin, chez les enfants âgés entre 5-17 mois. L'efficacité contre le paludisme grave dans les groupes d'âge 6-14 semaines et 5-17 mois, déterminée sur 250 cas de paludisme grave documentés dans la cohorte, était de 35% IC à

95% [16-49] (24). Un après, dans le groupe d'âge cible du vaccin, les nourrissons recevant les vaccins du PEV âgés entre 6-14 semaines, l'efficacité contre le paludisme simple a été de 31,3% IC à 97,5% [23,6-38,3] (25). L'OMS a mis sur pied un groupe d'experts pour la revue des données de l'étude pivot au fur et à mesure de la disponibilité des résultats pour proposer des recommandations de politique de vaccination sans perdre de temps. Les recommandations de l'OMS à l'endroit des pays endémiques sont attendues en 2015. D'ores et déjà, le développement clinique de RTS,S, a apporté des éclairages importants pour la mise au point des vaccins antipaludiques. Quelques leçons d'importance capitale sont la reconnaissance du rôle critique de l'adjuvant pour stimuler la réponse immunitaire aux antigènes sous unitaires; la compréhension de la présentation sous forme de particules qui facilite la présentation de l'antigène aux cellules présentatrices d'antigènes (APC); l'utilité du modèle d'épreuve d'infection expérimentale, qui devient de plus en plus un élément incontournable dans la voie du développement clinique des vaccins antipaludiques candidats. Nous retenons aussi le rôle du partenariat public-privé pour financer le développement du vaccin antipaludique, la participation des chercheurs des pays endémiques et le renforcement de la capacité des sites d'essais cliniques en Afrique.

TRAP (SSP2) : la Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) ou SSP2 (pour Sporozoïte Surface Protein 2) est une protéine de 90kDA exprimée à la surface du sporozoïte mûr et au niveau du micronème des mérozoïtes de stades sanguins de *P. falciparum*. Elle semble jouer un rôle critique dans la motilité du sporozoïte, dans la reconnaissance et l'invasion de l'hépatocyte. Chez les personnes immunisées à l'aide des sporozoïtes irradiés et protégées contre l'épreuve d'infection, des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques reconnaissant la TRAP ont été identifiés (112;113). En plus les anticorps anti-TRAP inhibent in vitro l'invasion des hépatocytes (114). Enfin chez les enfants des pays endémiques, les anticorps anti-TRAP acquis suite à l'exposition naturelle combinés à un titre élevé d'anticorps anti-CSP et anti-LSA1 ont été associés à une densité parasitaire faible. Ces observations ont montré le potentiel de vaccin antipaludique candidat de la TRAP. Toutefois dans une tentative d'améliorer la protection observée avec RTS,S, GSK-Bio a effectué un essai où les deux antigènes ont été administrés en même temps. Il a semblé que l'adjonction de la TRAP diminuait l'efficacité de RTS,S (105). Ces résultats décevants ont empêché une évaluation plus approfondie des mécanismes ayant entraîné l'interaction négative RTS,S-TRAP. Du fait de son potentiel à induire une réponse immunitaire ciblant le sporozoïte et aussi l'hépatocyte infecté, l'antigène TRAP a été inclus dans d'autres combinaisons antigéniques en cours

d'évaluation, notamment le multi épitopes ME-TRAP, une protéine recombinante qui comprend 17 épitopes de lymphocytes B, de lymphocytes T CD4+ et D8+, provenant de six antigènes différents de *P. falciparum*, le tout fusionné à l'allèle T9/96 de TRAP (115;116). Le ME-TRAP illustre l'approche basée sur les protéines recombinantes contenant de multiples épitopes dans le but de générer une réponse immunitaire large, à la fois humorale et cellulaire efficace, dans le but de prévenir le passage au stade sanguin.

ChAd63/MVA ME-TRAP : utilise l'adénovirus simien ChAd63 en primo vaccination et le MVA en rappel, les deux virus exprimant le construct ME-TRAP. Ce produit à été bien toléré dans la population adulte non exposée au paludisme (98) et semi immune en Gambie et au Kenya (117). En essai d'épreuve d'infection chez les sujets naïfs le candidat vaccin a montré une efficacité protectrice contre le défi parasitaire de 58% (118). Le développement clinique de ce vaccin candidat se poursuit dans le cadre du consortium du vaccin antipaludique par vecteur viral (Malaria Vected Vaccine Consortium, acronyme MVVC) par des essais clinique de phase 1b et 2b au Sénégal, en Gambie, au Kenya et au Burkina Faso (119).

Sporozoïte entier : PfSPZ, est constitué de sporozoïtes entiers, atténués par irradiation, actifs d'un point de vue métabolique mais sans capacité de répliquer. Le vaccin candidat PfSPZ s'est bâti sur les expériences d'immunisation à l'aide des sporozoïtes entiers atténués par irradiation et ayant donné une protection complète dans les années 60-80. Le promoteur de ce produit s'est dit qu'en fait un vaccin antipaludique existe et qu'il faut trouver le moyen de le produire. D'où le développement d'un processus de fabrication à échelle, répondant aux critères les plus stricts de Bonne Pratique de Fabrication et de la FDA par la firme Sanaria. Cela a abouti au produit PfSPZ, un vaccin basé sur le sporozoïte entier et maintenu dans l'azote liquide. Cette approche a constitué un défi technologique et devra répondre au défi opérationnel de son déploiement sur le terrain dans les pays endémiques si le candidat s'avère vaccin. Toutefois le potentiel d'une protection à plus de 90% des personnes vaccinées en font une approche qui mérite une attention particulière. En plus de l'infection expérimentale à l'aide d'anophèles élevées en laboratoire (120), les investigateurs ont développé le modèle de l'infection palustre contrôlée de l'homme à l'aide de sporozoïtes vivants inoculés par injection intradermique ou intraveineuse (121). Dans un essai de phase 1/2a avec épreuve d'infection, le candidat vaccin PfSPZ a montré une protection de plus de 90% (122), permettant un développement clinique accéléré du produit et la conduite d'essais cliniques dans les pays endémiques, dont le Mali à partir de 2014.

D'autres chercheurs ont atténué le sporozoïte par la délétion de gènes, provoquant l'arrêt de sa multiplication dans le foie des souris de laboratoire (123;124). Cette approche utilisant des parasites génétiquement atténués a induit dans le modèle murin une bonne réponse en cellules cytotoxiques T CD8+ (125). Un essai clinique chez l'homme a montré la tolérance et l'immunogénicité du produit, tout en permettant une prolongation de la période pré patente suite à l'épreuve d'infection (126).

Le développement clinique de beaucoup d'autres candidats vaccins basés sur la CSP ou sur d'autres antigènes parasitaires exprimés au stade pré érythrocytaire ont été abandonné le plus souvent pour absence d'efficacité dans l'épreuve d'infection au sporozoïte (111). Le MuStDO5 (pour *Multi Stage DNA vaccine Operation, 5 antigens*) est une combinaison de plasmides contenant de l'ADN parasitaire codant pour les protéines CSP, TRAP, Exp-1 (*Exported Protein 1*), LSA1 et LSA3 (*Liver Stage Antigen 1 et 3*), associée à un adjuvant, le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) ou facteur de croissance des colonies de granulocytes. Une autre formulation de la CSP est basée sur une synthèse chimique d'un segment de la CSP incluant la région C-terminale et les aminoacides 282-383. Dénommé PfCS102, ce long peptide synthétique a été testé en phase 1a en association avec l'adjuvant Montanide ISA 720 et AS02A de GSK-Bio (127) et puis en phase 1/2a avec épreuve d'infection (128). Si le produit a été immunogène et relativement bien toléré (127), l'épreuve d'infection n'a montré aucune protection ni de prolongation de la période pré patente (128).

Les candidats vaccins ciblant le stade sanguin, visent à réduire la densité parasitaire et à réduire la morbidité et la mortalité liées au paludisme. A l'intérieur de l'érythrocyte, le parasite est à l'abri des effecteurs de l'immunité cellulaire car l'érythrocyte n'exprime pas à sa surface les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité. L'expression de ces molécules est indispensable à l'ancrage et à l'action des cellules effectrices de l'immunité cellulaire. Par conséquent, la défense immunitaire est basée à ce stade, sur l'action des anticorps. Les antigènes ciblés sont ceux présents à la surface du mérozoïte où à la surface de l'érythrocyte infecté. Le temps de présence des mérozoïtes dans le sang avant l'invasion de nouveau érythrocytes est assez limité. Pour être efficace les anticorps devront se trouver en quantité importante et interférer ou empêcher la pénétration dans le globule rouge. La surface du mérozoïte présente une multitude de protéines de surface ayant le potentiel de déclencher une réaction immunitaire avec production d'anticorps. Le parasite exprime aussi certains antigènes à la surface de l'érythrocyte infecté. Il est probable que certains anticorps sont spécifiquement

dirigés contre ces antigènes. Les études investiguant la relation entre les anticorps dirigés contre une multitude d'antigènes exprimés à la surface du mérozoïte qui sont candidats vaccins et la protection naturellement acquise contre le paludisme, ont montré que la réponse immunitaire simultanée à plusieurs antigènes contribue à la protection (129;130). Il est probable que l'importance de la réaction immunitaire à un antigène donné du mérozoïte est fonction de l'individu, variant selon des facteurs liés au parasite, au génotype de l'hôte, et aux interactions hôtes-parasites. Du fait, entre autres, de la multiplicité des réponses immunitaires aux antigènes de stade sanguin, il a été difficile jusqu'à nos jours, d'identifier une corrélation entre la réponse immunitaire à un antigène parasitaire spécifique et la protection contre le paludisme. Les antigènes de stade sanguins devenus candidats vaccins antipaludiques l'ont été sur la base d'autres critères, tels leur efficacité dans les tests *in vitro* ou sur modèle animal ou encore sur la base de leur localisation à la surface de l'érythrocyte ou au niveau des organelles du complexe apical du mérozoïte (131).

MSP-1 (Mérozoïte Surface Protein-1) : la MSP-1 est la protéine la plus abondante à la surface du mérozoïte. Elle a été initialement identifiée à l'aide d'anticorps monoclonaux inhibant la croissance de *P. yoelii* chez le rongeur (132). Il s'agit d'une protéine d'environ 200Kda présente au niveau du schizonte mûr, à la surface des mérozoïtes. Au moment de la rupture de l'érythrocyte infecté et de la libération des mérozoïtes, la protéine est lysée par des protéases en plusieurs fragments tenus ensemble par des liaisons non covalentes (133) et accrochés à la surface du mérozoïte par la portion C-terminale de 42KDa qui reste attachée à la membrane du mérozoïte. Au moment de l'invasion d'un autre globule rouge, la portion MSP-1₄₂, est encore scindée en deux fragments. Un fragment de 33KDa, MSP-1₃₃ qui se dissout dans le sang et un fragment de 19KDa, la MSP-1₁₉ qui reste attachée à la surface du mérozoïte par le biais d'un ancrage de type glycosyl phosphatidyl inositol et l'accompagne à l'intérieur de l'érythrocyte infecté. Ce second clivage de la MSP-1 est indispensable à l'invasion de l'érythrocyte (134-136). Lorsque le second clivage est inhibé l'invasion du globule rouge est bloqué. Lorsque l'on prévient l'invasion du globule rouge, le clivage aussi est arrêté (136).

La fonction exacte de la MSP-1 n'est pas connue. Toutefois il est probable que la protéine intervient dans l'invasion du globule rouge par le mérozoïte, en permettant l'accroche initiale du mérozoïte à la surface du globule rouge (137). Le gène codant *mssl*, d'environ 5kb est situé sur le chromosome 9 et peut être divisé en 17 blocks, en fonction de la présence ou pas et de la nature d'une séquence répétitive de 9bp. Le gène se rencontre sous deux formes

alléliques principales K1 et MA20. Le block 1 correspondant à la partie N-terminale est bien conservée. Le block 2 est hautement variable présentant au moins trois allèles, K1, MAD20 et RO33 (138). Le block 17 correspond à la partie MSP-1₄₂ de la protéine. Elle est aussi bien conservée. La partie MSP-1₃₃ peut être divisée en régions dimorphiques et conservés. La portion C-terminale MSP-1₁₉ est le siège d'un polymorphisme limité, du fait des mutations ponctuelles de nucléotides, dont résultent une diversité d'haplotypes variables selon le lieu, le niveau de la transmission du paludisme et aussi les outils de détection utilisés (139-141). Une telle observation rend obligatoire l'évaluation de la diversité génétique de MSP-1 en une zone donnée, avant tout essai clinique d'un candidat vaccin basée sur la MSP-1₁₉.

Plusieurs études séro-épidémiologiques ont mis en évidence une corrélation entre la présence et le titre d'anticorps anti-MSP1 inhibant l'invasion des globules rouges et la protection contre le paludisme (142). La partie N-terminale de MSP-1 encodée par le block 1 est la cible d'anticorps spécifiques d'allèles (143). Les anticorps résultant de l'infection naturelle ciblant la partie C-terminale MSP-1₁₉ encodée par le block 17, inhibent le clivage secondaire de la MSP-1 et bloquent l'invasion des globules rouges (144). Pour toutes ces raisons MSP-1 a constitué une cible privilégiée des efforts de développement d'un vaccin limitant la morbidité liée au paludisme, par imitation de Mère Nature. Les candidats vaccins basés sur la MSP-1 ciblent en général la partie C-terminale, MSP-1₁₉. Cette portion est en soi peu immunostimulante. Les efforts ont donc porté sur les protéines recombinantes couvrant la MSP-1₄₂ et l'association à des adjuvants puissants. Si les candidats testés ont montré une bonne tolérance et induit des réponses immunitaires satisfaisantes (145;146), l'unique essai clinique de phase 2b du candidat MSP-1₄₂/AS02A effectué au Kenya n'a pas fait la preuve d'une protection quelconque apportée par le produit (147). Les approches différentes ont porté sur la séquence entière de la MSP-1 (148;149), sur d'autres parties immunogènes de la MSP-1 tel le block 2 (150;151), mais aussi sur le recours à des vecteurs viraux dans des approches de primo vaccination suivie de rappel, "prime-boost" en anglais. Ces approches visent à induire une réponse immunitaire cellulaire efficace. Les résultats de ces études sont attendus.

MSP-2 (Mérozoïte Surface Protein-2): la MSP2 est une protéine abondante à la surface du mérozoïte, entrant dans la composition de l'enveloppe fibrillaire du mérozoïte (152). Sa fonction exacte n'est pas encore connue toutefois sa localisation suggère un rôle dans l'accroche du globule rouge pendant le processus d'invasion. MSP2 est une protéine de membrane ancrée par un lien glycosyl phosphatidyl inositol (GPI), avec une masse de 28KDa (153;154). L'antigène est polymorphique (155) et les diverses formes alléliques peuvent se

regrouper en deux grandes familles : 3D7 et FC27 (156). La protéine comprend une région centrale variable limitée par deux régions conservées: N-terminale et C-terminale. Elle présente une structure désorganisée et en solution se trouve sous forme de fibrilles amyloïdes. Plusieurs études séro épidémiologiques ont montré que les anticorps anti-MSP2 sont dirigés contre des épitopes présents dans la partie centrale variable. Certaines études ont aussi montré un lien entre les anticorps anti-MSP2 et la résistance naturelle à l'infection plasmodiale (157;158). Un candidat vaccin, la Combinaison B, une mixture d'antigènes parasitaires (MSP1, MSP2 et RESA) a montré en essai clinique de phase 1/2 en Papouasie Nouvelle Guinée une réduction significative de la densité parasitaire de 62% [IC à 95% 13-84]; l'effet de réduction de la densité parasitaire étant observé contre les parasites ayant l'allèle MSP2 similaire à celui contenu dans le cocktail vaccinal (159). Ces résultats ont encouragé le développement d'un vaccin basé sur une combinaison d'allèles de la MSP2, la MSP2-C1 contenant les deux familles alléliques 3D7 et FC27. En phase 1 dose croissante (10, 40 et 80mcg) et associé à l'adjuvant ISA720, le produit a induit une bonne réponse immunitaire humorale. Les IgG induits ont produit une activité significative en ADCI. Toutefois l'essai a été interrompu après que la cohorte recevant la dose de 40mcg ait reçu sa seconde vaccination, à cause des douleurs au site d'injection d'intensité jugée inacceptable par le DSMB et les investigateurs et du développement d'un abcès stérile au site d'injection chez un récipiendaire de la dose de 40mcg (160). Le développement clinique de ce candidat a été mis à l'arrêt en attendant qu'un adjuvant mieux toléré puisse être disponible.

MSP-3 (Mérozoïte Surface Protein-3): la MSP3 est une protéine de 48KDa exprimée chez le schizonte mature. Elle est localisée au niveau de la vacuole parasitophore et à la surface du mérozoïte. Sa fonction n'est pas connue. La portion N-terminale est polymorphique et contient une répétition d'heptades, indiquant une structure en spirale. La portion C-terminale est acide, riche en leucine et se présente sous forme de dimères. La MSP3 a été identifiée suite aux études de l'immunité naturellement acquise par le transfert d'IgG. Ces IgG agissent par l'intermédiaire de monocytes, réalisant le mécanisme de l'ADCI (Antibody Dependent Cell Immunity). La recherche de la cible de l'ADCI a permis d'identifier une protéine bien conservée, la MSP3 (161). Selon une revue récente, la MSP3 est l'antigène parasitaire le plus fréquemment et systématiquement associée à la protection naturelle contre le paludisme dans les études séro-épidémiologiques (162). Un candidat vaccin, long peptide synthétique a été développé à partir de la portion C-terminale contenant à la fois des épitopes de cellules B et T. Ce candidat a été associé aux adjuvants ISA720 et hydroxyde d'aluminium

et évalué en phase 1 (163). Les deux formulations ont induit une bonne réponse immunitaire. La formulation associée à l'alun a été évaluée en phase 1 au Burkina Faso. Une analyse post hoc a montré une plus faible incidence du paludisme dans le groupe des enfants vaccinés avec la MSP3 en comparaison avec les enfants dans le groupe témoin (164). Ces résultats devront être confirmés dans une étude plus large. De telles études ont été initiées au Mali en 2011 et les résultats ne sont pas encore publiquement disponibles.

SERA (Serine Repeat Antigen 5) : il s'agit d'une large protéine qui est lysée pour donner trois fragments de 19kDa, 47kDa et de 50kDa, exprimée au niveau des trophozoïtes et du schizonte, et qui s'accumule à l'intérieur de la vacuole parasitophore. Les études séro-épidémiologiques ont montré une relation entre les titres d'anticorps anti-SERA5 et la protection contre l'infection et la maladie palustre (111). Le vaccin recombinant BKSE36 à partir de la partie N-terminale de la protéine a été associé à l'hydroxyde d'aluminium et testé en essai de phase 1/2 en Ouganda (165). Le produit a été bien toléré et a induit une bonne réponse humorale. En plus le produit a montré une efficacité statistiquement significative dans la réduction de la densité parasitaire et de la fréquence des épisodes associant parasitémie et température axillaire élevées. Une évaluation de l'efficacité du produit est envisagée par les développeurs sur une taille d'échantillon plus grande.

EBA175 (Erythrocyte Binding Antigen-175) : EBA175 est une protéine de 175KDa localisée à l'extrémité apicale du mérozoïte et impliquée dans l'invasion de l'érythrocyte par liaison à l'acide sialique de la glycophorine A (GpA). La glycophorine A est la principale glycoprotéine à la surface de l'érythrocyte, riche en acide sialique (166). La portion N-terminale d'EBA175 comprend une région RII conservée, composée de 616 acides aminés qui est la partie d'EBA175 qui se lie à la GpA (167). RII comprend deux régions riches en cystéine F1 et F2 qui sont homologues à l'antigène Duffy de *Plasmodium vivax* et dénommées pour cette raison Duffy binding like (DBL). La partie C-terminale est aussi riche en cystéine. EBA175 appartient à la grande famille des protéines d'attache à l'érythrocyte, appelées EBAs (Erythrocyte Binding Antigens) (168). Ces protéines sont caractérisées par la présence de domaines DBL, d'une partie C-terminale riche en cystéine et d'un domaine transmembranaire. Les anticorps acquis par exposition naturelle ciblant la région RII d'EBA175 ont été associés à la protection contre le paludisme (169). Un candidat vaccin basé sur la région RII a été évalué en phase 1 chez des adultes non exposés naturellement au paludisme, montrant une innocuité et une immunogénicité significative (111). Une évaluation en zone d'endémie au Ghana a été initiée en 2010 et les résultats ne sont pas encore publiquement disponibles.

Combinaison des antigènes de stade sanguin: compte tenu du fait que le mérozoïte baigne dans le milieu interne sanguin avant l'invasion des érythrocytes, il est intuitif de penser que tout antigène parasitaire exposé et immunogène peut induire une réaction immunitaire. L'approche de la combinaison d'antigènes se base sur une telle intuition. Elle suppose que les réponses immunitaires induites par des antigènes différents peuvent donner une protection plus grande que celle conférée par chaque antigène administré seul. L'action additive va augmenter la largeur de la couverture immunitaire et actionner une palette plus large de mécanismes immunitaires. Cette approche est supportée par les données récentes de séro-épidémiologie utilisant des méthodes à haut débit, tels les micros puce à protéine qui mesurent en même temps, la réponse immunitaire à une multitude d'antigènes. Ces réponses immunitaires sont ensuite corrélées à la présence ou l'absence d'une protection naturelle contre le paludisme (170). L'étude récente au Kenya a montré que la réponse immunitaire naturellement acquise est liée à un titre d'anticorps élevé contre plusieurs antigènes différents du parasite (130). Le problème revient alors à prioriser quel antigène introduire dans une combinaison et à se rassurer de l'absence d'une interaction négative entre les deux antigènes. Utilisant une autre approche limitée à 39 antigènes, la même équipe du Kenya a démontré que la réponse immunitaire à un nombre limité de 5 antigènes suffit pour expliquer 100% de la protection naturelle acquise en milieu endémique (171). Un tel résultat a été rendu possible par le recours à un système d'expression amélioré permettant de reproduire la conformation spatiale appropriée des antigènes parasitaires. Quelques combinaisons ayant porté beaucoup d'espoirs sont brièvement décrites dans la suite.

PfCP-2.9 (recombinant AMA1 plus MSP-1₁₉) : basée sur la portion C-terminale d'AMA1 de la souche 3D7 et la MSP1₁₉ de la souche K1, cibles d'anticorps inhibiteurs, ce construct a été associé à l'adjuvant ISA720 et testé dans deux essais de phase 1 (172). Bien toléré et ayant induit une réponse immunitaire significative, le développement clinique ultérieur du produit est envisagé.

GmZ2 (hybride GLURP et MSP3) : composé de la partie C-terminale de MSP3 et des aminoacides 85-213 de la protéine riche en glutamate (GLURP pour glutamate rich protein), ce hybride a été exprimé dans le système *Lactococcus lactis*, associé à l'alun et testé en phase 1 et en phase 2 en Allemagne et au Gabon. Chez les sujets naïfs le produit a montré une bonne immunogénicité et une bonne tolérance (173). Dans la population exposée au paludisme adulte (174) et pédiatrique (175), le vaccin a également été immunogène et bien toléré. Une évaluation multicentrique de phase 2 couvrant le Gabon, le Burkina Faso, l'Ouganda et le

Ghana a été initiée au Gabon en 2010 et les résultats ne sont pas encore disponibles dans le domaine public.

PfRH5 (*P. falciparum* reticulocyte-binding protein homologue 5) : cette protéine appartient à la famille des antigènes d'attache à l'érythrocyte, dans le groupe des homologues aux protéines d'attaches de *P. yoelii*. Parce que ces protéines ont d'abord été identifiées chez *P. yoelii*, ceux de *P. falciparum* sont dénommés homologues aux protéines d'attache aux réticulocytes (Reticulocyte binding Homolog, ou PfrH). La génomique fonctionnelle a permis l'identification de ces protéines. Dans le cas de PfrH5, la structure putative basée sur la séquence du gène dans PlasmoDB a été utilisée pour générer une protéine recombinante de 43kDa en utilisant le Glutathione-S-Transferase (GST) système d'expression dans *E. coli*. Cet construct a été utilisé pour immuniser des lapins. Le sérum des lapins a été utilisée dans une culture de parasite pour identifier la protéine parasitaire et la caractériser (176). PfrH5 a été décrit comme une protéine de 63kDa localisé au niveau apical du mérozoïte au niveau des rhoptries. Elle est impliquée dans l'invasion des érythrocytes et son absence chez le parasite est incompatible avec sa survie. Son ligand à la surface de l'érythrocyte est une protéine du groupe Ok, la basigine (99). PfrH5 est reconnu par des anticorps neutralisants induits par différentes souches de *P. falciparum*. En même temps la protéine est soumise à une faible pression immunitaire, les IgGs anti-PfrH5 étant rares dans la population exposée au paludisme au Kenya (177). Enfin en pays endémique au Mali, les IgG anti-PhRH5 ont été associée à la protection contre le paludisme dans la population générale (178); ainsi qu'en Papouasie-Nouvelle Guinée (179). Ces données montrent le potentiel important de ce candidat comme vaccin antipaludique. Plusieurs équipes sont engagées à porter le développement clinique d'un vaccin basé sur pfrH5.

Mérozoïte entier : l'idée d'immuniser contre le paludisme en utilisant l'organisme parasitaire en entier des stades sanguins remonte à Freund (64). Toutefois les quantités de parasites nécessaires rendaient l'approche peu faisable. Les approches plus récentes ont montré que l'administration de doses parasitaires réduites dans le cadre de régimes type épreuve d'infection/traitement, induisait une réponse cellulaire protectrice dans le modèle souris. Cette protection était croisée et efficace non seulement contre *P. yoelii* dont les stades sanguins ont été utilisés pour immuniser les souris, mais aussi contre d'autres espèces proches, *P. berghei*, *P. chabaudii* et *P. vinckei*. Chez l'homme aussi, l'administration répétée à très faible dose, d'érythrocytes infectés par *P. falciparum*, a entraîné une protection efficace à travers une forte réponse cellulaire (180). L'ensemble de ces approches, résumé par MF Good

(94), suggère que malgré les obstacles, une immunisation protectrice efficace est faisable, réalisée par les réponses cellulaires effectrices appropriées, et induite par l'administration de faibles doses de stades sanguins entiers de plasmodies.

Le vaccin bloquant la transmission (Transmission-blocking Vaccine ou TBV) se réfère aux antigènes des stades sexués exprimés chez le moustique contre lesquels des anticorps seraient induits chez l'homme. Le moustique ingère ces anticorps au moment d'un repas sanguin et l'interaction antigène-anticorps a lieu chez le moustique réalisant ainsi un blocage de la sporogonie ou division sexuée du parasite avec arrêt de la production de sporozoïtes et de la transmission. La sporogonie chez le moustique représente un maillon faible dans le cycle biologique des plasmodies. En effet, certains des antigènes exprimés à ce niveau ne sont pas exprimés chez l'homme et ne sont pas exposés à la pression de son système immunitaire. Ces antigènes constituent une cible idéale d'une réponse immunitaire efficace. Ce type de vaccin agirait à l'échelle d'une communauté pour empêcher les personnes indemnes de devenir infectés. Ce serait un vaccin altruiste ne protégeant pas directement le récipiendaire, visant plutôt à protéger le voisin contre les parasites abrités éventuellement par le récipiendaire et transmis par lui au vecteur. Récemment l'initiative malERA, l'agenda d'éradication du paludisme a proposé le concept de vaccins pour interrompre la transmission du paludisme (VITP; VIMT en anglais, acronyme pour vaccines that interrupt malaria transmission) (6). Ce concept revient en fait à la biologie des plasmodies en intégrant le fait qu'un vaccin très efficace contre les formes pré érythrocytaires ou les stades sanguins aura forcément un impact sur la formation des gamétocytes et aura ainsi une capacité à réduire la transmission du parasite. Du point de vue de la stratégie de développement d'un vaccin antipaludique, le concept VITP signifie aussi que l'effort de recherche d'un vaccin antipaludique ne devrait pas se limiter aux seuls antigènes exprimés pendant la phase de multiplication sexuée du parasite. Mais qu'il faudrait plutôt viser à obtenir des produits très efficaces, quel que soit le compartiment dans la biologie complexe du parasite dont les antigènes sont ciblés. L'initiative malERA a ramené au centre de l'attention les TBV et les VIMT. En effet un tel outil a l'avantage de pouvoir réduire la transmission et de contribuer définitivement à l'élimination ou l'éradication du paludisme.

Un vaccin VITP nécessitera de développer de nouvelles approches de dispensation du vaccin, de nouveaux types d'adjuvants, mais aussi des approches meilleures pour mesurer le niveau de la transmission et les réponses immunitaires effectrices des personnes. Enfin il sera

nécessaire de mieux comprendre la dynamique entre la multiplication des parasites, la gamécytogenèse et la transmission du paludisme dans les populations humaines.

Des tests fiables pour évaluer l'effet de blocage de la transmission sont nécessaires. Le test SMFA (Standard Membrane Feeding Assay) ou test standard pour gorger sur membrane a été validé en comparaison avec l'infection expérimentale des moustiques sur porteurs de gamétocytes (181;182) et représente un test convenable de mesure de l'activité de blocage de la transmission d'un sérum donné. Le SMFA exige de la main d'œuvre qualifiée, une capacité d'élever les moustiques et peut varier selon les laboratoires. Le SMFA a fait l'objet d'une qualification qui en valide certains paramètres telle la précision, la linéarité, les valeurs limites et la spécificité (183). Cela améliore les limites de ce test reste qui encore le test de référence de la mesure de l'activité de blocage de la transmission du sérum. La transmission du paludisme est hétérogène et des foyers chauds de transmission ont été mis en évidence. Il a été estimé qu'environ 20% des foyers contribuent à 80% de la transmission (184). Il en résulte qu'un vaccin visant à interrompre la transmission peut avoir un effet maximal si son déploiement cible les personnes vivant dans les concessions constituant les foyers chauds de transmission dans une communauté donnée.

Les antigènes candidats TBV actuellement en développement sont basés sur les antigènes exprimés au niveau des gamétocytes et des gamètes, antigènes dits de pré fertilisation ou au niveau du zygote ou de l'ookinète, antigènes dits de post fertilisation. Les antigènes P48/45 et P230 sont typiques des antigènes de pré fertilisation. Puisque ces antigènes sont exprimés au niveau du gamétocyte, un effet de stimulation naturelle peut être attendu. P25 et P28 sont les chefs de file des antigènes post fertilisation. Les protéines P48/45, P230, P25 et P28 ont fait l'objet de nombreuses études résumées dans deux revues (77;111)). Ces études ont montré que ces protéines sont indispensables à la formation des sporozoïtes. Leur structure est riche en cystéine avec de multiples liens bisulfites entraînant une conformation tertiaire difficile à reproduire avec les systèmes d'expression usuels. Des approches nouvelles de conjugaison chimique avec l'exo protéine A recombinante de *Pseudomona Aeruginosa* (EPA) ou de co-administration avec les oligodeoxynucléotides CpG ont permis d'obtenir un candidat Pfs25 (*P. falciparum sexual antigen 25*) ayant induit une réponse immunitaire significative. Pfs25 est l'antigène TBV qui a progressé jusqu'au stade des évaluations cliniques.

Cette revue des antigènes de *P. falciparum* en fonction du cycle biologique a été limitée aux antigènes d'intérêt ayant fait l'objet d'évaluations précliniques ou d'essais cliniques. L'OMS a recensé l'ensemble des antigènes candidat vaccins antipaludiques en phase avancée de développement préclinique ou clinique dans un tableau dénommé tableau arc-en-ciel (http://www.who.int/immunization/research/development/Rainbow_tables/en/; accédé le 22 août 2014). Ce tableau précise pour chaque antigène vaccinal, le promoteur, le niveau du développement préclinique ou clinique, les pays où les différentes études sont conduites, les références des publications. Ce tableau, réalisé grâce à l'apport des promoteurs, des agences de financement et des investigateurs actifs dans la recherche du vaccin contre le paludisme (111), représente à ce jour le recensement public le plus complet des candidats vaccins antipaludiques en cours de développement. Il ressort de notre brève revue que la majorité des approches est basée sur les vaccins sous unitaires. Les approches organisme entier ont le vent en poupe actuellement du fait des travaux récents de Sanaria (122). Toutefois cela ne devrait pas décourager l'effort vers les candidats basés sur des antigènes parasitaires (185). Malgré les progrès importants accomplis, nous restons encore éloigné d'un vaccin qui soit un outil significatif dans l'arsenal antipaludique et qui puisse atteindre le niveau de 80% d'efficacité prôné par la feuille de route technologique de l'OMS en 2013. La compréhension plus intime et précise des interactions hôte parasite à chaque étape du cycle biologique de *P. falciparum* aidera à accélérer la marche vers le but d'obtenir le vaccin antipaludique souhaité.

2.4 Méthodes d'analyse de la diversité antigénique d'AMA1

La protéine AMA1 a été d'abord décrite comme un antigène de surface du mérozoïte de *Plasmodium knowlesi*, identifiée à l'aide d'anticorps monoclonaux générés chez le rat et dénommée Pk66 (186). Puis une protéine de 622 acides aminés a été décrite chez *Plasmodium falciparum*, ayant les caractéristiques d'une protéine intégrale de membrane. Elle a été dénommée AMA1 (28). Présente chez le schizonte mature, AMA1 a été localisée au niveau du complexe apical du mérozoïte et exportée à la surface du mérozoïte au moment de la rupture du schizonte (28). Cette protéine de 83kDa a aussi été dénommée Pf83 (187). Au moment de la rupture du schizonte, Pf83 est clivée en un fragment de 66kDa qui est transporté à la surface du mérozoïte. Ce fragment est homologue à Pk66 de *P. knowlesi* (188). AMA1 est rencontré dans les différents genres du phylum Apicomplexa. Elle se localise au niveau du complexe apical propre à ces protozoaires. Le gène *ama1* codant pour la protéine est localisé au niveau du chromosome 11 de *P. falciparum*. Sa séquence a été déterminée chez plusieurs espèces plasmodiales. Elle est relativement bien conservée entre les espèces de plasmodies et

les genres du phylum Apicomplexa. Sa suppression rend le parasite inapte à survivre, traduisant le caractère essentiel d'AMA1 (189).

Durant le cycle biologique de *P. falciparum* l'expression d'AMA1 est maximale au stade du schizonte mûr. La protéine de 83kDa fait l'objet d'un clivage protéolytique en un fragment de 66kDa au moment de la rupture de l'érythrocyte infecté et de la libération des mérozoïtes. Les études d'immunomicroscopie électronique du développement des mérozoïtes ont permis de confirmer la localisation d'AMA1 au niveau des micronèmes (190) et non plus des rhoptries comme cela avait été longtemps admis. Au moment de l'invasion de l'érythrocyte le fragment de 66kDa est encore lysé en un autre de 48kDa qui se distribue sur la surface du mérozoïte.

AMA1 comprend deux séquences hydrophobiques, une au niveau N-terminal qui constitue la masse de l'ectodomaine et une seconde de 21 acides aminés, transmembranaire et située à 55 acides aminés de la petite portion C-terminale, qui elle, est cytoplasmique. Cette portion C-terminale contient dans sa partie la plus terminale deux acides aminés conservés de tyrosine qui sont des sites potentiels de phosphorylation. L'ectodomaine se divise en trois domaines, DI, DII, DIII et contient 16 cystéines composant les ponts disulfures déterminant sa structure tertiaire (188).

Les techniques de clonage, de screening de bibliothèques d'ADN à l'aide d'anticorps monoclonaux et de séquençage ont permis la description d'AMA1 (28;187). Les approches technologiques de pointe de la résonance magnétique nucléaire (RMN) et de la cristallographie ont permis de mieux caractériser la structure d'AMA1 et de proposer une représentation en trois dimensions. Nair *et al.*, 2002, ont décrit la structure du domaine DIII et confirmé la présence des ponts disulfures en appliquant la RMN (191). La première structure en cristallographie a été proposée pour *P. vivax* (192), confirmant la structure en trois domaines, la mise en évidence d'interactions entre les domaines mais aussi la présence de régions sans structures. Puis la structure en cristal des domaines DI et DII de *P. falciparum* (193) a mis en évidence la présence d'une région, siège d'un polymorphisme prononcé sous forme de mutations ponctuelles de nucléotides (SNPs) au niveau d'un regroupement d'acides aminés qui entourent une poche hydrophobe, constituant probablement un épitope important. Cette région a été cartographiée au niveau de DI, constituant la grappe 1 de la boucle, donnant à partir de l'expression en anglais, l'acronyme c1L, pour cluster 1 loop. Les

sites polymorphiques ont également tous été détectés au niveau d'une face d'AMA1, la partie probablement exposée au système immunitaire.

La fonction d'AMA1 a fait l'objet de plusieurs études. La localisation de la protéine au niveau du complexe apical a attiré l'attention sur son rôle dans l'invasion du globule rouge. Ce rôle a été renforcé par le constat que les anticorps monoclonaux anti-AMA1 inhibent la croissance *in vitro* de *P. falciparum*. AMA1 a été mise en évidence au niveau du sporozoïte et l'hypothèse d'un rôle dans l'invasion de l'hépatocyte a été émise (194). Plus tard le rôle clef d'AMA1 a été mis en évidence grâce aux techniques de l'immunomicroscopie électronique, de la spectrométrie de masse, de l'imagerie tridimensionnelle en microscopie électronique, à la disponibilité de la séquence du génome de plusieurs espèces plasmodiales, aux analyses du protéome et de la transcription. AMA1 interagit avec les protéines des rophies dénommées RON (rhoptry neck protein) dans le processus de formation de la jonction serrée. L'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte suit un mécanisme bien précis qui passe par l'accrochage, la fixation, l'orientation, la formation d'une jonction serrée et la pénétration par formation d'une vacuole parasitophore. Cowan *et al.*, 2012, ont produit une revue complète de ce phénomène (195). AMA1 intervient au moment de la formation de la jonction serrée, étape cruciale de l'invasion du globule rouge. AMA1 se lie aux protéines RON2, 4 et 5 pour former un complexe (196) qui arrime le mérozoïte à la surface de l'érythrocyte pendant que les structures de mobilité constituées d'actine et de myosine assurent le glissement du mérozoïte à l'intérieur d'une invagination de la membrane érythrocytaire (197). Un peptide monoclonal la R1 peut se fixer spécifiquement au niveau de la boucle hydrophobique d'AMA1 et empêcher la liaison entre AMA1 et le complexe RON. Ce blocage inhibe l'invasion de l'érythrocyte (196), comme le fait l'anticorps monoclonal 4G2 qui a aussi une action inhibitrice (198) en se liant à la même boucle hydrophobique d'AMA1.

Le gène *ama1* codant pour l'antigène parasite est le siège de mutations ponctuelles de nucléotides (SNPs) qui déterminent un polymorphisme important de l'antigène. Toutefois la séquence d'AMA1 est relativement conservée entre les différentes espèces plasmodiales si on le compare avec d'autres antigènes de surface du mérozoïte, tel la MSP1 (199). On note une homologie de structure de 85% entre les différents AMA1 du genre plasmodium (185). Cartographiée sur la structure en cristal d'AMA1 (193), les sites de substitutions d'acides aminés ont une distribution particulière. Elles sont plus fréquentes au niveau du domaine DI. Il s'agit généralement de substitutions dimorphiques avec deux acides aminés possibles. AMA1 présente une face polymorphique et une autre face qui ne montre pas

d'acides aminés variables. La face polymorphique concentre l'essentiel du polymorphisme. Il s'agit probablement de la face exposée au système immunitaire. Les positions d'acides aminés 187, 197, 200, 230 et 245 représentent cinq positions parmi les plus polymorphiques. Ces positions bordent la boucle hydrophobe qui constitue l'épitope de liaison de l'anticorps monoclonal 4G2. Dutta *et al.*, 2007, ont utilisé le concept d'acides aminés d'échappement en anglais antigen escape residue (AER) pour désigner l'aptitude d'un acide aminé polymorphique à échapper à la réponse immunitaire. En utilisant les expériences de souris immunisées et les tests *in vitro* d'inhibition de la croissance (Growth Inhibition Assay, GIA), ils ont montré que les polymorphismes regroupés autour de la boucle hydrophobe dans la partie c1L ont la plus grande capacité inhibitrice (100). Cette région d'AMA1 a ainsi été identifiée comme critique pour la réponse immunitaire efficace anti-AMA1. Dans le modèle murin, l'épreuve d'infection à *Plasmodium chabaudi* a entraîné une réponse immunitaire anti-AMA1 spécifique d'allèle (200). Chez l'homme les IgG anti-AMA1 purifiées par affinité ont inhibé la croissance des parasites *in vitro* avec une plus grande efficacité pour la souche homologe 3D7 et une moindre efficacité pour la souche hétérologue HB3. La séquence HB3 d'AMA1 utilisée diffère de 23 acides aminés de la séquence d'AMA1 3D7, 16 de ces différences ayant lieu au niveau du domaine DI (201). Ces études indiquent que la réponse immunitaire anti-AMA1 pourrait être spécifique d'allèle. L'identification du polymorphisme antigénique d'AMA1 pourrait être utile dans la détermination de groupes d'allèles pertinents du point de vue de la réponse immunitaire spécifique qu'ils pourraient induire. De tels groupes ou "sérotypes" pourraient être utiles dans la détermination de la valence d'un vaccin basé sur AMA1 (102). Une étude du polymorphisme d'AMA1 en Papouasie-Nouvelle Guinée a montré la possibilité d'une exposition d'AMA1 à la pression immunitaire et son association possible avec la morbidité liée *P. falciparum* (202).

Dans notre site d'étude à Bandiagara, nous avons utilisé une approche d'épidémiologie moléculaire pour déterminer la distribution des haplotypes d'AMA1 (36). Au cours d'une étude de cohorte prospective, conçue pour déterminer l'incidence spécifique par âge du paludisme de 1999 à 2001, 100 enfants ont été choisis au hasard dans trois classes d'âge, moins de 5 ans, 5-11 ans et plus de 11 ans. Ces enfants ont fait l'objet d'un suivi passif et actif avec le but de déterminer l'incidence de l'infection paludémique et de la maladie paludémique. Chaque année, de juin à janvier chaque enfant a donné une goutte de sang pour confectionner une goutte épaisse et un confetti par passage mensuel et à l'occasion de chaque épisode clinique de paludisme. La PCR nichée a été utilisée pour amplifier les fragments d'AMA1 qui se

recouvrent. Les produits de PCR ont été séquencés. Les séquences ont été éditées et alignées à l'aide du logiciel Sequencher 4.7 (Gene Codes). Aux sites polymorphiques les infections ont été classées comme multi-allèles en cas de présence d'un pic secondaire >50% du pic primaire. Au total, 758 contigs complets ont été générés, couvrant les aminoacides des positions 149 à 552 de l'ectodomaine d'AMA1. Une extrême diversité antigénique a été observée: 506 séquences uniques ou avec un clone prédominant ont été observées permettant la détermination des haplotypes. Dans le cas de 242 séquences deux ou plusieurs clones étaient présents, traduisant une infection mixte avec impossibilité de déduire les haplotypes. Parmi les 1212 nucléotides amplifiés, 77 SNPs ont été détectés, ce qui a donné 62 positions polymorphiques d'acides aminés. On a observé 46 positions dimorphiques, 13 trimorphiques et trois positions avec 4 à 6 aminoacides possibles. Les positions les plus polymorphiques constituent un groupe autour de la boucle hydrophobe, dénommée c1L. Sur les trois domaines, DI était le plus variable avec 36 positions d'acides aminés polymorphiques sur un total de 154 (23%), suivi par DIII avec 8 sur 67 aminoacides polymorphiques, soit 12%; et enfin DII avec 11 sur 99 aminoacides polymorphiques, soit 11%. Le profil de polymorphisme observé pendant une année s'est maintenu au cours des deux années suivantes. Sur la base des 62 aminoacides polymorphiques, 214 haplotypes uniques ont été déduites. La fréquence individuelle d'un haplotype variait entre 0,2 et 3,6%. L'haplotype dont la séquence correspondait parfaitement à celle de 3D7, la souche source du vaccin candidat qui a été testé à Bandiagara, avait une fréquence de 3,0%. La moitié des haplotypes (50,9%) ont été observés une fois seulement dans la base de données. Une telle diversité signifierait qu'un vaccin anti-AMA1 efficace contre tous les variantes devraient être avoir au moins une valence de 214.

En considérant la dynamique intra hôtes de la survenue des SNPs le polymorphisme a été analysé de façon longitudinale et en relation avec l'occurrence des signes cliniques. Avec les données cliniques et moléculaires l'analyse de la diversité dans le temps a été effectuée. L'hypothèse de notre collègue Takala, était que l'immunité spécifique d'allèle, rendrait un individu plus susceptible à devenir malade s'il était infecté par un parasite affichant un allèle nouveau différent de ce que l'individu avait déjà rencontré, en ce qui concerne certaines régions immunodominantes. Pour tester cette hypothèse, un modèle de régression logistique a été utilisé pour estimer si les changements au niveau de groupes spécifiques d'acides aminés hautement polymorphiques étaient associés à la survenue des signes ou symptômes cliniques dans le second épisode d'infection de l'individu, en considérant les paires d'épisodes

d'infections successives du même individu. Le critère primaire de jugement du modèle de régression était la nature du second épisode consécutif (symptomatique détectée par le système de surveillance passive mis en place pour la prise en charge des personnes malades en quête de soins) ou asymptomatique (détecté par le système de surveillance active mis en place et consistant à effectuer une fois par mois un prélèvement de sang systématique). La variable explicative primaire était la proportion d'acides aminés ayant changé dans un groupe donné entre les deux épisodes successifs d'infection. La proportion d'acides aminés ayant changé est présentée comme une variable ordinaire, constituée des modalités Elevé, Moyenne et Faible correspondants respectivement au troisième, deuxième et premier quartile de la distribution ordonnée du nombre d'acides aminés ayant changé. La proportion d'acides aminés a été examinée dans les trois grands domaines de l'ectodomaine d'AMA1, mais aussi au niveau de groupes du domaine DI tels que définis par Dutta *et al.*, 2007 (100). Le modèle de régression logistique a calculé l'OR et son intervalle de confiance à 95% comparant les changements "modéré" (Moyen versus Faible) et "élevé" (Elevé versus Faible ou Elevé versus Moyen) de proportions d'acides aminés, entre les intervalles où l'épisode suivant d'infection est symptomatique à ceux où l'infection est restée asymptomatique. Les effets ont été ajustés en fonction de l'âge et le temps entre deux épisodes consécutifs a été limité à 6 semaines au plus. Au total 133 épisodes consécutifs d'infections séparés par six semaines ou moins ont été inclus dans le modèle. Les changements d'acides aminés ont été significativement associés à la survenue de symptômes. Un effet dose-réponse a été observé, signifiant un OR plus important quand une plus grande proportion d'acides aminés changeait (par exemple Elevé vs. Faible plus significatif qu'Elevé vs. Moyen). Les changements étaient plus significatifs s'ils survenaient dans la portion c1 (positions 187 à 231 des acides aminés) de DI. Et il semble que les changements au niveau c1 et de c1L (positions 196 à 207 des acides aminés) déterminent les changements observés au niveau de DI. Ces analyses confirment le rôle critique que joue la portion c1L comme épitope gouvernant la réponse immunitaire protectrice induite par AMA1. D'autres études ont eu la même conclusion. Ces analyses suggèrent aussi que le polymorphisme au niveau de DI, de c1 ou de c1L peuvent être utilisés pour regrouper les parasites en populations ayant les mêmes réactions face aux réponses immunitaires. Les huit acides aminés polymorphiques dans c1L (positions 196, 197, 199, 200, 201, 204, 206, 207) peuvent définir 25 haplotypes uniques parmi les 506 infections clonales ou à clone prédominant de Bandiagara. Les haplotypes basés sur c1L ont une fréquence entre 0,2 et 15,0% avec seulement 16% des haplotypes ayant été observé de façon unique dans la base de données. Les 10 premiers haplotypes c1L par ordre de fréquence, regroupent 81% des

infections observées dans notre cohorte. Dans ce regroupement, l'haplotype c1L de 3D7 représente 13.4% des infections et c1L de la souche FVO a une fréquence de 5,7%. Ainsi une classification basée sur des épitopes immunologiquement importants peut permettre de réduire la valence d'un potentiel vaccin antipaludique basé sur AMA1 d'une amplitude d'environ 20, soit de plus de 200 à environ un dizaine. Cette étude a aussi examiné la distribution des haplotypes d'AMA1 sur l'ensemble des séquences publiquement disponibles au niveau de Genbank. Sur l'ensemble des 615 séquences dans Genbank, 171 provenaient d'Afrique, 380 d'Asie et 58 d'Amérique du Sud. Le même profil de diversité d'AMA1 a été observé, sans que le nombre de nouveau variant soit significativement augmenté. En considérant le polymorphisme limité au groupe c1L, en Afrique une prédominance des souches 3D7 est observée avec une fréquence de 14% alors que FVO prédomine en Asie à 21% et que la souche 7G8 est plus fréquente en Amérique du Sud avec plus de 50%. Cela soulève la possibilité qu'il soit utile de concevoir un vaccin avec une efficacité limitée à des aires géographiques définies (36;102).

2.5 Développement clinique d'un vaccin antipaludique

Le développement clinique d'un vaccin suit une série logique d'évaluations liées les unes aux autres dans un processus itératif qui vise à définir les caractéristiques du produit en termes de tolérance, de réponse immunitaire induite, de schéma de vaccination et d'efficacité. Au terme du développement clinique, le candidat vaccin antipaludique devient un vaccin aux indications précises. Le développement clinique intervient suite aux études sur le modèle animal et représente un parcours de combattant jalonné d'essais cliniques chez l'homme.

Les modèles animaux ne peuvent reproduire de façon satisfaisante l'infection à *P. falciparum*, ni la réponse immune qu'induirait un vaccin (203) chez l'homme. Les conclusions de ces essais ne peuvent être extrapolées à l'homme de façon fiable. Il est impératif que le candidat vaccin antipaludique soit testé sur les sujets à risque de paludisme vivant en zone d'endémie, et qui aussi bénéficieraient le plus du vaccin. Dans le cas des vaccins des stades sanguins asexués, les essais d'efficacité à petite échelle, conduits en zone de forte incidence du paludisme apparaissent comme le chemin le plus court dans le développement clinique pour arriver à un produit fini et commercialisable (204;205). Ces essais en zone d'endémie exigent qu'il y existent des sites capables de les conduire. Les candidats vaccins antipaludiques doivent être rigoureusement évalués. Les études sur l'efficacité et les effets secondaires interviennent avant et après la mise sur le marché du vaccin pour usage. Les

évaluations avant la mise sur le marché ("prelicensing vaccine trials") comportent classiquement 3 phases (206):

2.5.1 Les essais de Phase I : Ils correspondent à la première administration du candidat vaccin chez l'homme. Ces essais évaluent la tolérance et l'immunogénicité du candidat vaccin. Le nombre de volontaires est réduit : environ 10-120 personnes, d'abord chez les adultes puis chez les enfants. En phase I on peut aussi tester différentes doses et différents schémas de vaccination. Les essais en phase I portant sur des participants non exposés au paludisme ont été dénommés essais de phase Ia et ceux chez les participants vivant en zone d'endémie et naturellement exposés au paludisme ont été dénommés essai de phase Ib.

2.5.2 Les essais de Phase II : Le but de ces essais est d'établir la preuve de la protection conférée par le candidat vaccin. Un effectif plus important est inclus (n=200-600) ; cette phase évalue l'efficacité, l'immunogénicité et continue d'évaluer la tolérance du vaccin. On distingue les essais de phase 2a, où la protection est évaluée suite à « un challenge artificiel » ; c'est-à-dire à une épreuve d'infection expérimentale des participants. Les essais de phase 2b portent sur les populations réellement à risque et exposées à l'inoculum parasitaire naturel. Dans le processus du développement clinique, la décision critique de poursuivre le développement du vaccin est prise suite aux résultats obtenus en phase II.

2.5.3 Les essais de Phase III : Ils confirment l'efficacité du candidat vaccin qui a donné ses preuves en phase II. Ces essais portent sur un grand échantillon (n=1200-15000) Les critères de jugement peuvent comprendre la mortalité liée au paludisme ou l'incidence des formes graves et compliquées. La phase III permet aussi d'évaluer le niveau et la durée de protection, l'importance des effets secondaires dans une plus large population. Les résultats de phase III sont critiques pour l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché.

2.5.4 Les essais de phase IV : Ces essais comportent les évaluations après la mise sur le marché ("post-licensing monitoring") du vaccin. Il s'agit non seulement de l'évaluation continue de l'efficacité du vaccin, mais aussi de l'amélioration des pratiques vaccinales et de la détection des effets secondaires rares. Ils visent à améliorer le mode d'administration, à réduire au maximum les doses, à mettre au point un système de chaîne de froid pratique surtout pour les pays chauds, à rechercher d'autres indications sur le terrain, à mettre au point les grandes lignes opérationnelles pour la conduite des programmes de vaccinations sur le terrain (formation des agents ou des équipes mobiles, instruments utilisés, surveillance et

évaluation des programmes de vaccination; améliorer et rationaliser la gestion, extension des zones d'intervention).

2.5.5 Les conditions de réalisation des essais cliniques : La conduite des essais clinique exige le respect des principes des Bonnes Pratiques Cliniques (BPCs) de la Conférence Internationale de l'Harmonisation (CIH)s et des principes éthiques. En plus les règlements en vigueur en République du Mali doivent être respectés. Enfin les principes de la FDA (Food and Drug Administration, l'agence américaine du médicament) et des promoteurs doivent être aussi respectés. Le suivi strict de ces différents principes est réalisé à travers le respect des normes des BPCs. Les BPCs et les considérations éthiques dans la conduite des essais cliniques font suite à différents abus constatés dans l'histoire, comme les expérimentations atroces des médecins nazis dans les camps de concentration, et l'étude de l'évolution naturelle de la syphilis dans la population noire de Tuskegee aux Etats-Unis. En plus du respect de la personne humaine comme sujet d'étude, l'autre élément capital qui a favorisé l'évolution vers le concept de BPCs est la validité scientifique d'une étude et la fiabilité des résultats obtenus. Sous l'impulsion de l'industrie pharmaceutique des pays développés, avec les représentants des gouvernements des Etats-Unis (FDA), du Japon (Ministère Nippon de la Santé) et l'Union Européenne (Agence Européenne d'Evaluation du Médicaments), et la participation du Canada, de l'Australie et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), une rencontre d'harmonisation s'est tenue en 1990 à Bruxelles dans le but de convenir de normes internationales acceptées par tous pour la conduite et le rapport des essais cliniques. La conférence internationale d'harmonisation (CIH) a édicté des directives couvrant tous les aspects de la recherche clinique et de l'évaluation de nouveaux produits (médicaments, vaccins, tests diagnostiques etc...). La directive E6 de la CIH traite des BPCs (<http://www.ich.org>).

2.5.6 Les Bonnes Pratiques Cliniques (BPCs) : On définit une bonne pratique clinique comme une norme de qualité éthique et scientifique internationale s'appliquant à la conception et à la réalisation d'essais auxquels participent des sujets humains ainsi qu'à l'enregistrement et à la présentation des données relatives à ces essais. Le respect d'une telle norme garantit au public que les droits, la sécurité et le bien-être des sujets participant à l'essai sont protégés, conformément aux principes découlant de la Déclaration d'Helsinki, et que les données sur les essais cliniques sont fiables.

Les Principes des BPCs : sont détaillés dans la directive E6 de la CIH. Les principaux éléments sont :

1. La Conduite des essais doit se faire en accord avec la déclaration d'Helsinki, les BPCs et les lois et règlements en vigueur ;

2. Soupeser les risques par rapport aux bénéfices pour les sujets d'étude avant le début de l'étude ;

3. Les droits, la sécurité et le bien-être des sujets doivent prévaloir ;

4. L'essai clinique proposé doit se baser sur toutes les données pré cliniques disponibles ainsi que toute information clinique ;

5. L'étude doit être conduite suivant un protocole incluant une description scientifique rigoureuse ;

6. Il faut au coller au protocole qui doit être approuvé par un comité d'éthique indépendant ;

7. Les soins médicaux aux participants à l'étude doivent être dispensés par un personnel médical qualifié ;

8. Tout le personnel de l'essai doit être qualifié par la formation et par l'expérience ;

9. Il faut obtenir librement un consentement éclairé de chaque volontaire ;

10. Il faut manipuler et conserver toute information de l'essai pour un rapport valide, une interprétation appropriée et la vérification ;

11. Il faut assurer la confidentialité de toute information générée par l'essai ;

12. Il faut fabriquer, manipuler et conserver les produits expérimentaux selon les Bonnes Pratiques de Fabrication (GMPs pour Good Manufacturing Practices) ;

13. Il faut mettre en œuvre un système et des procédures qui assurent la qualité de tout l'essai ;

Les BPCs précisent aussi les rôles et responsabilités des promoteurs, des investigateurs et des comités d'éthiques indépendants, de même que le contenu et la structure de la brochure

de l'investigateur. Le laboratoire impliqué dans un essai doit se conformer aux normes du Guide de Bonne Exécution des Analyses (GBEA), en France, et aux Etats-Unis, cela correspond aux standards du Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA).

2.5.7 Les considérations éthiques : Les principes de l'éthique doivent être strictement respectés au cours des différentes phases des essais. Ces principes comprennent essentiellement le respect de l'autonomie des participants, la garantie que l'essai leur soit bénéfique et le choix juste des participants. Ces principes sont respectés quand on applique les normes des BPCs. Plus spécifiquement en se posant certaines questions, expliquées en détails par Emanuel et al., 2000, (207), on peut vérifier la prise en compte des principes éthiques dans le cadre de la recherche impliquant des sujets humains :

- Quelle est la valeur scientifique de l'étude pour la société ? Cela rassure que l'essai est pertinent pour la population d'étude. Dans le cas du vaccin antipaludique la pertinence au Mali est évidente compte tenu de la charge de morbidité liée au paludisme.
- Quelle est la validité scientifique de la méthode utilisée ? La réponse à cette question rassure que l'essai n'est pas inutile et que les résultats pourraient être utilisés
- Le choix des participants est-il juste ? Cela évite d'inclure dans l'étude des sous groupes vulnérables entraînant leur exploitation.
- Le ratio risques-bénéfices est -il favorable ? Cela permet de minimiser les risques et de maximiser les bénéfices
- La revue par un comité d'éthique indépendant a-t-il été réalisé ? Cela permet une procédure de prise en compte du bien-être des participants à l'essai clinique et du respect des intérêts de la communauté.
- Le consentement éclairé écrit est-il obtenu pour chaque participant ? Cela permet de respecter l'autonomie du participant
- Les participants à l'essai peuvent-ils se retirer quand ils le souhaitent librement ? Leur confidentialité est-elle garantie ? Leur bien-être est-il assuré ? Est-il prévu de les tenir informés de la découverte de nouveaux risques/bénéfices liés au produit testé et de les informer des résultats de la recherche ? La réponse à ces questions couvre différents aspects du respect et de l'autonomie de la personne humaine.

2.5.8 *Eléments de préparation des sites* : L'élément nouveau qui pourrait constituer une impulsion fondamentale à la recherche antipaludique de ces dernières années est l'implication aux niveaux conceptuels et de mise en œuvre des chercheurs africains des pays d'endémie (208). La formation de ces chercheurs dans les différents domaines de la biologie moléculaire, de l'immunologie et de l'immunogénétique, de la bio informatique, de l'épidémiologie y compris la méthodologie des essais cliniques et l'analyse des données permet de constituer progressivement une masse critique d'expertise diversifiée ayant un background particulier et donc capable d'approcher la problématique du vaccin antipaludique de façon originale et novatrice. L'effort de préparation de site consiste à former le personnel des sites d'essais futurs, à les équiper en matériels, à doter les sites en infrastructures adéquates, à assurer le support logistique convenable, à établir une organisation avec des normes d'assurance de qualité de niveau international, à déterminer les caractéristiques épidémiologiques et cliniques locales du paludisme ; tout cela se met en place dans le cadre d'un réseau de partenariat multilatéral nord-sud et sud-sud. Le réseau de scientifiques africains et des pays développés, en interaction régulière est l'autre dimension d'un futur succès dans la recherche du vaccin antipaludique.

2.5.9 *La formation du personnel* : comprend d'abord l'identification des domaines où l'expertise doit être acquise. Ensuite il faut identifier le chercheur ayant le profil le plus adapté à la situation. Enfin une institution partenaire sera identifiée maîtrisant la technologie et ayant la volonté de procéder à un transfert de technologie avec renforcement de capacités subséquentes dans le laboratoire du sud. Il faut au niveau des institutions du sud et du nord trouver des scientifiques reconnus faisant autorité dans leur domaine d'expertise, qui serviront de mentors de la formation. Ce modèle de renforcement de capacité (85) suppose un engagement à long terme des partenaires impliqués.

2.5.10 *Le réseau de partenaires* : La constitution d'un réseau international de partenaires est un élément clef à considérer. Cela signifie aussi de mettre ensemble des groupes ayant des objectifs, des structures et des modalités de fonctionnement, complètement différents, mais qui partagent une vision similaire sur un problème. La recherche de solutions à ce problème constitue une occasion d'échanges qui peut être fructueux et profitable à tous. Ce partenariat gagnerait à comprendre au moins une institution de recherche d'un pays développé, une institution de recherche d'un pays en développement, un ou plusieurs organismes de financement. Ce nouveau type de partenariat apporte une dimension novatrice : l'institution du pays développé tire de l'interaction, autant sinon plus de bénéfices que

l'institution du pays en développement. La relation bailleur de fonds - consommateur de fonds disparaît au profit d'une situation d'échanges entre partenaires où tout le monde donne et reçoit des valeurs de nature financière ou en terme d'expertise, d'expérience à partager. Le réseau de partenaires ne doit pas fonctionner en vase clos. Il devra être ouvert à d'autres réseaux et à d'autres groupes.

Les initiatives foisonnent dans le domaine de la recherche sur le paludisme. Des initiatives tels le MIM (Multilateral Initiative against Malaria), le MMV (Malaria Medicines Venture), le MVI (Malaria Vaccine Initiative) et plus récemment le RBM (Roll Back Malaria) offrent des forums où les idées s'échangent et génèrent de nouvelles idées propices à faire avancer les connaissances sur les moyens de réduire la charge de morbidité du paludisme. Les chercheurs africains ont souvent été à la base de certaines de ces initiatives. Elles sont supportées par les organisations internationales tel l'OMS et sa branche TDR (Le programme de recherche sur les maladies tropicales), la Banque Mondiale ou par des organismes gouvernementaux tel le NIH (Instituts Nationaux de la Santé) des Etats-Unis ou par des sources privées tel la fondation de Bill et Melinda Gates qui est devenu à travers le MVI, une source majeure de financement de la recherche du vaccin contre le paludisme. Le réseau de partenaires offre une opportunité unique de renforcer les capacités dans les domaines de pointe. Il permet aussi l'obtention des ressources financières et matérielles, en facilitant l'accès à l'information sur les appels d'offres lancés dans le domaine de la recherche par les organismes de financement.

2.5.11 La communauté comme partenaire : La notion de réseau de partenaire devrait être étendue et couvrir les communautés des sites des essais vaccinaux. Le respect entourant les modalités de l'implication de la communauté renforce sa position de partenaire. Les structures organisées préexistantes et acceptées par une majorité de la population, ainsi que les personnes particulièrement influentes devraient être identifiées au préalable. Elles constituent la porte d'entrée qui facilite l'interaction avec la communauté. L'implication de la communauté est capitale pour la prise en compte des principes éthiques, y compris la notion de consentement éclairé écrit, individuel et collectif. Des modalités originales de mise en œuvre des principes éthiques découlent souvent de la simple écoute des membres de la communauté. Dans le cas de Bandiagara, les thérapeutes traditionnels sont les premiers pourvoyeurs de soins à la population. Pour certaines affections comme les maladies psychiatriques et le neuropaludisme, les thérapeutes traditionnels étaient les seuls recours de la population, en dépit de la présence de médecins et de services de santé modernes. Ils sont

organisés en une association respectée qui a été approchée en tant que partenaire dans le cadre de la recherche sur le paludisme grave.

2.5.12 Les ressources matérielles : L'équipement et la logistique sont nécessaires dans l'effort de préparation des sites. Des activités fondamentales telles la réalisation d'analyses de biologie clinique, la séparation et la préservation des lymphocytes, le maintien de la chaîne de froid dans les limites permises, la mise en œuvre de tests sur l'immunité à médiation cellulaire ou la détermination des titres d'anticorps exigent un équipement adéquat, la permanence d'une source d'énergie, la possibilité de communiquer continuellement. Des groupes électrogènes puissants sont nécessaires pour servir de source secours d'électricité en cas de défaillance du secteur public. Des congélateurs pouvant refroidir à -80°C et -20°C sont nécessaires pour conserver les cellules vivantes, de même qu'un système fiable d'obtention, stockage et d'utilisation de l'azote liquide. La possibilité de tester des vaccins basés sur le sporozoïte entier renforce l'importance de la disponibilité d'une chaîne de production, de stockage et de transport de l'azote liquide. L'équipement indispensable comprend aussi le nécessaire pour une réanimation d'urgence en cas de choc anaphylactique, y compris le système d'oxygénation ; un laboratoire clinique doté d'automates et d'appareillages, fonctionnant selon le GBEA et permettant de diagnostiquer une anomalie biologique chez un sujet vacciné ; une connexion rapide et fiable permettant la notification en temps réel des événements indésirables graves mais aussi permettant l'accès à Internet ; un réseau informatique local facilitant le traitement des données.

3 Nos travaux: matériel et méthodes

3.1 Description du site d'étude de Bandiagara

3.1.1 Contexte et justification du choix : Bandiagara, chef lieu de préfecture est une ville située au cœur de la région de Mopti sur le plateau Dogon entre les isohyète 200mm et 700mm (Figure 1). Le climat est caractérisé par une courte saison de pluies allant de juin-juillet à août-septembre avec une pluviométrie de 400 à 700 mm d'eau par an, et une saison sèche plus longue. La ville est traversée par une rivière, le Yamé, (Figure 2), qui entretient des gîtes larvaires propices aux anophèles longtemps après la fin de la saison des pluies. Les préfectures de Bandiagara et de Mopti ont abrité la plus grande enquête paludométrique jamais entreprise au Mali en 1993-94, avec des composantes parasitologique, clinique, socio-anthropologique, démographique, épidémiologique et entomologique. Cette étude a montré une forte prévalence du paludisme à *P. falciparum* dans la ville de Bandiagara (209). Cette étude a aussi montré une organisation communautaire forte dans laquelle les thérapeutes traditionnels jouaient un rôle important. La disponibilité de données de base de qualité sur l'épidémiologie du paludisme ont été déterminant dans le choix de Bandiagara pour la conduite d'essais cliniques de vaccins contre le paludisme.

L'engagement du MRTC dans le développement clinique de vaccins contre le paludisme avait été déjà énoncé dans les missions du centre depuis sa création en 1992. Avec le soutien financier et stratégique du NIH/NIAID, le MRTC a connu à partir de 1995 des efforts de préparations de sites de terrain, la rénovation et l'équipement du campus principal sur le site du Point G à Bamako, une politique de formation du personnel dans les différentes disciplines constituant le pool d'expertise indispensable à la conduite d'essais clinique de standard international. Bandiagara a été retenu comme le site du premier essai vaccinal.

3.1.2 Historique, population, système de santé et caractéristiques épidémiologiques : Bandiagara a été fondé vers 1770, par un grand chasseur dogon originaire de Gandakilema, Nangabanou Tembely. Depuis la localité n'a cessé de grandir pour devenir une préfecture sous l'administration coloniale, statut qu'elle a gardé après l'indépendance. La population d'environ 14 000 habitants, est constituée en majorité de dogons et de peuhls. Elle est jeune, la tranche d'âge des moins de 15 ans constituant 55% de la population. Le système de santé comprend le Centre de Référence du district (CSRef) qui offre des soins à toute la population de la préfecture, soit environ 200 000 personnes. Le CSRef abrite les locaux du centre de recherche

clinique. Il sert de centre de référence pour les Centres de Santé Communautaires (CSCOM) de la préfecture de Bandiagara, y compris ceux de la ville. Le paludisme est saisonnier à Bandiagara avec une transmission intense de juillet à décembre. La prévalence parasitaire était de 30% en saison des pluies et de 5% en saison sèche dans une cohorte d'enfant suivie de 2009 à 2014 (210). Les enfants âgés de moins de 10 ans étaient les plus atteints. L'incidence du paludisme a été calculée égale à environ 2 épisodes cliniques par enfant et par année. La formule parasitaire est prédominée par *P. falciparum* (97,5% de la formule parasitaire). Les autres espèces se partagent le reste avec des cas fréquents de coinfection avec *P. falciparum*.

3.1.3 Projet BMP et préparation du site : le projet paludisme de Bandiagara, dont la dénomination en anglais Bandiagara Malaria Project donne l'acronyme BMP a vu le jour en 1998. Il est né avec l'obtention par le MRTC en collaboration avec le CVD de l'université de Maryland, une subvention du NIAID destinée à préparer le site de Bandiagara pour la conduite des essais cliniques de vaccins contre le paludisme. Les objectifs de la préparation des sites étaient de :

- caractériser les paramètres démographiques et biologiques,
- mettre à jour les données sur la distribution du paludisme par âge, localité et en fonction du temps,
- établir un centre de recherche clinique équipé et fonctionnant selon les standards internationaux et de former le personnel du BMP pour l'acquisition des compétences requises à la conduite d'essais cliniques.

Les objectifs de renforcement de capacités ont été atteints par la conduite de plusieurs études épidémiologiques (incidence du paludisme dans une cohorte de 500 enfants; étude cas-témoin du paludisme grave, étude de cohorte des interactions paludisme - schistosomose, étude de normes biologiques, étude des paramètres entomologiques de la transmission).

3.1.4 Carte détaillée/GIS : source, Coulibaly *et al.*, Malaria Journal 2013 Mar 1;12:82.
doi: 10.1186/1475-2875-12-82.

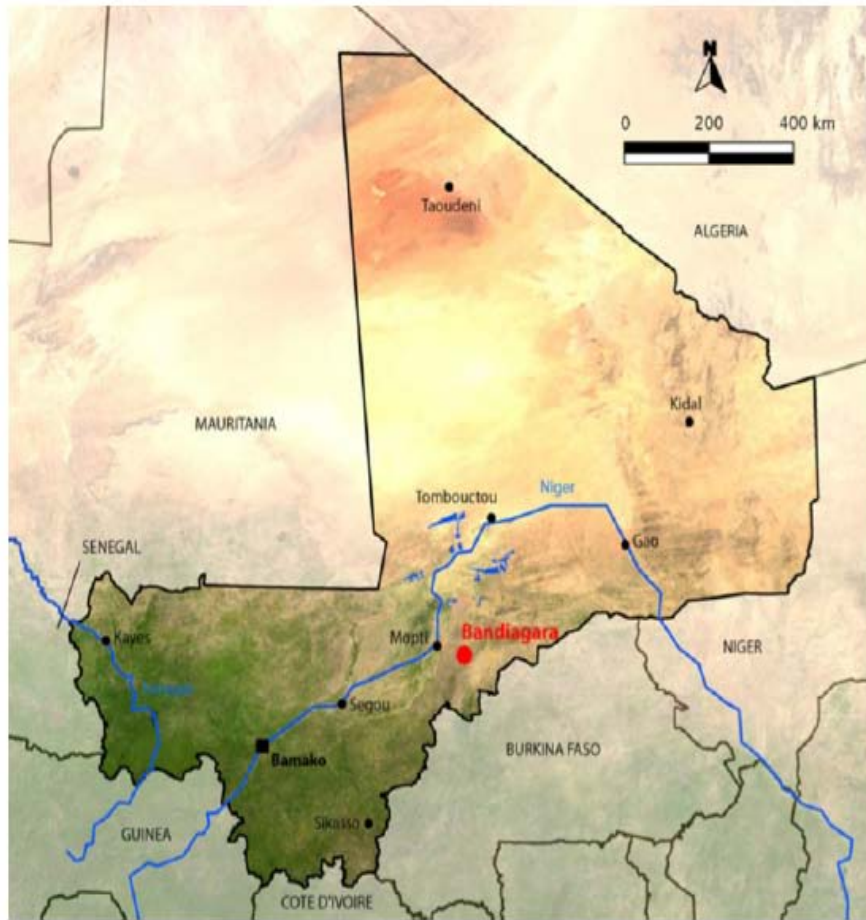


Figure 1 Map of Mali with the location of Bandiagara.

Figure 1: Carte du Mali indiquant la position de Bandiagara



Figure 2: Carte détaillée de la ville de Bandiagara (en bleu les concessions, et en noir la rivière Yamé) (Source: Dessay N et al., image Quick-bird prise le 21 novembre 2004)

3.1.5 Apport personnel de l'impétrant : le travail rapporté ici a bénéficié de la contribution d'une équipe multidisciplinaire constituée d'expertises spécifiques et ayant œuvré à l'atteinte des objectifs avec une abnégation extraordinaire. L'impétrant a exercé la responsabilité de chercheur principal des essais cliniques et de l'étude sur les normes biologiques. Sur le terrain, le rôle du chercheur principal a été essentiellement celui d'un chef d'équipe en charge de favoriser l'expression des compétences des membres de l'équipe dans les conditions optimales pour l'atteinte des objectifs. Cela a consisté à former, suivre, conseiller, orienter, superviser les membres de l'équipe et, avec eux, mettre en place des procédures qui assurent la qualité des données des essais cliniques. Cela a aussi impliqué une interaction complexe avec (i) les communautés de Bandiagara, pour la prise en compte et l'application des principes de l'éthique, (ii) avec les partenaires externes non maliens (américains, européens, multilatéraux, à l'instar de l'OMS) pour le suivi des essais cliniques; (iii) avec les autorités sanitaires et de réglementation au niveau national, régional et du district pour assurer la faisabilité des études sur le terrain ; (iv) avec le comité d'éthique institutionnel de la FMPOS pour respecter les engagements des BPCs ; enfin avec les médias pour maîtriser le flux des informations circulant autour des essais vaccinaux. Sur le plan conceptuel, l'impétrant a contribué à proposer des plans de développement cliniques des différents produits, à déterminer les objectifs des essais cliniques individuels; l'impétrant a aussi dirigé le travail du développement des protocoles des différents essais cliniques, contribué à l'élaboration des plans d'analyses en collaboration avec les experts statisticiens. Au niveau du laboratoire de biologie clinique du BMP, l'impétrant a mis en place les bases d'une bonne pratique clinique conforme aux standards des BPC/CIH et du Clinical Laboratory Improvement Amendment (en abrégé CLIA) à travers la conduite de l'étude des normes biologiques. Il a rédigé les procédures opératoires standardisées et contribué à former les techniciens de laboratoire sur la lecture, le contrôle de qualité et l'assurance qualité des lames de goutte épaisse et de frottis mince dans le diagnostic parasitologique du paludisme. L'impétrant a également contribué aux aspects moléculaires par la réalisation des réactions de PCR de détermination des SNPs au niveau du gène d'AMA1 au laboratoire du CVD-Université de Maryland à Baltimore. Enfin, une fois les résultats obtenus, l'impétrant a produit le premier brouillon de chaque article et a dirigé le processus de rédaction en collaboration avec les partenaires de Maryland.

3.2 Matériel et méthode par phases pour le vaccin candidat FMP2.1/AS02_A

Nos travaux ont porté sur le développement clinique en zone d'endémie d'un vaccin de stade sanguin dérivé de la protéine apicale 1 de *Plasmodium falciparum* (AMA1). Le candidat vaccin a été fabriqué par le Walter Reed Army Research Institute et associé à l'adjuvant de GSK-Bio AS02_A (une émulsion aqueuse spéciale et une solution saline dans un tampon phosphate + MPL + QS21), il constitue le vaccin candidat FMP2.1/AS02_A. Le profil cible de ce produit est un vaccin antipaludique qui (i) protège les enfants en Afrique et dans les pays endémiques contre les formes cliniques du paludisme en réduisant la morbidité et la mortalité liées au paludisme, (ii) peut être éventuellement associé au candidat vaccin RTS,S/AS02_A en vue d'augmenter son efficacité protectrice partielle (105). Pour atteindre cet objectif un plan de développement (PDP) clinique a été développé. Caractérisé par une approche prudente, par étapes, ce plan a visé à établir la tolérance et l'innocuité de FMP2.1/AS02_A dans une population adulte vivant en zone d'endémie d'abord, puis dans une population pédiatrique, avant de faire la preuve du concept d'efficacité dans le groupe cible des enfants vivant en zone d'endémie. Les études en zone d'endémie ont été précédées par des évaluations précliniques et cliniques sur sujets naïfs. L'évaluation clinique a constitué en un essai de phase Ia, première administration du produit chez l'homme, qui a montré une bonne tolérance et une immunogénicité importante à la fois humorale et cellulaire (211). Ensuite, un essai avec épreuve d'infection de phase IIa a été réalisé. Cet essai, contemporain de l'essai de phase IIb, n'a pas montré une efficacité protectrice significative. Toutefois, la réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR), a mis en évidence une diminution significative de la cinétique d'augmentation de la parasitémie dans le groupe FMP2.1/ AS02_A (212). Cela indique que le modèle d'infection expérimentale humaine du paludisme, acronyme en anglais CHMI, pour Controlled Human Malaria Infection, utilisé, n'est peut-être pas convenable pour tester l'efficacité d'un vaccin de stade sanguin.

3.2.1 Essai clinique contrôlé randomisé en double aveugle de phase 1 chez l'adulte : cette étude a constitué le premier essai du plan de développement (PDP) clinique et a permis la première administration de FMP2.1/AS02_A dans la population au Mali. L'objectif principal de l'essai était d'évaluer la tolérance et l'immunogénicité du candidat vaccin antipaludique du WRAIR, FMP2.1, associé à l'adjuvant AS02_A de GlaxoSmithKline Biologicals, en comparaison avec le vaccin antirabique dans une population adulte semi-immune âgée de 18 à 55 ans inclus au Mali. Les objectifs secondaires étaient de (i) mesurer l'ampleur et la durée de la réponse humorale induite par FMP2.1/AS02_A; (ii) mesurer les réponses immunes

cellulaires induites par FMP2.1/AS02_A; (iii) mesurer par GIA la capacité de la réponse immune induite par FMP2.1/AS02_A à inhiber la croissance des parasites *in vitro*; (iv) déterminer par ELISA et GIA, la spécificité de la réponse immune induite par FMP2.1/AS02_A contre différents allèles d'AMA1. La méthodologie adoptée est résumée en ses points fondamentaux ci-dessous:

- Un essai clinique randomisé avec groupe témoin et sélection de dose, de phase Ib et conduite en double aveugle à Bandiagara, centre unique, au centre de recherche clinique du BMP (diminutif en anglais pour désigner le Projet Malaria de Bandiagara)

- Dose croissante avec 25µg FMP2.1/0,25 ml d'AS02_A et 50µg FMP2.1/0,5ml d'AS02_A

- A chaque niveau de dose de FMP2.1, 30 adultes ont été tirés de façon aléatoire à recevoir FMP2.1/AS02_A (n=20) ou le vaccin antirabique (n=10)

- Le vaccin a été administré aux jours 0, 30±7 et 60±7 de l'étude, par voie intramusculaire au niveau du muscle deltoïde gauche.

- A chaque vaccination, la dose supérieure de 50µg de FMP2.1/AS02_A a été administrée au moins 14 jours après la dose inférieure de 25µg. Cet intervalle de temps a permis la revue des données de tolérance clinique et biologique jusqu'à 7 jours post-vaccination par le Comité Indépendant de Surveillance de la Tolérance. Ce Comité a donné un avis favorable pour la poursuite de la vaccination.

- Les données ont été collectées dans les cahiers d'observation, documents sources.

- L'essai a duré 12 mois par volontaire

- Chaque volontaire a fait l'objet d'un suivi de 7 jours après chaque dose (le jour de la vaccination et les jours 1, 2, 3, et 6 suivant la vaccination) pour mesurer l'incidence des évènements indésirables sollicités (EIS). Les EIS étaient locaux, (douleur au site d'injection, œdème au site d'injection, rougeur, limitation du mouvement d'abduction de l'épaule) et systémiques (fièvre [température orale ≥37,5°C], frissons, nausée, céphalée, malaise, myalgie et douleur articulaire).

- Chaque volontaire a fait l'objet d'un suivi de 30 jours (le jour de la vaccination et les 29 jours suivants) pour mesurer l'incidence des évènements indésirables non sollicités.

- Les évènements indésirables graves (EIG) ont été définis comme suit: un décès au cours de l'étude, une menace de mort, une hospitalisation au cours de l'étude ou la prolongation d'une hospitalisation, une anomalie congénitale observée dans la descendance du participant, une invalidité ou incapacité importante des facultés du participant l'empêchant de mener des activités ordinaires. Ces évènements ont fait l'objet d'un suivi étroit avec prise en charge jusqu'à la guérison

- A partir du Jour 120 d'étude, une visite à domicile mensuelle des volontaires a été effectuée par les guides. Les participants ont été invités en visite clinique au centre de recherche clinique du BMP une fois tous les trois mois.

- Le sang a été prélevé par ponction veineuse sur l'avant-bras de chaque volontaire 15 fois durant l'étude, pour une quantité totale de sang maximale de 440ml par volontaire. La tolérance biologique du vaccin candidat a été évaluée au dépistage, aux Jours 0, 7, 14, 30, 37, 44, 60, 67, 74, 90 et tous les trois mois par la suite par les tests hématologiques (Numération Formule Sanguine) et biochimiques (créatinine et ALAT sériques). Le titre des anticorps anti-AMA1, la capacité du sérum à inhiber la croissance des parasites et les réponses immunitaires cellulaires ont été déterminés sur les échantillons sanguins prélevés aux Jours 0, 14, 30, 44, 60, 74, 90 et puis tous les trois mois par la suite.

- L'analyse des données a été faite avec SPSS version 11.1 (SPSS, Chicago, Illinois, US). Le test exact de Fischer a servi à comparer les proportions entre les groupes de vaccins. L'intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne géométrique du titre des IgG a été calculé sur les données normalisées par la transformation \log_{10} . Puis les limites de l'intervalle de confiance ont été converties et présentés à l'échelle originale. Le test de Wilcoxon a servi à comparer les différences dans l'inhibition de la croissance des parasites *in vitro* en fonction des groupes de vaccination.

3.2.2 Essai clinique contrôlé et randomisé en double aveugle de phase 1b chez l'enfant : cet essai a constitué la première administration chez les enfants de FMP2.1/AS02_A. L'objectif principal était d'identifier la dose optimale de FMP2.1/AS02_A qui soit bien tolérée et fortement immunogénique chez les enfants exposés naturellement au paludisme. Pour cela il s'agissait d'évaluer la tolérance et l'immunogénicité de trois doses (10 μ g, 25 μ g et 50 μ g) du candidat vaccin antipaludique FMP2.1/AS02_A, en comparaison avec le vaccin antirabique

chez les enfants âgés de 1 à 6 ans à Bandiagara au Mali. Les objectifs secondaires étaient de mesurer par ELISA, l'ampleur et la durée de la réponse humorale induite par FMP2.1/AS02_A.

Les critères de jugement primaires de l'essai vaccinal étaient :

- (i) l'incidence des symptômes sollicités après chaque vaccination durant une période de 7 jours (le jour de vaccination et les jours 1, 2, 3 et 7 après la vaccination);

- (ii) l'incidence des symptômes non sollicités après chaque vaccination durant une période de 30 jours (le jour de vaccination et les 30 jours suivants);

- (iii) l'incidence des événements indésirables graves durant toute la période de l'étude. Le critère de jugement secondaire était le titre et l'activité des anticorps anti-FMP2.1 mesurés par ELISA aux jours de prise de sang pour la sérologie.

La méthodologie résumée ci-dessous a été adoptée:

- Essai clinique randomisé de phase Ib avec groupe témoin et sélection de dose, conduite en double aveugle au centre clinique BMP, à Bandiagara

- Suivi de l'essai par un Comité de Surveillance des Données et un moniteur médical indépendant.

- Dose croissante avec 10 μ g FMP2.1/0,1ml d'AS02_A, 25 μ g FMP2.1/0,25ml d'AS02_A et 50 μ g FMP2.1/0,5ml d'AS02_A

- 20 enfants ont été randomisés pour recevoir 10 μ g de FMP2.1/AS02_A (n=15) ou le vaccin témoin antirabique (n=5)

- 40 enfants ont été randomisés pour recevoir 25 μ g de FMP2.1/AS02_A (n=30) ou le vaccin témoin antirabique (n=10)

- 40 enfants ont été randomisés pour recevoir 50 μ g de FMP2.1/AS02_A (n=30) ou le vaccin témoin antirabique (n=10)

- Administration du vaccin aux jours 0, 30 \pm 7 et 60 \pm 7 de l'étude, par voie intramusculaire dans le muscle deltoïde gauche

- A chaque vaccination, la dose supérieure de 25µg ou de 50µg de FMP2.1/AS02_A a été administrée au moins 14 jours après la dose inférieure de 10µg ou de 25µg. Cet intervalle de temps a permis la revue des données de tolérance clinique et biologique jusqu'à 7 jours post-vaccination par le Comité de Surveillance des Données. La vaccination a été poursuivie seulement après l'obtention du feu vert de ce comité.

- La collecte des données a été faite dans les cahiers d'observation, documents sources.

- L'étude a duré 14 mois par participant

- Après chaque dose les participants ont fait l'objet d'un suivi de 7 jours (le jour de la vaccination et les jours 1, 2, 3, et 7 suivant la vaccination) pour mesurer l'incidence des évènements indésirables sollicités (EIS).

- Les EIS locaux étaient la douleur au site d'injection, l'œdème au site d'injection et la rougeur au site d'injection. Les EIS généraux (ou systémiques) étaient la fièvre (température orale $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$), la somnolence, la perte de l'appétit, les vomissements, la diarrhée, la douleur/sensibilité abdominale, l'irritabilité/agitation.

- A la suite, un suivi de 30 jours de chaque participant a été effectué pour mesurer l'incidence des évènements indésirables non sollicités.

- Les évènements indésirables graves (EIG) ont une définition standardisée décrite au niveau de l'essai chez les adultes. En bref, il s'agit d'un décès, d'une menace de mort, d'une hospitalisation au cours de l'étude ou la prolongation d'une hospitalisation, d'une anomalie congénitale observée dans la descendance du participant ou d'une invalidité ou incapacité importante. Ces évènements ont fait l'objet d'un suivi étroit avec prise en charge jusqu'à la guérison

- A partir du Jour 120 d'étude, les guides ont effectué une visite à domicile mensuelle des participants ; en plus les participants ont invités au BMP clinique tous les trois mois.

- L'analyse des critères de jugements primaire et secondaire a été réalisée au Jour 90, soit un mois après la 3^{ème} dose. Le rapport principal de l'étude a été produit à ce moment-là. Et le reste du suivi de l'étude a été faite en simple aveugle.

- Le sang a été prélevé par ponction veineuse sur l'avant-bras de chaque volontaire 11 fois durant l'étude, pour une quantité totale de sang maximale de 90ml par participant. La tolérance biologique du vaccin candidat a été évaluée au dépistage, aux Jours 0, 7, 30, 37, 60 et 90 par les tests hématologiques (Numération Formule Sanguine) et biochimiques (créatinine et ALAT sériques). Le titre des anticorps anti-AMA1, la capacité du sérum à inhiber la croissance des parasites et les réponses immunitaires cellulaires ont été déterminés sur les échantillons sanguins prélevés aux Jours 0, 30, 60, 90, 180, 272 et 364.

- L'analyse des données a été faite avec SAS version 9.2 (SAS, Cary, North Carolina, US). Les moyennes géométriques des titres d'IgG ont été comparées à différents temps par le t-test. L'intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne géométrique du titre des IgG a été calculé sur les données normalisées par la transformation \log_{10} . Puis les limites de l'intervalle de confiance ont été converties et présentés à l'échelle originale.

3.2.3 Essai clinique contrôlé et randomisé en double aveugle de phase 2b chez l'enfant : cet essai a constitué l'essai pivot de phase 2b pour évaluer l'efficacité du vaccin candidat FMP2.1/AS02A. Les objectifs spécifiques primaires étaient (i) de déterminer l'efficacité de FMP2.1/AS02A chez les enfants âgés 1-6 ans à Bandiagara, Mali, contre les premiers épisodes cliniques de paludisme (avec température axillaire $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ et parasitémie $\geq 2500/\text{mm}^3$) survenant à partir de la randomisation et jusqu'à 6 mois après la date assignée à la troisième dose du vaccin; (ii) de déterminer la tolérance du vaccin chez les enfants âgés de 1 à 6 ans. Les objectifs spécifiques secondaires étaient de :

(i) décrire la dynamique des anticorps anti-AMA-1 chez les sujets ayant reçu le vaccin antipaludique en comparaison avec la dynamique naturelle des anticorps anti-AMA-1 dans le groupe témoin;

(ii) déterminer si le titre sérique des IgG anti-AMA-1 déterminé par ELISA un mois après la troisième dose corrèle avec la protection contre le paludisme maladie;

(iii) mesurer l'efficacité spécifique d'allèle contre les parasites ayant le même génotype AMA-1 que celui de la souche 3D7 de *P. falciparum* et contre les parasites ayant un génotype différent;

(iv) déterminer l'efficacité du vaccin contre les épisodes cliniques de paludisme survenant à partir de la randomisation et jusqu'à 6 mois après la date assignée à la troisième dose du vaccin.

(v) si l'efficacité est observée par rapport à l'objectif spécifique primaire, déterminer l'efficacité du vaccin contre le premier épisode clinique de paludisme et contre tous les épisodes cliniques de paludisme (en utilisant des niveaux croissants de la parasitémie) survenant pendant les deux années après la randomisation.

Les objectifs exploratoires suivants ont été fixés :

- i) déterminer l'efficacité de FMP2.1/AS02A chez les enfants âgés d'un à six ans contre le paludisme maladie en utilisant des définitions de plus en plus spécifiques au paludisme maladie (n'importe quelle parasitémie, seuil parasitaire à 100, 1000, 2500, 5000, 10000, 20000, 50000 et 100000/mm³; associée à tout symptôme compatible avec un épisode clinique de paludisme, avec et sans fièvre mesurée) survenant à partir de la randomisation et jusqu'à 6 mois après la date assignée à la troisième dose du vaccin.
- ii) mesurer l'efficacité du vaccin en fonction de l'âge chez les enfants dans les tranches d'âge : 1-2, 3-4 et 5-6 ans
- iii) déterminer l'efficacité du vaccin contre l'infection palustre (prévalence de l'infection, densité parasitaire des formes asexuées et sexuées au cours des infections à *P. falciparum*) détectée par la surveillance active pendant l'étude.
- iv) déterminer l'efficacité du vaccin contre l'anémie
- v) déterminer l'efficacité du vaccin contre le paludisme grave
- vi) mesurer la réponse immunitaire à médiation cellulaire contre l'antigène FMP2.1 en début d'étude (niveau de référence) et après la vaccination et évaluer l'association entre cette réponse et l'efficacité du vaccin.
- vii) déterminer la spécificité des anticorps et des réponses immunitaires à médiation cellulaire en fonction des différents génotypes d'AMA-1 (3D7 et d'autres), en mesurant les réponses immunologiques (par ELISA, test d'inhibition de la croissance

(GIA), immunofluorescence, réponse immune à médiation cellulaire) aux parasites dont le génotype AMA-1 est connu.

Les critères de jugement primaires étaient :

(i) le temps écoulé jusqu'au premier épisode clinique de paludisme avec une parasitémie de $2500/\text{mm}^3$ et une température $\geq 37.5^\circ\text{C}$ survenant à partir de la randomisation et jusqu'à 6 mois après la date assignée à la troisième dose du vaccin;

(ii) l'incidence des EIS après chaque vaccination pendant une période de surveillance de sept jours (le jour de vaccination et 1, 2, 3 et 7 jours après la vaccination);

(iii) l'incidence des symptômes non sollicités après chaque vaccination pendant une période de surveillance de 30 jours (le jour de vaccination et 30 jours subséquents);

(iv) l'incidence des évènements indésirables graves survenant pendant la période d'étude.

Les critères de jugement secondaires étaient les suivants :

(a) le titre des anticorps anti-FMP2.1 aux jours de prise de sang pour la sérologie, mesuré par ELISA;

(b) le temps au premier épisode clinique de paludisme causé par les parasites ayant le même génotype AMA-1 que celui de la souche 3D7 de *P. falciparum* sur toute la séquence de la protéine ou au niveau de certains aminoacides clefs;

(c) la densité d'incidence des épisodes cliniques de paludisme survenant à partir de la randomisation et jusqu'à 6 mois après la date assignée à la troisième dose du vaccin;

(d) au cas où l'efficacité est démontrée pendant les huit mois suivant la première vaccination, le temps au premier épisode clinique de paludisme et la densité d'incidence des épisodes cliniques de paludisme (en utilisant des niveaux croissants de la parasitémie) survenant pendant les deux années après la randomisation.

La méthodologie résumée ci-dessous a été adoptée:

- Essai clinique de phase IIb, randomisé, contrôlé, à double insu (à l'insu du participant et de l'observateur) réalisé au centre clinique BMP, à Bandiagara

- Suivi de l'essai par un Comité de contrôle de la sécurité et des données (DSMB en anglais) et un moniteur médical local (LMM en anglais).

- Monitoring de l'étude délégué au DMID ou au représentant du DMID

- 400 enfants en bonne santé, de sexe masculin et féminin, âgés entre 1-6 ans et résidant dans la cité rurale de Bandiagara, Mali

- Les participants ont été randomisés selon un ratio 1:1 et selon les trois tranches d'âge, à recevoir 50µg de FMP2.1 dans 0,5mL d'adjuvant AS02_A (n=200) ou le vaccin antirabique (n=200) ; constituant ainsi les deux bras parallèles de l'essai.

- Administration du vaccin aux jours 0, 30±7 et 60±7 de l'étude, par voie intramusculaire dans le muscle deltoïde droit et gauche alternativement

- La collecte des données a été faite dans les documents sources dérivés du cahier d'observation électronique. Les données ont été saisies en temps réel dans une base de données en ligne.

- L'étude a duré approximativement 26 mois par participant

- Après chaque vaccination, les participants ont fait l'objet d'une observation directe de 60 minutes. Puis ils ont été suivis pendant 7 jours (le jour de la vaccination et les jours 1, 2, 3, et 7 suivant la vaccination) pour mesurer l'incidence des EIS. Les mêmes EIS locaux et systémique de l'essai pédiatrique de phase Ib ont été retenus. Puis un suivi de 30 jour a été réalisé pour mesurer l'incidence des évènements indésirables non sollicités.

- Les épisodes cliniques de paludisme et les EIGs ont détectés par un système de surveillance passive.

- Un système de surveillance active a également été adopté pour détecter les infections palustres asymptomatiques et les EIGs, qui ont été suivis jusqu'à leur guérison, leur stabilisation ou à la fin de l'étude

- A partir du Jour 120 d'étude, les participants ont reçu la visite à domicile mensuelle des guides ; en plus les participants ont été invités à clinique du BMP pour une visite clinique aux mois 9, 12, 18 et 24 après la randomisation. Cette visite clinique visait à évaluer la tolérance biologique à long terme des produits d'investigation.

- L'analyse primaire des critères de jugements pour les objectifs primaires et secondaires s'est faite à 8 mois après la randomisation, correspondant aux données du Jour 240 de l'étude. Le rapport principal de l'étude a été produit à ce moment-là. Et le reste du suivi de l'étude a été faite en simple aveugle.

- Le sang a été prélevé par ponction veineuse sur l'avant-bras de chaque participant 14 fois durant l'étude, pour une quantité totale de sang maximale de 102ml par participant. La tolérance biologique du vaccin candidat a été évaluée au dépistage, aux Jours 0, 7, 30, 37, 60, 67 et 90 par les tests hématologiques (Numération Formule Sanguine) et biochimiques (créatinine et ALAT sériques). Le titre des anticorps anti-AMA1, la capacité du sérum à inhiber la croissance des parasites et les réponses immunitaires cellulaires sur PBMCs ont été déterminés sur les échantillons sanguins prélevés aux Jours 0, 30, 60, 90, 150, 240, 364, 547 et 730.

- Une goutte épaisse (GE) et des frottis minces (FM) ont été réalisés tout le long de l'étude. La GE a servi à la quantification des parasites en cas de maladie ou ultérieurement. Les procédures opératoires standardisées (SOPs) du MRTC/DEAP ont été appliquées et ont permis d'assurer une lecture des lames de haute qualité par des lecteurs certifiés. La quantification des parasites a utilisé le compte des parasites sur 500 leucocytes. La densité parasitaire a été calculée en fonction de la plus récente numération des leucocytes du participant si celle-ci avait été effectuée dans les 2 semaines. Sinon, la quantification a utilisé la base de 8,000 leucocytes/mm³. La densité parasitaire exacte a été fonction du taux d'hémoglobine. Les FM ont servi au diagnostic d'espèce des plasmodies.

- Conformément aux SOPs du MRTC/DEAP en vigueur, chaque lame de GE a été lue par 2 investigateurs au moins, avec intervention d'un troisième lecteur en cas de discordance significative entre les deux lecteurs. Les lecteurs ont été tenus d'avoir leur certification valide, c'est-à-dire qu'ils devaient avoir passé leur examen de certification dans un intervalle de moins de trois ans.

- Pour tester l'hypothèse de l'efficacité spécifique d'allèle, à chaque prélèvement de sang veineux au cours de l'étude, du culot a été congelé pour l'extraction ultérieure de l'ADN et le typage des parasites, éventuellement la mise en culture des parasites dans le but de leur caractérisation moléculaire ou de la réalisation des tests *in vitro*, tel le test d'inhibition de la croissance des parasites. A chaque goutte épaisse, quelques gouttes de sang capillaire (moins

de 0,2 ml) ont été recueillies sur du papier filtre qui a été conservé pour l'analyse de l'ADN parasitaire. Ces échantillons ont servi au séquençage du gène *ama1*. Le polymorphisme antigénique a été déterminé sur la base des 8 aminoacides polymorphiques qui bordent la partie c1L du domaine I. La séquence 3D7 des 8 aminoacides de la partie c1L a été déterminée chez les récipiendaires du vaccin FMP2.1/AS02_A et du vaccin antirabique. L'efficacité spécifique d'allèle a été déterminée en fonction de ces 8 aminoacides polymorphiques.

- L'essai a été conçu pour avoir une puissance de 90% de détecter une efficacité de 20% de FMP2.1/AS02_A en supposant une incidence de 75% du premier épisode clinique de paludisme, avec un test bilatéral et un risque α de 5%. Ce faible taux d'efficacité a été retenu compte tenu de la possibilité d'une efficacité spécifique d'allèle. L'analyse primaire a estimé le risque du premier ou unique épisode clinique de paludisme en intention de traiter (analyse ITT). Les analyses secondaires de l'efficacité ont estimé le risque de survenue d'un épisode clinique de paludisme conforme à la définition du critère de jugement primaire, avec un génotype parasitaire AMA1 qui correspondait à celui de l'antigène vaccinal; le risque de survenue d'épisodes cliniques multiples de paludisme. Les mêmes risques ont été aussi évalués dans la population ayant respecté intégralement les procédures du protocole (analyse ATP portant sur les enfants ayant reçu les trois doses du vaccin alloué et ayant complété au moins un suivi de 14 jours après la troisième dose de vaccination et pour lesquels la collecte des données a commencé 14 jours après la troisième dose). L'analyse de la relation entre le titre des anticorps anti-AMA1 et le risque du paludisme a été limité au premier ou unique épisode clinique de paludisme. Les analyses ont utilisé le titre des IgG normalisé par la transformation logarithmique de base 10. Pour prendre en compte le rôle de l'immunité naturelle acquise pendant l'essai, la valeur du titre des IgG au Jour 0 a été soustrait de la valeur au temps situé à au moins 2 semaines après la troisième dose de vaccination et qui était le plus près, mais pas après le premier épisode clinique de paludisme survenu. L'analyse de l'impact du vaccin candidat sur la densité parasitaire a inclus tous les épisodes de parasitémie associés ou pas à des signes cliniques. Nous avons supposé une baisse linéaire de la parasitémie jusqu'à 0 en trois jours. La densité parasitaire a été estimée par l'analyse de l'aire sous la courbe, ASC, dont l'acronyme en anglais est AUC, pour Area Under the Curve, pour chaque participant, pendant toute la durée de l'étude et aussi pour la période qui commence 14 jours après la troisième vaccination et s'étend jusqu'à la fin du suivi. Conformément aux BPCs, le plan d'analyse de l'essai a été élaboré par le statisticien de l'essai, révisé et adopté par

les investigateurs avant la fin des 240 premiers jours de l'étude. Le Jour 240 correspond au moment de l'analyse des critères de jugement primaires de l'essai.

4 Résultats des essais cliniques à Bandiagara.

4.1 Essai clinique contrôlé randomisé de phase 1b chez l'adulte

Article I : Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Diallo DA, Kone AK, Guindo AB, Traore K, Dicko A, Sagara I, Sissoko MS, Baby M, Sissoko M, Diarra I, Niangaly A, Dolo A, Daou M, Diawara SI, Heppner DG, Stewart VA, Angov E, Bergmann-Leitner ES, Lanar DE, Dutta S, Soisson L, Diggs CL, Leach A, Owusu A, Dubois MC, Cohen J, Nixon JN, Gregson A, Takala SL, Lyke KE, Plowe CV. Safety and immunogenicity of an AMA-1 malaria vaccine in Malian adults: results of a phase 1 randomized controlled trial. PLoS One. 2008 Jan 23;3(1):e1465.

Cet essai a été la première évaluation clinique en zone d'endémie palustre du vaccin candidat FMP2.1/AS02_A. Etape obligatoire dans le développement clinique d'un vaccin expérimental, l'essai de phase 1 chez l'adulte expose une population en bonne santé à un produit qui ne sera pas nécessairement mis sur le marché pour cette population. Dans notre cas la population cible du futur vaccin antipaludique est celle des enfants plus particulièrement ceux âgés de moins de 5 ans. Toutefois la population adulte est exposée au risque du paludisme et pourrait aussi bénéficier d'un tel outil. En plus la population adulte est capable de donner un consentement libre, éclairé et valide.

La visite de sélection a porté sur 175 personnes pour en retenir 60 répondant aux critères d'inclusion et d'exclusion. Les volontaires ont été repartis en deux cohortes. Dans la cohorte 1 faible dose, les volontaires ont reçu trois doses espacées d'un mois de 25mcg d'antigène vaccinal FMP2.1, reconstitué dans un volume final de 0,25ml d'AS02_A. Dans la cohorte 2, forte dose, les volontaires ont reçu trois doses espacées d'un mois de 50mcg d'antigène vaccinal FMP2.1, reconstitué dans un volume final de 0,50ml d'AS02_A. Dans chaque cohorte les volontaires ont été randomisés dans un ratio 2:1 à recevoir soit le vaccin antipaludique, soit le vaccin antirabique. Les principales raisons d'exclusion étaient la présence d'une maladie et le projet de voyager en dehors de la zone d'étude. Le taux de maintien dans l'étude était de 97% après 12 mois. Une personne de la cohorte 1 a été perdue de vue, ayant voyagé au Burkina Faso voisin de façon définitive, après avoir reçu trois doses de FMP2.1/AS02_A. Une femme de la cohorte 2 a retiré son consentement suite à son mariage. Elle a raté la visite du Jour 364, mais a reçu trois doses de FMP2.1/AS02_A. Tous les participants ont reçu les trois doses de vaccins sauf un participant du fait d'un taux des ALAT élevé deux semaines avant la troisième dose.

Le vaccin candidat a été bien toléré. En bref au niveau local, les douleurs au site d'injection et les œdèmes au site d'injection étaient plus fréquentes dans les deux groupes de dose du vaccin candidat FMP2.1/AS02_A en comparaison avec le groupe du vaccin antirabique. Les œdèmes au site d'injection de grade 3 étaient plus fréquents dans le groupe forte dose FMP2.1/AS02_A. Sept participants ont eu une telle réaction locale après chaque vaccination dans ce groupe. Toutefois l'œdème était le plus souvent indolore et non remarqué par les volontaires, mis en évidence uniquement à l'examen clinique. Ces EIs locaux ont été temporaires et tous se sont résolus dans les 7 jours suivant la vaccination. Au niveau des EIs généraux, les volontaires dans la cohorte 2 ont aussi présenté le plus grand nombre d'évènements. Les plus fréquents par ordre décroissant ont été la céphalée, la myalgie et le malaise. Tous étaient de grade 1 ou 2 et tous ont été résolus dans les 7 jours suivant la vaccination.

Les EIs non sollicités, de même que les anomalies des paramètres biologiques ont été notés sans mettre en danger l'état de santé des volontaire. Aucun EIG n'a été rapporté pendant toute l'étude.

Du point de vue de la réponse immunitaire, la forte dose de FMP2.1/AS02_A a induit une multiplication par plus de 6 du taux des IgG totaux en comparaison avec le niveau dans le groupe témoin et aussi en comparaison avec les niveaux au début de l'étude. Le test de croissance des parasites *in vitro* a utilisé la production de la lactate déshydrogénase parasitaire comme marqueur de la viabilité de *P. falciparum* en culture continue synchronisée. Le sérum des volontaires de la cohorte 2 a montré une activité inhibitrice significative de la souche 3D7 mais aussi de la souche FVO. En comparaison avec le groupe témoin, la moyenne de l'activité d'inhibition des sérums du jour 74 était statistiquement significative (ANOVA $p=0,007$ contre 3D7 et $p=0,002$ contre FVO).

En résumé la vaccin FMP2.1/AS02_A a montré une bonne tolérance dans la population adulte de Bandiagara naturellement exposée au paludisme. En plus le produit a induit une stimulation importante et durable de la production d'IgG, bien que les niveaux de base aient déjà été élevés en comparaison avec une population adulte non exposée au paludisme. Enfin les IgG induits par le produit ont inhibé de façon significative la croissance du parasite *in vitro*. Une activité inhibitrice contre la souche FVO hétérologue a également été observé dans tous les groupes. Cela pourrait traduire l'effet de l'immunité naturelle dans cette population d'adultes semi immuns.

Safety and Immunogenicity of an AMA-1 Malaria Vaccine in Malian Adults: Results of a Phase 1 Randomized Controlled Trial

Mahamadou A. Thera¹, Ogobara K. Doumbo¹, Drissa Coulibaly¹, Dapa A. Diallo¹, Abdoulaye K. Kone¹, Ando B. Guindo¹, Karim Traore¹, Alassane Dicko¹, Issaka Sagara¹, Mahamadou S. Sissoko¹, Mounirou Baby¹, Mady Sissoko¹, Issa Diarra¹, Amadou Niangaly¹, Amagana Dolo¹, Modibo Daou¹, Sory I. Diawara¹, D. Gray Heppner², V. Ann Stewart², Evelina Angov², Elke S. Bergmann-Leitner², David E. Lanar², Sheetij Dutta², Lorraine Soisson³, Carter L. Diggs³, Amanda Leach⁴, Alex Owusu⁴, Marie-Claude Dubois⁴, Joe Cohen⁴, Jason N. Nixon^{5a}, Aric Gregson^{5b}, Shannon L. Takala⁵, Kirsten E. Lyke⁵, Christopher V. Plowe^{5*}

1 Malaria Research and Training Center, University of Bamako, Bamako, Mali, **2** Division of Malaria Vaccine Development, Walter Reed Army Institute of Research, Silver Spring, Maryland, United States of America, **3** Malaria Vaccine Development Program, U.S. Agency for International Development, Washington, D. C., United States of America, **4** World Wide Clinical Development – Malaria Vaccines, GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium, **5** Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, United States of America

Background. The objective was to evaluate the safety, reactogenicity and immunogenicity of the AMA-1-based blood-stage malaria vaccine FMP2.1/AS02A in adults exposed to seasonal malaria. **Methodology/Principal Findings.** A phase 1 double blind randomized controlled dose escalation trial was conducted in Bandiagara, Mali, West Africa, a rural town with intense seasonal transmission of *Plasmodium falciparum* malaria. The malaria vaccine FMP2.1/AS02A is a recombinant protein (FMP2.1) based on apical membrane antigen-1 (AMA-1) from the 3D7 clone of *P. falciparum*, adjuvanted with AS02A. The comparator vaccine was a cell-culture rabies virus vaccine (RabAvert). Sixty healthy, malaria-experienced adults aged 18–55 y were recruited into 2 cohorts and randomized to receive either a half dose or full dose of the malaria vaccine (FMP2.1 25 µg/AS02A 0.25 mL or FMP2.1 50 µg/AS02A 0.5 mL) or rabies vaccine given in 3 doses at 0, 1 and 2 mo, and were followed for 1 y. Solicited symptoms were assessed for 7 d and unsolicited symptoms for 30 d after each vaccination. Serious adverse events were assessed throughout the study. Titers of anti-AMA-1 antibodies were measured by ELISA and *P. falciparum* growth inhibition assays were performed on sera collected at pre- and post-vaccination time points. Transient local pain and swelling were common and more frequent in both malaria vaccine dosage groups than in the comparator group. Anti-AMA-1 antibodies increased significantly in both malaria vaccine groups, peaking at nearly 5-fold and more than 6-fold higher than baseline in the half-dose and full-dose groups, respectively. **Conclusion/Significance.** The FMP2.1/AS02A vaccine had a good safety profile, was well-tolerated, and was highly immunogenic in malaria-exposed adults. This malaria vaccine is being evaluated in Phase 1 and 2 trials in children at this site. **Trial Registration.** ClinicalTrials.gov NCT00308061

Citation: Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Diallo DA, Kone AK, et al (2008) Safety and Immunogenicity of an AMA-1 Malaria Vaccine in Malian Adults: Results of a Phase 1 Randomized Controlled Trial. PLoS ONE 3(1): e1465. doi:10.1371/journal.pone.0001465

INTRODUCTION

Plasmodium falciparum malaria remains a major global killer, especially of infants and children, and a serious threat to travelers. A safe and effective malaria vaccine used in conjunction with other control measures would be a huge boon to the health and economies of malaria-endemic countries. In recent clinical trials, RTS,S/AS02, a recombinant subunit protein malaria vaccine designed to block infection, demonstrated 35% efficacy against uncomplicated malaria and 49% efficacy against severe malaria for at least 18 months in young children and 66% efficacy against *P. falciparum* infection in infants [1–3]. Approaches to improve on this efficacy include building multi-stage, multi-antigen vaccines [4], combination with a viral vector [5] and developing more-effective single antigen or live attenuated vaccines [6,7].

Apical membrane antigen-1 (AMA-1) is a 83-kilodalton surface protein that is expressed by mature intra-erythrocytic malaria parasites and processed to a 66-kilodalton protein before being exported to the merozoite surface around the time of rupture of the infected erythrocyte [8]. Several lines of evidence including in vitro growth inhibition assays [9–12], antibody-mediated inhibition of antigen processing [13], and sero-epidemiological surveys [14,15] support a critical role for AMA-1 during merozoite invasion of erythrocytes. A vaccine that boosts levels of anti-AMA-1 antibodies might therefore reduce the risk that malaria infection will cause clinical disease.

Academic Editor: Colin Sutherland, London School of Hygiene & Tropical Medicine, United Kingdom

Received October 17, 2007; **Accepted** December 17, 2007; **Published** January 23, 2008

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Public Domain declaration which stipulates that, once placed in the public domain, this work may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose.

Funding: Site development and the conduct of the trial were supported by contract N01A185346 and cooperative agreement U19AI065683 from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases and grant D43TW001589 from the Fogarty International Center, National Institutes of Health. Vaccine production and laboratory assays were supported by the United States Agency for International Development, Washington, D.C. and by the Military Infectious Diseases Research Program, Fort Detrick, MD. Program staff from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases contributed to study design discussions but played no role in the collection, analysis or interpretation of data, writing the paper, or the decision to submit it for publication. CVP is supported by a Distinguished Clinical Scientist Award from the Doris Duke Charitable Foundation.

Competing Interests: SD and DEL hold patents for the FMP2.1 vaccine antigen. AL, JC and MCD are employees of GlaxoSmithKline Biologicals, the manufacturer of the proprietary adjuvant AS02A, and hold shares in GlaxoSmithKline. None of the other authors have declared conflict of interest.

* **To whom correspondence should be addressed.** E-mail: cplowe@medicine.umaryland.edu

^a **Current address:** Department of Radiology, University of Washington, Seattle, Washington, United States of America,

^b **Current address:** Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, University of California at Los Angeles, Los Angeles, California, United States of America

AMA-1 is highly polymorphic [16,17]. Polymorphisms in AMA-1 allow the parasite to evade antibody-mediated inhibition of invasion in vitro [18], and sera from rabbits immunized with different forms of AMA-1 showed limited cross-protection, with the level of inhibition inversely related to the number of amino acid differences between parasite strains [12,19,20]. The relevance, if any, of these in vitro and animal studies for allele-specific efficacy of AMA-1 vaccines in humans is unknown. Presently three AMA-1-based adjuvanted protein vaccines are being evaluated in clinical trials in Mali, including two different monovalent vaccines based on AMA-1 derived from the 3D7 and FVO clones of *P. falciparum*, respectively, [20,21] and a bivalent vaccine that includes both of these versions of AMA-1 [22].

Falciparum Malaria Protein 2.1 (FMP2.1) is a recombinant AMA-1 from the 3D7 clone of *P. falciparum* that is produced in and purified from *Escherichia coli* [23]. Together with the AS02A adjuvant system, an oil-in-water emulsion with the immunostimulants monophosphoryl lipid A and QS 21, it constitutes the FMP2.1/AS02A malaria vaccine. This vaccine has been evaluated in a Phase 1 dose escalation clinical trial in malaria-naïve North American adults [21]. The vaccine was well tolerated and strongly immunogenic, inducing both humoral and cellular immune responses. Vaccine-induced antibodies also inhibited parasite growth and interfered with antigen processing in vitro. Because previous exposure to malaria may affect the reactogenicity and immunogenicity of malaria vaccines, we conducted a Phase 1 dose escalation trial of this vaccine in malaria-experienced adults in Mali. A cell-culture rabies virus vaccine was used as a comparator to help distinguish vaccine-induced immune responses from natural background immunity. This study was the first evaluation of FMP2.1/AS02A in a malaria-experienced population and the antecedent to Phase 1 and Phase 2 clinical trials of this vaccine in children that are now in progress at this site.

METHODS

The protocol for this trial and supporting CONSORT checklist are available as supporting information; see Checklist S1 and Protocol S1.

Study Setting

The study was conducted at the Bandiagara Malaria Project research clinic adjacent to the district hospital in Bandiagara, a rural town of 13,634 inhabitants in the Dogon Country in northeast Mali. It is relatively dry, with a mean annual rainfall of 600 mm. *Anopheles gambiae* is the principal malaria vector. Malaria transmission is strictly seasonal, with virtually undetectable transmission at the height of the dry season in March; less than 1 infected bite per person per month as the transmission season starts and ends in June and December, respectively; and a peak of up to 60 infected mosquito bites per person per month in August or September [24,25]. *P. falciparum* represents 97% of malaria infections with 3% due to *P. malariae* and rare infections with *P. ovale*. Despite the seasonal transmission pattern the malaria burden is heavy: children aged less than 10 years have an average of 2 clinical malaria episodes every transmission season [25] and severe malaria afflicts 1 in 50 children aged less than 6 years each year [24]. Older children and adults are relatively protected against malaria disease but remain susceptible to malaria infection.

Participants

After obtaining community permission as described by Diallo et al. [26], the trial was publicized by local radio broadcast. Men and women aged 18 to 55 years were invited to the research clinic to

be screened for eligibility. Participants were included if they had resided in Bandiagara for at least 12 months, gave written informed consent, and, if female, declared their intent not to become pregnant during the first 3 months of the study (up to one month following the third immunization). Exclusion criteria included: current illness as indicated by history, examination and/or laboratory testing, previous immunization with a rabies vaccine or any experimental vaccine, recent use of immunosuppressants, receipt of blood products during the previous 6 months, pregnancy or breast-feeding, alcohol or drug abuse, and allergy to substances present in the vaccines.

Ethical compliance The trial was conducted in compliance with the International Conference on Harmonization Good Clinical Practices, the Declaration of Helsinki and regulatory requirements of Mali. The protocol was approved by institutional review boards of the University of Bamako Faculty of Medicine, University of Maryland Baltimore, and the U.S. Army Surgeon General. Separate written informed consent was obtained for screening and for enrollment. Consent of illiterate participants was documented by their thumbprints and by signatures of independent witnesses. Permission to import and administer the investigational products in Mali was granted by the Republic of Mali Ministry of Health. The trial was monitored by the United States Army Medical Materiel Development Activity and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases/Division of Microbiology and Infectious Diseases.

Interventions

The FMP2.1 antigen (Lot 0971) is comprised of amino acids #83-531 corresponding to the ectodomain of AMA-1 derived from the 3D7 clone of *P. falciparum*. The protein was produced in and purified from *E. coli* bacteria under current Good Manufacturing Practices at the Walter Reed Army Institute of Research Pilot Bioproduction facility (Forest Glen, Maryland, United States) [23]. The vaccine was provided in vials containing approximately 50 µg of lyophilized protein.

The AS02A adjuvant system is composed of an oil-in-water emulsion and two immuno-stimulants, 3-deacylated monophosphoryl lipid A and QS21, a saponin agent derived from the soap bark tree, *Quillaja saponaria* [27,28]. AS02A was manufactured by GlaxoSmithKline Biologicals (Rixensart, Belgium) according to current Good Manufacturing Practices P and provided in pre-filled syringes. The whole content of each FMP2.1 vial was dissolved in the whole content of a separate 0.62 mL vial of AS02A immediately before injection. The RabAvert rabies vaccine (Chiron Corporation, Emeryville, California, United States) is a sterile freeze-dried vaccine obtained by growing the fixed-virus strain Flury LEP in primary cultures of chicken fibroblasts. It is supplied in pre-filled syringes containing lyophilized antigen to which 1 mL of sterile water was added as a diluent before injection. All vaccines were administered by intramuscular injection in the left deltoid muscle.

Sixty adults were sequentially assigned to 2 cohorts of 30. Within each cohort, participants were randomized in a 2:1 fashion to receive FMP2.1/AS02A or rabies vaccine. After reconstitution, the dose of FMP2.1/AS02A was approximately 25 µg of FMP2.1 in a final volume of 0.25 mL AS02A in Cohort 1 (half dose), and approximately 50 µg FMP2.1 in a final volume of 0.5 mL in Cohort 2 (full dose). Vaccines were given on a 0-, 1- and 2-mo schedule. The first vaccination was given in early December 2004 at the end of the malaria transmission season; the second and the third doses were given in January and February 2005, when virtually no malaria transmission occurs at this site. Study day 90 was in March 2005, at the nadir of malaria transmission, study day

180 was at the beginning of the malaria season, and study day 272 was in September, at the peak of malaria transmission intensity. The final study follow-up on day 364 coincided with the end of the 2005 malaria season. The cohorts were immunized in a staggered fashion to permit interim safety analyses; each successive immunization of Cohort 1 was followed in approximately 3 wk by the corresponding immunization of Cohort 2. Three interim safety analyses were reviewed by an independent Safety Monitoring Committee, which provided written recommendations to proceed before each of the three immunizations of Cohort 2 with the full dose of FMP2.1/AS02A.

Objectives

The primary objective was to evaluate the safety and reactogenicity of 3 injections of 2 different dose levels of the malaria vaccine FMP2.1/AS02A in malaria-experienced Malian adults. Secondary objectives were to measure the magnitude and duration of antibody responses to FMP2.1, and exploratory objectives included measuring vaccine-induced cellular immune responses at baseline and after immunization (results to be presented elsewhere); and measuring the inhibition of parasite growth by *in vitro* growth inhibition assays.

Outcomes

The primary outcome was safety, measured as 1) occurrence of solicited symptoms during an 8-day follow-up period after immunization (day of immunization and days 1, 2, 3 and 7 after immunization); 2) occurrence of unsolicited symptoms during a 31-day follow-up period after immunization (day of immunization and 30 subsequent days); 3) occurrence of laboratory toxicities during the study period; and 4) occurrence of serious adverse events during the study period. Secondary outcomes were anti-AMA-1 antibody titers measured against recombinant 3D7 AMA-1 and at baseline and at specified times during and after immunization. Serum inhibition of parasite growth *in vitro* was an exploratory outcome.

Assessment of safety and tolerability Following each immunization, participants were directly observed for 30 minutes, then evaluated at the study clinic 1, 2, 3, 7 and 14 days after each immunization and on study days 90, 180, 272 and 364. Starting on day 120, monthly home visits were made to check the health status of participants and to encourage them to come to the research clinic if they felt ill. Study physicians were available at the research clinic at all times throughout the 12-month study to assess and treat adverse events.

Clinical evaluations consisted of measurement of vital signs and assessment for local injection site and general solicited signs or symptoms. Local signs and solicited symptoms included pain, swelling, erythema at the injection site and limitation of arm abduction at the shoulder. General signs and solicited symptoms included fever (oral temperature $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$), chills, nausea, headache, malaise, myalgia and joint pain. Any other signs or symptoms were considered to be unsolicited, as were all signs or symptoms that occurred more than 7 days after immunization. Solicited symptoms were considered to be related to the study vaccines. Unsolicited signs and symptoms were recorded during the 30 days after each immunization, whereas serious adverse events and pregnancies were monitored throughout the 12-month study.

Blood was collected at screening, on immunization days, 7 and 14 days after each immunization and on study days 90, 180, 272 and 364 to determine complete blood count, alanine aminotransferase (ALT) and serum creatinine.

Adverse events were graded by severity and judged for relatedness to study vaccines. Grade 1 adverse events were easily tolerated,

causing minimal discomfort and not interfering with daily activities. Grade 2 adverse events were sufficiently discomforting to interfere with normal activities. Grade 3 adverse events prevented normal daily activities. Swelling, erythema, fever and limitation of arm motion had specific definitions not based on interference with daily activities. Injection site swelling and erythema were graded based on their widest dimension: Grade 1, >0 to 20 mm; Grade 2, >20 to 50 mm; and Grade 3, >50 mm. Fever was classified as Grade 3 if the oral temperature was $\geq 39^{\circ}\text{C}$ whereas Grade 3 limitation of arm motion was classified as abduction limited to 30° . For laboratory tests, toxicity grading was adapted to normal reference ranges determined for the local adult population.

Antibody responses to AMA-1 Antibody responses to AMA-1 were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [21,21]. Briefly, IgG ELISAs were performed using FMP2.1 as the capture antigen, in serial 2-fold dilution, and the titer was defined as the serum dilution required to yield an optical density of 1.0 in our assay. Antibody responses were measured on serum obtained from participants at the time of each immunization (study days 0 [baseline], 30 and 60), 2 wk after each immunization (study days 14, 44 and 74), and 1, 3, 6 and 10 mo after the scheduled time of the last immunization (study days 90, 180, 272 and 364).

Growth invasion/inhibition assay Pre-immunization (day 0) sera and sera from 2 wk after the third immunization (day 74, corresponding to peak antibody titers) were tested for growth inhibitory effects against homologous (derived from 3D7 clone) and heterologous (derived from FVO clone) *P. falciparum* parasites as described [21,29]. Sera were dialyzed using 12–14 kilodalton molecular weight cutoff membranes against three rounds of $1 \times$ PBS and one round of RPMI 1640 [30]. Samples were then heat-inactivated for 20 min at 56°C and pre-absorbed with erythrocytes from the same donor as the erythrocytes in which parasites had been cultured (2.5 μl of erythrocytes at 50% hematocrit for 50 μl serum). Samples were tested at 20% serum concentration in 384-well plates (Perkin Elmer Spectra 384-TC plates, Cat #6007650) against 3D7 or FVO parasites (2% hematocrit, 0.3% starting parasitemia). Assays were initiated with parasites synchronized at schizont stage and harvested 40 hrs (3D7) or 44 hrs (FVO) after culture setup, i.e., after one cycle. Growth inhibition was determined by measuring parasite lactate dehydrogenase as described [19] and reported as percent growth inhibition relative to control. Growth inhibition assays were performed in a double blind manner.

Detailed methods and results of assays for cellular immune responses will be described in a separate publication.

Sample size

A sample size of 20 in each group was chosen to balance the need to detect any possible untoward reactions against the need to limit the number of volunteers involved for safety purposes. This Phase 1 trial was thus not powered to detect differences between groups and where comparative statistics for the safety variables were computed, the study had power to detect only large differences in the incidence of local and general side effects between the vaccination groups. Incorporation of a comparator vaccine group of 20 permitted broad initial estimates of the incidence of local and general side effects and of immune responses among vaccine recipients.

Randomization—Sequence generation

Within the two cohorts, individual participants were randomized in a 2:1 ratio to receive either FMP2.1/AS02A (half dose in Cohort 1 and full dose in Cohort 2) or rabies vaccine. The randomization sequence was generated by a computer program using blocks of three to ensure a 2:1 ratio of vaccine allocation.

Randomly generated sequential codes linked each study number to a vaccine assignment (FMP2.1/AS02A or rabies vaccine).

Randomization—Allocation concealment

The randomization sequence was provided by the study statistician consultant in an opaque sealed envelope to the study pharmacists. In addition the local safety monitor was provided with a sealed envelope to be opened if it was deemed necessary to determine urgently the intervention a participant had received; no such emergency unblinding occurred. The only people at the study site with access to the randomization codes during the study were 2 study pharmacists, who had no contact with study participants and did not reveal vaccine assignments to anyone else. Study participants and investigators who assessed outcomes were blinded to vaccine assignment.

Randomization—Implementation

Clinical investigators assigned study numbers to participants of each group in the order in which they arrived at the clinic on the first day of immunization. At the time of the first immunization, study pharmacists opened the sealed envelopes containing the vaccine assignment and prepared the vaccine to be administered to the respective study participant. The vaccine and dose assigned during the first immunization were maintained for second and third immunizations. The study pharmacists prepared the vaccines in a special room with access strictly limited to them and to study monitors. Syringes containing the prepared vaccines were passed through small sliding doors from the vaccine preparation room to separate vaccine administration rooms, where the immunizations were administered.

Blinding

The reconstituted rabies vaccine was a clear to slightly opaque, colorless suspension of 1 mL volume, while FMP2.1/AS02A was off-white and either 0.25 or 0.5 mL in volume. Syringes containing vaccines were covered with opaque tape to conceal their content from participants and immunizers. The study pharmacists, who were unblinded, had no study-related contact with participants and were not involved in outcome assessment. Because of the difference in volumes, the immunizers could potentially have deduced which vaccine was given to a specific participant, and therefore they did not participate in other study procedures. The presence of both study pharmacists and immunizers at the site was limited to the periods during which immunizations were given, and these individuals were instructed not to discuss vaccine allocation with other study staff.

Statistical methods

Adverse event rates were analyzed using SPSS version 11.1 (SPSS, Chicago, Illinois, United States). Fisher's exact test was used to compare rates between vaccine groups. Confidence intervals for geometric mean AMA-1 antibody titers were estimated by using \log_{10} -transformed values, calculating the 95% confidence interval based on the normal distribution, and then converting the limits to the original scale for presentation. Wilcoxon Signed Rank Test was used to evaluate vaccine effects on parasite growth inhibition on paired samples from study days 0 and 74, for each study group. The differences in mean parasite growth inhibition for the three study groups on study day 74 was evaluated by using a One Way ANOVA and adjusted for multiple comparisons using Tukey's post test on pairwise comparisons using Jandel SigmaStat version 2.0 (Corte Madera, CA, United States). For longitudinal analysis of antibody responses, \log -transformed antibody titers were

modeled using mixed spline models to determine the effect of vaccine dose on mean antibody levels over time using SAS version 9.1 (Cary, NC, United States). The spline models consisted of a linear function joined to a quadratic function at study day 74. A spatial exponential covariance structure was used to model the correlation between measurements from the same individual taking into account the number of study days between each measurement. Point estimates and confidence intervals for each time point were generated based on the fitted longitudinal model, using the ESTIMATE statement in the MIXED procedure in SAS. All tests were 2-sided, and no correction of p -values was made for additional analyses. Given the large number of statistical tests performed and the small sample size, the p -values have limited probabilistic interpretation. Safety and immunogenicity analyses were based on intention-to-treat, such that all available data were included in analyses including partial data from 2 participants who were subsequently lost to follow-up.

RESULTS

Participant flow

One hundred and seventy five persons were screened, and 60 who fulfilled the criteria for inclusion were enrolled in the study (Figure 1). The most common reasons for exclusion were medical illnesses and planned travel out of the study area. After enrollment, one participant traveled outside the study area two days after his second immunization and missed all subsequent visits, and one participant missed the final study visit on day 364 due to travel. Three participants temporarily left the study area to attend a professional meeting, and missed only their study day 63 clinic visits. All of these participants received all 3 doses of vaccine. One participant received only 2 immunizations due to an elevated ALT (described below in Laboratory Safety Tests).

Recruitment

Participants were recruited from November 19 to December 2, 2004. Immunizations for Cohort 1 began on December 4, 2004 and for Cohort 2 on December 24, 2004. Subsequent immunizations were done at 30-day intervals following this staggered start. Active surveillance of participants for 30 days after each immunization was completed in March 2005, corresponding to study day 90. The database was locked for the primary unblinded analysis after study day 90, and the study continued in a single-blinded fashion, although individual study allocations were not disclosed to on-site study investigators or staff with the exception of the principal investigator. The extended surveillance phase included continuous access to free basic medical care at the research clinic, monthly home visits, and scheduled visits on study days 180, 272 and 364.

Baseline data

The three study groups did not differ significantly at enrollment with regard to sex, age or laboratory parameters (Table 1). Eleven of 60 participants were female. The mean age was 28 y.

Numbers analyzed

All available data from all participants, including partial data from participants lost to follow-up, were included in both safety and immunogenicity analyses.

Safety and reactogenicity

Local solicited adverse events After each immunization, the proportion of participants who had at least one local injection site reaction during the 8-d post-immunization periods was higher and

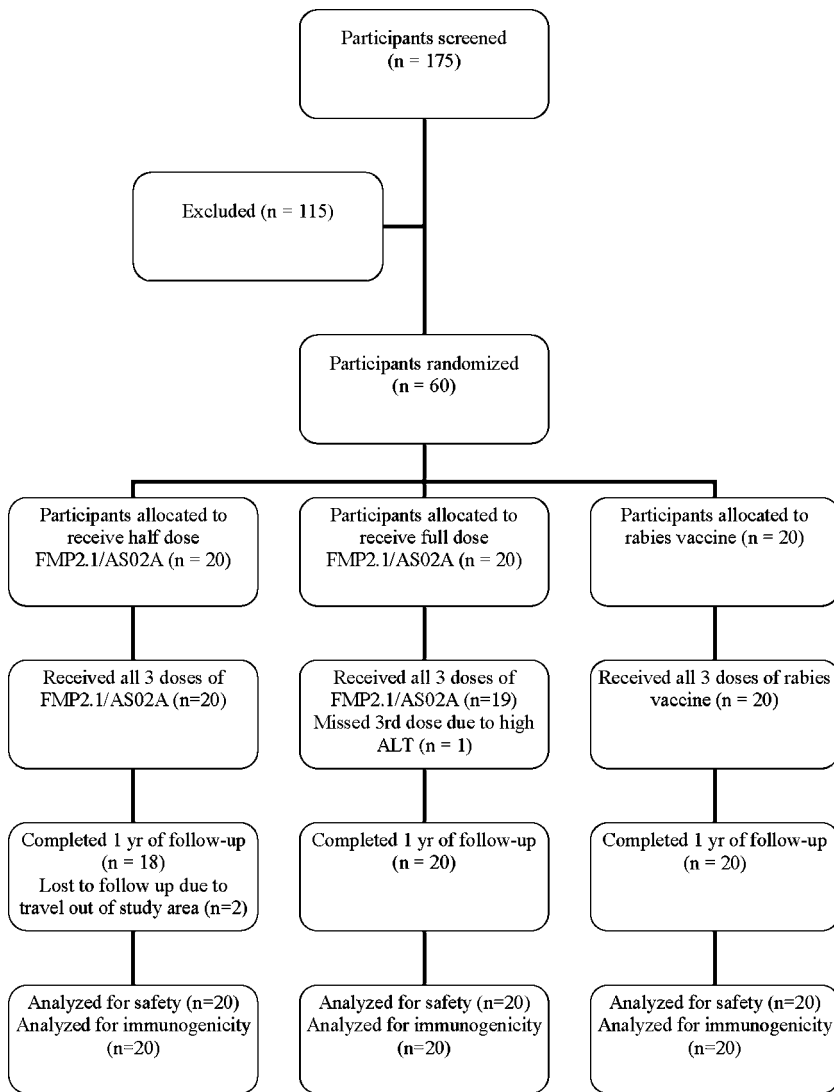


Figure 1. Trial Profile.
doi:10.1371/journal.pone.0001465.g001

Table 1. Baseline Characteristics of FMP2.1/AS02A and Rabies Vaccine groups

Characteristics	FMP2.1/AS02A Half dose (n=20)	FMP2.1/AS02A Full dose (n=20)	Rabies Vaccine (n=20)
Mean age in year (SD)	26.1 (9.2)	29 (11.2)	30.1 (12.2)
Number of Females	4	4	3
Mean WBC × 10 ³ /μL (SD)	5.4 (1.3)	5.9 (2.2)	6.0 (1.5)
Mean hemoglobin g/dL (SD)	14.4 (1.4)	14.1 (1.6)	14.0 (1.6)
Mean platelets × 10 ³ /μL (SD)	232.2 (61.3)	252.3 (81.3)	239.3 (68.2)
Mean lymphocytes × 10 ³ /μL (SD)	1.9 (0.6)	2.3 (0.9)	2.2 (0.8)
Mean creatinine mM/L (SD)	77.8 (14.0)	77.1 (18.6)	76.6 (13.4)
Mean ALT U/L (SD)	18.0 (6.6)	17.3 (7.9)	18.1 (5.7)
GMT Anti-AMA-1 antibody titer (95% CI)	19,161 (8,570–42,844)	23,500 (9,079–60,826)	14,355 (5,860–35,165)

GMT, geometric mean titer; CI, confidence interval; ALT, alanine amino-transferase; SD, standard deviation.
doi:10.1371/journal.pone.0001465.t001

similar in both malaria vaccine groups, compared to the rabies vaccine group (Table 2). Pain and swelling at the injection site were the most common local reactions for all groups and tended to diminish in frequency and severity with successive immunizations. Grade 3 injection site swelling was seen after all immunizations in all three groups, but was much more common in the FMP2.1/AS02A malaria vaccine full-dose group. Swelling classified as Grade 3 occurred in seven participants after each of the three immunizations in that group, compared to one, three and two participants after the first, second and third immunizations, respectively, in the malaria vaccine half-dose group, and in one, three and one participants after the first, second and third immunizations, respectively, in the rabies vaccine group (Table 2). The swelling was typically unnoticed by the participant and detected only on physical examination, and did not interfere with normal daily activities. No other Grade 3 local adverse events occurred. Three episodes of Grade 1 arm motion limitation occurred in the malaria vaccine full-dose group, one after the first immunization and two after the second immunization. Five episodes of arm motion limitation (four Grade 1, one Grade 2) occurred in the malaria vaccine half-dose group, four after the first immunization and one after the second immunization. No episodes of arm motion limitation occurred in the rabies vaccine group. All local solicited symptoms resolved without sequelae during the 8-day post-immunization periods.

General solicited adverse events The malaria vaccine full-dose group had the most general solicited signs and symptoms during the 8-d post-immunization periods, with 14, 15 and 10 general adverse events following the first, second and third immunizations, respectively, compared to 18, 4 and 6 in the half-dose group and 2, 14 and 3 in the rabies vaccine group (Table 2). Headache was the most common general adverse event in all groups, followed by myalgia and malaise. All general solicited adverse events were of Grade 1 or Grade 2 intensity and resolved during the 8-day follow-up period.

Unsolicited adverse events Overall, unsolicited adverse events reported during the 31-d post immunization periods were balanced by group, with 109, 109 and 100 events reported for the malaria vaccine full-dose group, half-dose group and rabies vaccine group, respectively. The most frequent unsolicited adverse events were upper respiratory tract infections and headaches, followed by traumatic injuries, infections and other common medical problems. All unsolicited adverse events were of Grade 1 or Grade 2 intensity and all resolved during the study period.

One female participant in the rabies vaccine group had a positive urine pregnancy test on study day 180. She subsequently reported that she had terminated the pregnancy by elective abortion. On study day 364, the last day of the study follow-up, her pregnancy test was again positive. She later reported that this pregnancy had also been terminated by elective abortion and that she was in good health.

A second participant in the rabies vaccine group had a positive pregnancy test on study day 90 and gave birth to a healthy male child on study day 289. The parents later reported that the child had died at home at one year of age of an undiagnosed illness that was thought to be consistent with tetanus or meningitis.

Serious adverse events No serious adverse events occurred during the study.

Laboratory safety tests Grade 1 elevated serum creatinine levels were detected in six participants during the study: One female in the rabies vaccine group had Grade 1 creatinine elevations on study days 90, 272 and 364; one male in the rabies vaccine group had a Grade 1 elevation on day 7 that persisted through day 363; a female in the malaria vaccine half-dose group and two

males in the full-dose group had Grade 1 elevations on study day 0 that either persisted or rose and fell above the upper limit of normal, and remained at Grade 1 on day 364; and one male in the full-dose group had a Grade 1 creatinine elevation only on day 364. These creatinine elevations never increased above Grade 1 and were not associated with clinical abnormalities.

Five participants (two each in the malaria vaccine half-dose and full-dose groups and one in the rabies vaccine group) had Grade 1 elevated ALT levels, and one participant in the malaria vaccine full-dose group had an ALT of 194 U/L on study day 30, prior to immunization. This initial elevation was followed by a rise to 564 U/L on study day 44 and then a decline to 13 U/L by day 60. Extensive investigation including serological tests for hepatitis A, B and C identified no cause for this elevated ALT with the exception of self-administration of a single dose of 150 mg of diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug with reported rare liver toxicity.

Hemoglobin levels remained within or slightly above the normal range for all participants throughout the study (11.7 to 17.3 g/dL for males; 10.0 to 14.4 g/dL for females). Grade 1 abnormalities in white blood cell counts were infrequent and balanced by group. Grade 3 low platelet counts were reported for two participants in the malaria vaccine high dose group, but these were unaccompanied by any clinical signs and were determined to be false positive results from an automated cell counter caused by platelet aggregation, based on microscopic examination of the blood.

Immunogenicity

Baseline antibody titers were high in all groups (Figure 2), reflecting a high level of naturally acquired immunity at the end of the malaria transmission season. In contrast to the waning antibody titers seen in the rabies vaccine comparator group following the end of the malaria season, immunization with both the half dose and full dose of the malaria vaccine was followed by significant elevations in anti-AMA-1 antibodies. Antibody titers peaked two weeks after the third immunization (study day 74), with a 4.7-fold rise relative to baseline in the malaria vaccine half-dose group and a 6.4-fold rise in the full-dose group. Mean AMA-1 antibody levels remained higher in the malaria vaccine groups than in the comparator group throughout the study period, although confidence intervals for point-wise comparisons overlapped at study time points after day 90. Mean antibody titers were higher in the full-dose group than in the half-dose group at all time points, although these differences were not statistically significant for point-wise comparisons.

Based on the fitted longitudinal model, participants who received a full dose of the malaria vaccine had a significantly greater mean antibody response at all time points from day 30 (one month after the first immunization) through day 364 (the end of the follow-up period) compared to those receiving the comparator vaccine, and those receiving a half dose of the malaria vaccine had a significantly greater mean antibody response at times points from day 44 through day 272 compared to those receiving the comparator vaccine. A dose-response antibody effect was suggested by higher mean antibody responses in the full-dose malaria vaccine group compared to half-dose group, with these differences approaching but not reaching significance at study days 74, 90, and 180 ($p = 0.050, 0.053, \text{ and } 0.079$, respectively).

Ancillary analyses

Growth inhibition assays Measurement of functional anti-AMA1 antibodies in the sera from FMP2.1/AS02A-immunized participants was quantified by determining the levels of parasite lactate dehydrogenase as a biomarker for parasite viability in

Table 2. Signs and Solicited Symptoms during the 8-d Follow-Up Periods after Each Immunization

	FMP2.1/AS02A half dose						FMP2.1/AS02A full dose						Rabies Vaccine					
	Immunization 1 (n=20)		Immunization 2 (n=20)		Immunization 3 (n=20)		Immunization 1 (n=20)		Immunization 2 (n=20)		Immunization 3 (n=19)		Immunization 1 (n=20)		Immunization 2 (n=20)		Immunization 3 (n=20)	
	Overall	Grade 3	Overall	Grade 3	Overall	Grade 3	Overall	Grade 3	Overall	Grade 3	Overall	Grade 3	Overall	Grade 3	Overall	Grade 3	Overall	Grade 3
Local																		
Pain (%)	19 (95)	0	15 (75)	0	11 (55)	0	20 (100)	0	19 (95)	0	14 (73.7)	0	6 (30)	0	10 (50)	0	6 (30)	0
Swelling (%)	13 (65)	1 (5)	11 (55)	3 (15)	7 (35)	2 (10)	13 (65)	7 (35)	10 (50)	7 (35)	8 (42.1)	7 (35)	3 (15)	1 (5)	3 (15)	3 (15)	4 (20)	1 (5)
Limitation of arm motion (%)	4 (20)	0	1 (5)	0	0	0	1 (5)	0	2 (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Erythema (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
General																		
Fever (%)	3 (15)	0	1 (5)	0	2 (10)	0	2 (10)	0	1 (5)	0	3 (15.7)	0	0	0	1 (5)	0	0	0
Headache (%)	5 (25)	0	1 (5)	0	1 (5)	0	5 (25)	0	8 (40)	0	4 (21)	0	2 (10)	0	4 (20)	0	3 (15)	0
Joint pain (%)	0	0	0	0	0	0	1 (5)	0	1 (5)	0	0	0	0	0	1 (5)	0	0	0
Myalgia (%)	2 (10)	0	0	0	1 (5)	0	3 (15)	0	1 (5)	0	2 (10.5)	0	0	0	3 (15)	0	0	0
Malaise (%)	3 (15)	0	0	0	1 (5)	0	2 (10)	0	2 (10)	0	1 (5.3)	0	0	0	3 (15)	0	0	0
Nausea (%)	2 (10)	0	1 (5)	0	1 (5)	0	0	0	1 (5)	0	0	0	0	0	1 (5)	0	0	0
Chills (%)	3 (15)	0	1 (5)	0	0	0	1 (5)	0	1 (5)	0	0	0	0	0	1 (5)	0	0	0

doi:10.1371/journal.pone.0001465.t002

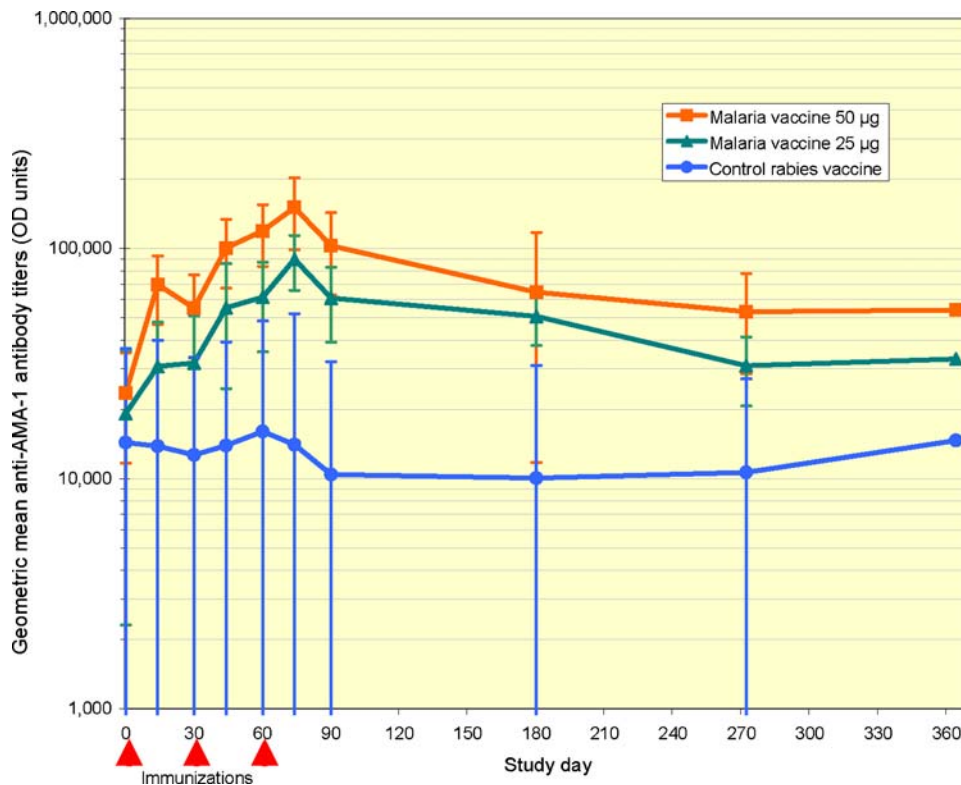


Figure 2. Anti-AMA-1 antibody titers. Geometric mean antibody titers to homologous recombinant AMA-1 for FMP2.1/AS02A full dose, FMP2.1/AS02A half dose and rabies vaccine recipients. Times of each of three immunizations and the start and end of the malaria transmission season are indicated by triangles. Error bars represent 95 percent confidence intervals. doi:10.1371/journal.pone.0001465.g002

continuous erythrocyte cultures of synchronized *P. falciparum* parasites. Sera from pre-immunization (day 0) and post immunization (day 74, 2 wk after the third immunization) time-points were tested against both the vaccine-homologous parasite clone, 3D7 (Figure 3A), and against the heterologous clone, FVO (Figure 3B). The immune sera generally gave higher growth inhibition activity against the FVO clone of *P. falciparum* than against the 3D7 clone. There was no difference in mean inhibition of either 3D7 or FVO parasites between day 0 and day 74 in the half-dose group (Wilcoxon Signed Rank Test analyses on paired serum samples; $p=0.490$ and 0.156 , respectively). Inhibitory activity at day 74 in the malaria vaccine full-dose group was however significantly higher than the day 0 inhibition for this group, against both the 3D7 and FVO clones ($p=0.024$ and $p=0.004$, respectively). Sera from participants in the rabies vaccine control group exhibited a significant increase in parasite inhibitory activity against the FVO parasites, $p=0.048$, but not for the 3D7 parasites ($p=0.231$). Comparison of mean inhibition on day 74 for all groups suggested that while there was no difference in growth inhibition between the rabies vaccine comparator group and malaria vaccine half-dose groups, post-immunization sera from participants who received the full dose of the malaria vaccine had significantly greater growth inhibition activity against both 3D7 and FVO parasites than did post-immunization sera from rabies comparator group (ANOVA $p=0.007$ and $p=0.002$, respectively; Tukey post test; $p<0.05$). Compared to baseline, growth inhibition activity against 3D7 tended to decrease following immunization with the rabies vaccine and increase following immunization with either dose of malaria vaccine, although these trends were not statistically significant (Figure 3A).

DISCUSSION

Interpretation

This is the first evaluation of the AMA-1-based malaria vaccine FMP2.1/AS02A in a malaria-experienced population. Both the full dose and a half dose of the malaria vaccine had acceptable tolerability. Local reactions were more frequent in both malaria vaccine groups than in the comparator group. Pain and/or swelling at the injection site were experienced by most recipients of the malaria vaccine. Although swelling was often classified as Grade 3 based on the size of the reaction (>50 mm), these episodes of swelling were short-lived and were usually unnoticed by participants. No participants were withdrawn from the study because of adverse events with the exception of one individual who had a transient high elevation of ALT temporally related to immunization but thought likely to be due to ingestion of a drug with known liver toxicity. No serious adverse events were observed. Three pregnancies occurred, one resulting in a healthy male child who died at the age of one year of an undiagnosed illness thought to be consistent with tetanus, and two in one participant that were terminated by elective abortion.

The malaria vaccine elicited high levels of antibodies recognizing the vaccine antigen. Differences in antibody levels between the two malaria vaccine groups, and between malaria vaccine and rabies vaccine comparator groups at time points 4 mo or longer after the last immunization, were not statistically significant when analyzed using point-wise comparisons. However, longitudinal analyses demonstrated that the malaria vaccine full-dose group had significantly higher antibody responses than the rabies vaccine comparator group from 1 mo after the first immunization through

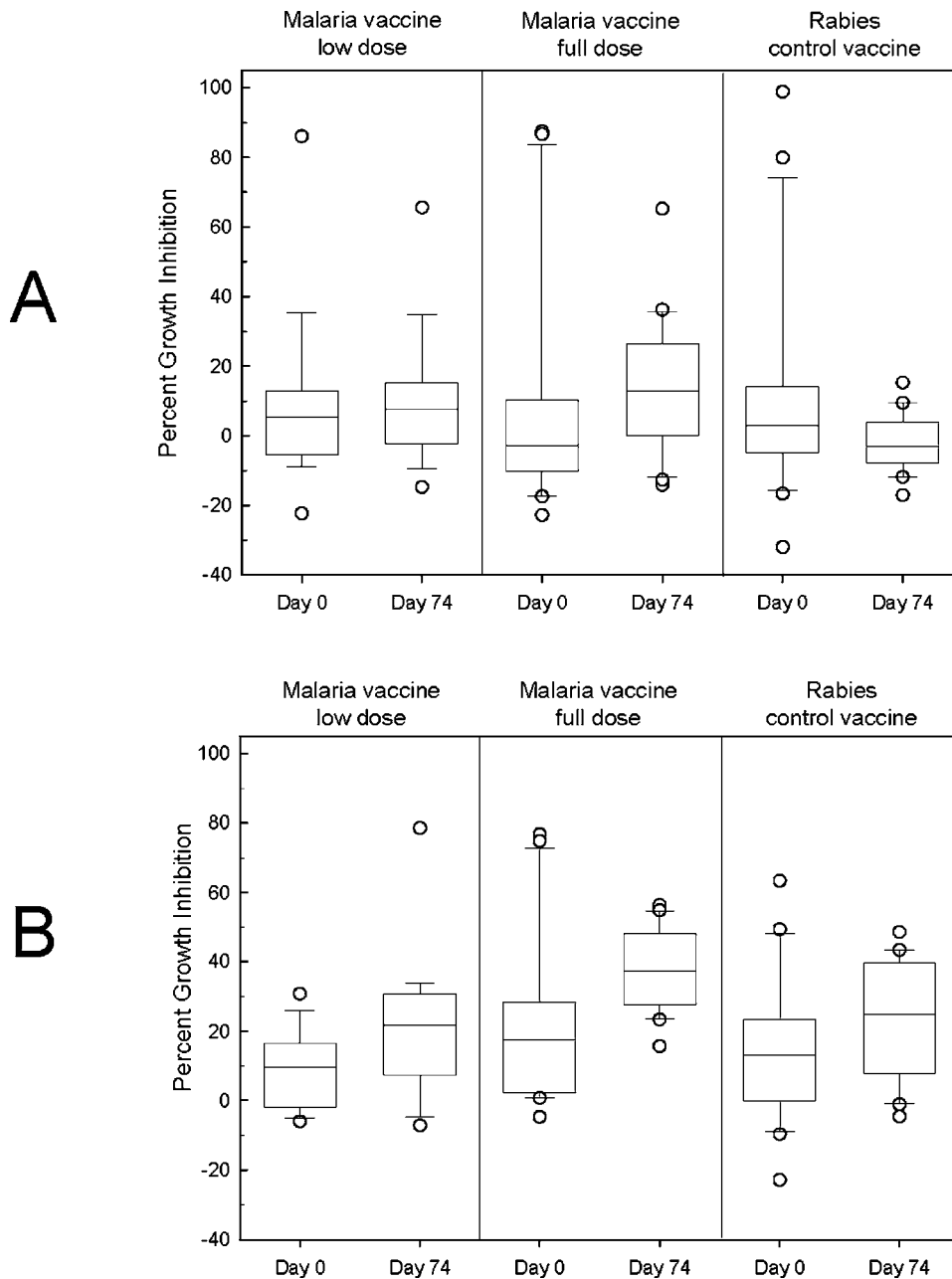


Figure 3. Growth inhibition assays. Mean percent growth inhibition of pre- and post-immunization sera against the 3D7 (A) and FVO (B) clones of *Plasmodium falciparum* grown in vitro. Error bars represent 95 percent confidence intervals. doi:10.1371/journal.pone.0001465.g003

the end of the 1 y study period, and the malaria vaccine half-dose group had higher antibody responses than the comparator group from 2 wk after the second immunization through 7 mo after the third immunization. Longitudinal analyses also suggested a dose-related antibody response with a trend toward higher responses in the full-dose group compared to the half-dose malaria vaccine group. Moreover, post-immunization sera from the full-dose group, but not the half-dose group, had significantly greater growth inhibition activity than sera from the comparator group against both homologous and heterologous parasites. Based on these data, the more immunogenic full dose of the vaccine (FMP2.1 50 μ g in 0.5 mL AS02A) was selected for further clinical development. This vaccine is presently undergoing evaluation in Phase 1 and 2 clinical trials in children at this site.

Generalizability

The safety and tolerability profile of the FMP2.1/AS02A vaccine was similar to that seen in a previous trial of this vaccine in North American malaria-naïve volunteers [21] and in trials of a similar recombinant protein blood-stage malaria vaccine with the same adjuvant in this and other African populations [31,32].

While baseline antibody titers of AMA-1 antibodies were higher in this malaria-experienced population than in malaria-naïve North American volunteers [21], post-immunization titers were of a similar magnitude. Although antibody responses in a recent Phase 1 trial of another AMA-1 vaccine using Alhydrogel as an adjuvant [22] were measured using different methods than those used to measure responses to FMP2.1/AS02A, the FMP2.1/

AS02A vaccine induced more uniformly robust responses (with 100% of malaria-naïve and malaria-experienced vaccine recipients showing an increase in antibody titer), possibly due to use of the more potent adjuvant system. In addition to inducing high ELISA activity, the antibodies to FMP2.1/AS02A vaccine induced a moderate level of growth inhibitory activity against parasites expressing both homologous and heterologous AMA-1 [21]. Although a higher degree of background growth inhibition was observed using sera from malaria-experienced adults, immunization with 50 µg of FMP2.1/AS02A induced measurably higher inhibitory antibodies against both homologous and heterologous parasite strains than did the 25 µg FMP2.1/AS02A dose. Interestingly, responses measured against the FVO parasites were significantly higher than baseline at the post third immunization sampling for the rabies controls, suggesting a possible exposure during the study period to parasites similar to FVO with respect to AMA-1 and/or other antigens capable of stimulating allele-specific growth inhibition.

Although these results are promising, until a blood-stage malaria vaccine demonstrates clinical efficacy, immune correlates of vaccine-induced protection and the choice of immunogenicity endpoints for clinical development decisions will remain a matter of reasoned conjecture.

P. falciparum AMA-1 is extremely polymorphic, with more than 100 polymorphic amino acid sites, and in vitro experiments and studies in both animals and humans have indicated some degree of allele-specificity in the antibody responses to genetically different forms of AMA-1 [12,17–21]. The FMP2.1/AS02A vaccine is based on AMA-1 sequence from the 3D7 clone of *P. falciparum*. Other AMA-1-based vaccines are being developed based on AMA-1 sequence from the FVO clone [20] and from both 3D7 and FVO [22]. If immunity elicited by an AMA-1 vaccine is allele-specific, then initial vaccine efficacy may depend on the degree of homology at key amino acid residues between the vaccine antigen and AMA-1 in parasites circulating at vaccine trial sites. Moreover, vaccination may result in directional selection favoring AMA-1 alleles that are different from those targeted by the vaccine, resulting in reduced efficacy over time. As this and other AMA-1-based vaccines progress to trials measuring clinical efficacy, it will be important to measure allele-specific efficacy and to identify which specific polymorphisms or sets of polymorphisms are under selection by vaccine-induced immune responses. In the likely event that the genetic diversity of AMA-1 in natural populations of malaria parasites restricts the efficacy of AMA-1 vaccines, it may be necessary to construct a polyvalent and/or chimeric vaccine [33] based on detailed molecular epidemiological and molecular evolutionary analyses of vaccine efficacy and selection in early efficacy trials.

REFERENCES

- Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, et al. (2004) Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* 364: 1411–1420.
- Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, 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* 366: 2012–2018.
- Aponte JJ, Aide P, Renom M, Mandomando I, Bassat Q, et al. (2007) Safety of the RTS,S/AS02D candidate malaria vaccine in infants living in a highly endemic area of Mozambique: a double blind randomised controlled phase I/IIb trial. *Lancet* 370: 1543–1551.
- Heppner DG, Jr, Kester KE, Ockenhouse CF, Tornieporth N, Ofori O, et al. (2005) Towards an RTS,S-based, multi-stage, multi-antigen vaccine against falciparum malaria: progress at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine* 23: 2243–2250.
- Stewart VA, McGrath SM, Dubois PM, Pau MG, Mettens P, et al. (2007) Priming with an adenovirus 35-circumsporozoite protein (CS) vaccine followed by RTS,S/AS01B boosting significantly improves immunogenicity to *Plasmodium falciparum* CS compared to that with either malaria vaccine alone. *Infect Immun* 75: 2283–2290.
- Ripley BW (2007) Obstacles to the development of a safe and effective attenuated pre-erythrocytic stage malaria vaccine. *Microbes Infect* 9: 761–766.
- Luke TC, Hoffman SL (2003) Rationale and plans for developing a non-replicating, metabolically active, radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *J Exp Biol* 206: 3803–3808.
- Narum DL, Thomas AW (1994) Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol* 67: 59–68.
- Kocken CH, van der Wel AM, Dubbeld MA, Narum DL, van de Rijke FM, et al. (1998) Precise timing of expression of a *Plasmodium falciparum*-derived

Overall evidence

Based on its good safety profile, acceptable tolerability, and robust antibody responses, the AMA-1-based malaria vaccine FMP2.1/AS02A is being evaluated in Phase 1 and Phase 2 clinical trials in children aged 1–6 years at the Bandiagara Malaria Project in Mali. If the results of these trials are promising, the development pathway for this vaccine could include incorporating the FMP2.1 antigen as one component of a multi-stage, multi-antigen malaria vaccine in combination with RTS,S [4], improved adjuvant formulations [34] and/or separate development as a disease-blocking vaccine for use in targeted populations in high malaria transmission areas. As AMA-1 malaria vaccines move into efficacy trials, the impact of genetic diversity on malaria vaccine efficacy is likely to emerge as a critical problem requiring integration of methods and concepts drawn from molecular epidemiology, molecular evolution, immunology and structural vaccinology.

SUPPORTING INFORMATION

Checklist S1 CONSORT checklist

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0001465.s001 (0.06 MB DOC)

Protocol S1 Trial protocol

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0001465.s002 (0.62 MB PDF)

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Abdi Naficy and Lee Hall of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases for support and advice; Hamar A. Traore and Issa Ben Zacour for serving as Local Medical Monitors and with Vasee Moorthy and Samba Sow on the Safety Monitoring Committee; Mohamed Keita, Aphou Salle Kone, Abdoulaye Traore and Boubacar Maiga for clinical assistance; Danzele Coulibaly and Moctar Traore for administrative support; the chief medical officer of the Bandiagara District Hospital Mahamadou Cisse for technical support; William Blackwelder for statistical support; David Diemert for support of the clinical laboratory; the study monitors, Kathy Ormanoski and Anna-Marie Seale; Nicole Eddington and Sally Robinson for technical assistance; Linda Rosendorf for regulatory support; and the community of Bandiagara, Mali.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CP AG ID AN MD SID EB SD AO JC AL MT OD DD DC IS ADi EA LS KL AK CD DL ST ABG KT M-CD DH MB Ado. Performed the experiments: CP AG ID AN MD SID EB, JN MT OD DD DC VS EA KL AK ST ABG KT MB MS Ado. Analyzed the data: CP EB MT IS ADi VS EA ST MSS. Contributed reagents/materials/analysis tools: SD JC AL VS EA DL M-CD DH. Wrote the paper: CP EB SD AO JC AL MT OD DD DC IS ADi VS EA LS KL CD DL ST M-CD DH MSS.

- transgene in *Plasmodium berghei* is a critical determinant of subsequent subcellular localization. *J Biol Chem* 273: 15119–15124.
10. Deans JA, Alderson T, Thomas AW, Mitchell GH, Lennox ES, et al. (1982) Rat monoclonal antibodies which inhibit the in vitro multiplication of *Plasmodium knowlesi*. *Clin Exp Immunol* 49: 297–309.
 11. Thomas AW, Deans JA, Mitchell GH, Alderson T, Cohen S (1984) The Fab fragments of monoclonal IgG to a merozoite surface antigen inhibit *Plasmodium knowlesi* invasion of erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 13: 187–199.
 12. Hodder AN, Crewther PE, Anders RF (2001) Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. *Infect Immun* 69: 3286–3294.
 13. Dutta S, Haynes JD, Moch JK, Barbosa A, Lanar DE (2003) Invasion-inhibitory antibodies inhibit proteolytic processing of apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12295–12300.
 14. Thomas AW, Trape JF, Rogier C, Goncalves A, Rosario VE, et al. (1994) High prevalence of natural antibodies against *Plasmodium falciparum* 83-kilodalton apical membrane antigen (PF83/AMA-1) as detected by capture-enzyme-linked immunosorbent assay using full-length baculovirus recombinant PF83/AMA-1. *Am J Trop Med Hyg* 51: 730–740.
 15. Udhayakumar V, Kariuki S, Kolezack M, Girma M, Roberts JM, et al. (2001) Longitudinal study of natural immune responses to the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen (AMA-1) in a holoendemic region of malaria in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project VIII. *Am J Trop Med Hyg* 65: 100–107.
 16. Escalante AA, Grebert HM, Chaiyaroj SC, Magris M, Biswas S, et al. (2001) Polymorphism in the gene encoding the apical membrane antigen-1 (AMA-1) of *Plasmodium falciparum*. X. Asembo Bay Cohort Project. *Mol Biochem Parasitol* 113: 279–287.
 17. Cortes A, Mellombo M, Mueller I, Benet A, Reeder JC, et al. (2003) Geographical structure of diversity and differences between symptomatic and asymptomatic infections for *Plasmodium falciparum* vaccine candidate AMA1. *Infect Immun* 71: 1416–1426.
 18. Healer J, Murphy V, Hodder AN, Masciantonio R, Gemmill AW, et al. (2004) Allelic polymorphisms in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 52: 159–168.
 19. Kennedy MC, Wang J, Zhang Y, Miles AP, Chitsaz F, et al. (2002) In vitro studies with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1): production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response. *Infect Immun* 70: 6948–6960.
 20. Kocken CH, Withers-Martinez C, Dubbeld MA, van der WA, Hackett F, et al. (2002) High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. *Infect Immun* 70: 4471–4476.
 21. Polhemus ME, Magill AJ, Cummings JF, Kester KE, Ockenhouse CF, et al. (2007) Phase I dose escalation safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* apical membrane protein (AMA-1) FMP2.1, adjuvanted with AS02A, in malaria-naïve adults at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine* 25: 4203–4212.
 22. Malkin EM, Diemert DJ, McArthur JH, Perreault JR, Miles AP, et al. (2005) Phase I clinical trial of apical membrane antigen 1: an asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 73: 3677–3685.
 23. Dutta S, Lalitha PV, Ware LA, Barbosa A, Moch JK, et al. (2002) Purification, characterization, and immunogenicity of the refolded ectodomain of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 expressed in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 70: 3101–3110.
 24. Lyke KE, Dicko A, Kone A, Coulibaly D, Guindo A, et al. (2004) Incidence of severe *Plasmodium falciparum* malaria as a primary endpoint for vaccine efficacy trials in Bandiagara, Mali. *Vaccine* 22: 3169–3174.
 25. Coulibaly D, Diallo DA, Thera MA, Dicko A, Guindo AB, et al. (2002) Impact of pre-season treatment on incidence of falciparum malaria and parasite density at a site for testing malaria vaccines in Bandiagara, Mali. *Am J Trop Med Hyg* 67: 604–610.
 26. Diallo DA, Doumbo OK, Plowe CV, Wellem TE, Emanuel EJ, et al. (2005) Community permission for medical research in developing countries. *Clin Infect Dis* 41: 255–259.
 27. Wu JY, Gardner BH, Murphy CI, Seals JR, Kensil CR, et al. (1992) Saponin adjuvant enhancement of antigen-specific immune responses to an experimental HIV-1 vaccine. *J Immunol* 148: 1519–1525.
 28. Soltysik S, Bedore DA, Kensil CR (1993) Adjuvant activity of QS-21 isomers. *Ann N Y Acad Sci* 690: 392–395.
 29. Bergmann-Leitner E, Duncan E, Burge J, Spring M, Angov E (2007) Miniaturization of a high throughput pLDH-based *Plasmodium falciparum* growth inhibition assay for small volume samples from preclinical and clinical vaccine trials. *Am J Trop Med Hyg*; In press.
 30. Sy NE, Oberst RB, Macalagay PS, Fallarme VD, Cruzada SF, et al. (1990) In vitro growth inhibition of *Plasmodium falciparum* by sera from different regions of the Philippines. *Am J Trop Med Hyg* 43: 243–247.
 31. Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Diallo DA, Sagara I, et al. (2006) Safety and allele-specific immunogenicity of a malaria vaccine in Malian adults: results of a Phase I randomized trial. *PLoS Clin Trials* 1: e34.
 32. Withers MR, McKinney D, Ogutu BR, Waitumbi JN, Milman JB, et al. (2006) Safety and reactogenicity of an MSP-1 malaria vaccine candidate: a randomized Phase Ib dose-escalation trial in Kenyan children. *PLoS Clin Trials* 1: e32.
 33. Dutta S, Lee SY, Batchelor AH, Lanar DE (2007) Structural basis of antigenic escape of a malaria vaccine candidate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12488–12493.
 34. Stewart VA, McGrath SM, Walsh DS, Davis S, Hess AS, et al. (2006) Pre-clinical evaluation of new adjuvant formulations to improve the immunogenicity of the malaria vaccine RTS,S/AS02A. *Vaccine* 24: 6483–6492.

4.2 Essai clinique contrôlé et randomisé de phase 1b chez l'enfant

Article II : Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Laurens MB, Kone AK, Guindo AB, Traore K, Sissoko M, Diallo DA, Diarra I, Kouriba B, Daou M, Dolo A, Baby M, Sissoko MS, Sagara I, Niangaly A, Traore I, Olotu A, Godeaux O, Leach A, Dubois MC, Ballou WR, Cohen J, Thompson D, Dube T, Soisson L, Diggs CL, Takala SL, Lyke KE, House B, Lanar DE, Dutta S, Heppner DG, Plowe CV. Safety and immunogenicity of an AMA1 malaria vaccine in Malian children: results of a phase 1 randomized controlled trial. PLoS One. 2010 Feb 4;5(2):e9041.

La visite de sélection a porté sur 301 personnes pour en retenir 100 répondant aux critères d'inclusion et d'exclusion. Les participants ont été repartis en trois cohortes. Dans la cohorte 1 faible dose, les participants ont reçu trois doses espacées d'un mois de 10mcg d'antigène vaccinal FMP2.1, reconstitué dans un volume final de 0,1ml d'AS02A. Dans la cohorte 2, moyenne dose, les participants ont reçu trois doses espacées d'un mois de 25mcg d'antigène vaccinal FMP2.1, reconstitué dans un volume final de 0,25ml d'AS02A. Dans la cohorte 3, forte dose, les participants ont reçu trois doses espacées d'un mois de 50mcg d'antigène vaccinal FMP2.1, reconstitué dans un volume final de 0,50ml d'AS02A. Dans chaque cohorte les participants ont été randomisés dans un ratio 3:1 à recevoir soit le vaccin antipaludique, soit le vaccin antirabique. Les principales raisons d'exclusion étaient la présence de maladies telles l'anémie, les infections respiratoires, le paludisme. Le taux de maintien dans l'étude était de 96% après 12 mois. Dans la cohorte 1, un enfant a raté la troisième dose de FMP2.1/AS02A à cause de l'anémie. Dans la cohorte 2 trois enfants ont raté la troisième dose de FMP2.1/AS02A à cause d'un cas d'hépatite A, un cas d'hépatite B et un cas de souffle cardiaque dont l'investigation ultérieure n'a pas montré de maladie cardiaque. Deux enfants ont raté la troisième dose du vaccin antirabique à cause de l'hépatite A. Dans la cohorte 3, trois enfants ont raté la troisième dose de FMP2.1/AS02A pour hépatite A dans un cas, pour anémie dans un autre cas et pour retrait du consentement par le père dans le troisième cas. Le cas d'anémie a aussi raté la seconde dose de FMP2.1/AS02A. Les participants ayant raté une ou deux doses ont continué à être suivis dans l'étude jusqu'à la fin sauf pour le cas de retrait de consentement. Ce cas a été classé comme perdu de vue, de même que trois autres participants de la cohorte 2 qui avaient voyagé en dehors de la zone d'étude après avoir reçu leurs trois doses de vaccin.

Le vaccin candidat a été bien toléré dans cette population d'enfants. En bref au niveau local, les douleurs au site d'injection et les œdèmes au site d'injection étaient plus fréquentes dans les trois groupes de dose du vaccin candidat FMP2.1/AS02A en comparaison avec le

groupe du vaccin antirabique. Les œdèmes au site d'injection de grade 3 étaient plus fréquents dans le groupe forte dose FMP2.1/AS02A et étaient souvent associés à la douleur de grade 1 ou 2. La fréquence des EIs locaux avait tendance à diminuer dans tous les groupes aux vaccinations suivantes. Ces EIs locaux ont été temporaires et tous se sont résolus dans les 7 jours suivant la vaccination. La fièvre a été l'EI général le plus fréquemment rapporté. Sa proportion était la plus grande dans la cohorte 2. Tous les EIs généraux étaient de grade 1 ou 2 et tous se sont résolus dans les 7 jours suivant la vaccination.

Les EIs non sollicités, de même que les anomalies des paramètres biologiques ont été fréquents et ont reflété la pathologie habituellement rencontrée dans ce groupe d'âge à Bandiagara. Quatre EIGs ont été rapportés pendant l'étude. Le premier EIG était un cas d'élévation du taux des globules blancs après la première dose de FMP2.1/AS02A dans la cohorte 1. L'EIG est survenu en même temps qu'un accès palustre qui pourrait l'expliquer de façon plausible. L'évènement s'est résolu peu après la fin de l'accès palustre. Les trois autres EIGs étaient des augmentations anormales et importantes du taux des ALAT. Dans deux cas l'augmentation des ALATs a été expliquée par un épisode d'hépatite A. Toutefois la relation temporelle avec la vaccination a rendu plausible une amplification de l'augmentation du taux des ALATs. Dans le dernier cas l'augmentation du taux des ALATs est survenu suite à une hépatite B confirmée par les tests sérologiques et à distance des vaccinations. Le taux des ALATs est revenu à la normale dans les trois cas après quatre semaines et sans séquelles.

Du point de vue de la réponse immunitaire, toutes les doses de FMP2.1/AS02A ont induit une augmentation forte et durable du taux des IgG totaux en comparaison avec le niveau dans le groupe témoin et aussi en comparaison avec les niveaux au début de l'étude. Les taux d'IgG de base étaient faibles. Dans les groupes FMP2.1/AS02A, une multiplication par 100 par rapport au niveau de base a été observé. Cela a fait monter le taux des IgG des enfants à des niveaux comparables ou supérieurs aux taux observés chez les adultes

En résumé les trois doses du vaccin FMP2.1/AS02A ont montré une bonne tolérance dans la population des enfants âgés de 1-6 ans à Bandiagara naturellement exposés au paludisme. En plus le produit a induit une stimulation très importante et durable de la production d'IgG, dépassant les niveaux rencontrés chez les adultes semi immuns. Cela nourrit l'espoir qu'une telle réponse immunitaire puisse générer une protection contre le paludisme. Ces résultats ont supporté le choix de continuer le développement clinique de la

forte dose de FMP2.1/AS02A, qui était la plus forte dose à avoir été bien tolérée, en essai de phase 2b dans la même population à Bandiagara.

Safety and Immunogenicity of an AMA1 Malaria Vaccine in Malian Children: Results of a Phase 1 Randomized Controlled Trial

Mahamadou A. Thera¹, Ogobara K. Doumbo¹, Drissa Coulibaly¹, Matthew B. Laurens², Abdoulaye K. Kone¹, Ando B. Guindo¹, Karim Traore¹, Mady Sissoko¹, Dapa A. Diallo¹, Issa Diarra¹, Bourema Kouriba¹, Modibo Daou¹, Amagana Dolo¹, Mounirou Baby¹, Mahamadou S. Sissoko¹, Issaka Sagara¹, Amadou Niangaly¹, Idrissa Traore¹, Ally Olotu^{3ab}, Olivier Godeaux³, Amanda Leach³, Marie-Claude Dubois³, W. Ripley Ballou^{3aa}, Joe Cohen³, Darby Thompson⁴, Tina Dube⁴, Lorraine Soisson⁵, Carter L. Diggs⁵, Shannon L. Takala², Kirsten E. Lyke², Brent House⁶, David E. Lanar⁶, Sheetij Dutta⁶, D. Gray Heppner⁶, Christopher V. Plowe^{2*}

1 Malaria Research and Training Center, University of Bamako, Bamako, Mali, **2** Howard Hughes Medical Institute/Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, United States of America, **3** GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium, **4** EMMES Corporation, Rockville, Maryland, United States of America, **5** Malaria Vaccine Development Program, U.S. Agency for International Development, Washington, D.C., United States of America, **6** Division of Malaria Vaccine Development, Walter Reed Army Institute of Research, Silver Spring, Maryland, United States of America

Abstract

Background: The objective was to evaluate the safety and immunogenicity of the AMA1-based malaria vaccine FMP2.1/AS02_A in children exposed to seasonal falciparum malaria.

Methodology/Principal Findings: A Phase 1 double blind randomized controlled dose escalation trial was conducted in Bandiagara, Mali, West Africa, a rural town with intense seasonal transmission of *Plasmodium falciparum* malaria. The malaria vaccine FMP2.1/AS02_A is a recombinant protein (FMP2.1) based on apical membrane antigen 1 (AMA1) from the 3D7 clone of *P. falciparum*, formulated in the Adjuvant System AS02_A. The comparator vaccine was a cell-culture rabies virus vaccine (RabAvert[®]). One hundred healthy Malian children aged 1–6 years were recruited into 3 cohorts and randomized to receive either 10 µg FMP2.1 in 0.1 mL AS02_A, or 25 µg FMP2.1 in 0.25 mL AS02_A, or 50 µg FMP2.1 50 µg in 0.5 mL AS02_A, or rabies vaccine. Three doses of vaccine were given at 0, 1 and 2 months, and children were followed for 1 year. Solicited symptoms were assessed for 7 days and unsolicited symptoms for 30 days after each vaccination. Serious adverse events were assessed throughout the study. Transient local pain and swelling were common and more frequent in all malaria vaccine dosage groups than in the comparator group, but were acceptable to parents of participants. Levels of anti-AMA1 antibodies measured by ELISA increased significantly (at least 100-fold compared to baseline) in all 3 malaria vaccine groups, and remained high during the year of follow up.

Conclusion/Significance: The FMP2.1/AS02_A vaccine had a good safety profile, was well-tolerated, and induced high and sustained antibody levels in malaria-exposed children. This malaria vaccine is being evaluated in a Phase 2 efficacy trial in children at this site.

Trial Registration: ClinicalTrials.gov NCT00358332 [<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00358332>]

Citation: Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Laurens MB, Kone AK, et al. (2010) Safety and Immunogenicity of an AMA1 Malaria Vaccine in Malian Children: Results of a Phase 1 Randomized Controlled Trial. PLoS ONE 5(2): e9041. doi:10.1371/journal.pone.0009041

Editor: James G. Beeson, Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Australia

Received: June 23, 2009; **Accepted:** January 7, 2010; **Published:** February 4, 2010

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Public Domain declaration which stipulates that, once placed in the public domain, this work may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose.

Funding: Site development and the conduct of the trial were supported by contract N01A185346 and cooperative agreement U19AI065683 from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), grant D43TW001589 from the Fogarty International Center, National Institutes of Health, and contract W81XWH-06-1-0427 from the United States Department of Defense and the United States Agency for International Development (USAID). Data management was provided by the EMMES Corporation through a contract with NIAID. Vaccine production and laboratory assays were supported by USAID, Washington, D.C. and by the Military Infectious Diseases Research Program, Fort Detrick, Maryland. Program staff from NIAID (the primary funder) contributed to study design discussions but played no role in the data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Coauthors LS and CD from USAID (a secondary funder) contributed to both protocol design and manuscript preparation. CVP is supported by a Distinguished Clinical Scientist Award from the Doris Duke Charitable Foundation and by the Howard Hughes Medical Institute.

Competing Interests: SD and DEL hold patents for the FMP2.1 vaccine antigen. OG, AL, WRB, MCD and JC are or were employees of GlaxoSmithKline Biologicals, the manufacturer of the proprietary Adjuvant System AS02_A, and hold shares in GlaxoSmithKline. None of the other authors have declared conflict of interest.

* E-mail: cplove@medicine.umaryland.edu

^{aa} Current address: Bill and Melinda Gates Foundation, Seattle, Washington, United States of America

^{ab} Current address: KEMRI-Wellcome Trust Research Programme, Kilifi, Kenya

Introduction

A safe and effective malaria vaccine would be a major addition to current malaria control tools and could reinforce hope for malaria eradication. The *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1) is considered to be a promising antigen for blood stage vaccine development based on evidence that it plays a critical role during merozoite invasion of erythrocytes and that this function can be abrogated with inhibitory antibodies [1–5], and on sero-epidemiological studies showing association of anti-AMA1 antibodies with naturally acquired protection against malaria [6,7]. A vaccine that boosts levels of anti-AMA1 antibodies might therefore reduce the risk that malaria infection will cause clinical disease, making AMA1 an attractive candidate for inclusion in a multi-stage, multi-antigen malaria vaccine [8].

AMA1 is highly polymorphic—more than 300 unique AMA1 haplotypes have been identified worldwide and more than 200 at a single site in Mali [9]. This extreme genetic diversity presumably results from balancing selection driven by host immunity. In vitro [10] and animal studies [4,11,12] have suggested the possibility of strain-specific immunity, raising concern that AMA1 vaccines based on one or a few alleles might not provide broad protection [13]. However, both in vitro [14] and molecular epidemiological [9,15] studies have suggested possible diversity-covering approaches to developing effective AMA1 vaccines.

Three AMA1-based adjuvanted protein vaccines have been evaluated in clinical trials in Mali, including two different monovalent vaccines based on AMA1 derived from the 3D7 and FVO clones of *P. falciparum*, respectively, [12,16,17] and a bivalent vaccine that includes both the 3D7 and FVO versions of AMA1 adjuvanted with aluminum hydroxide [18–20]. The failure of this bivalent AMA1 vaccine to protect children in a Phase 2 trial in Mali [20] may be due to the relatively modest and short-lived nature of the antibody responses generated by the vaccine and/or to the inability to overcome genetic diversity.

FMP2.1 is a lyophilized preparation of the ectodomain of the 3D7 clone of *P. falciparum* AMA1 [21]. A Phase 1 study in malaria-naïve North American volunteers found that the AMA1-based vaccine FMP2.1/AS02_A elicited potent humoral and cellular immune responses and that immune sera recognized sporozoites and merozoites by immunofluorescence assay and inhibited both parasite growth and AMA1 processing in homologous 3D7 parasites [16]. The first Phase 1 study of this vaccine in a malaria-exposed population found it to have promising safety and tolerability profiles in adults in Bandiagara, Mali, and to elicit dose-dependent anti-AMA1 antibody responses [17] as well as IL-5 production and lymphocyte proliferative responses [22].

The overall objective of the current study was to identify an optimal pediatric dose of FMP2.1/AS02_A that is safe, with high immunogenicity and acceptable reactogenicity, for progression to efficacy testing. The safety and reactogenicity of FMP2.1/AS02_A, as well as the magnitude and duration of the antibody response, were evaluated in children naturally exposed to *P. falciparum* infection.

Methods

The protocol and supporting CONSORT checklist are available as supporting information; see Protocol S1 and Checklist S1.

Study Setting

The study was conducted at the Bandiagara Malaria Project research clinic adjacent to the district hospital in Bandiagara, a rural town of 13,634 inhabitants in the Dogon Country in

northeast Mali. Bandiagara is relatively dry, with a mean annual rainfall of 600 mm. *Anopheles gambiae* is the principal malaria vector. Malaria transmission is highly seasonal, with minimal transmission at the height of the dry season in March; less than one infected bite per person per month as the transmission season starts and ends in June and December, respectively; and a peak of up to 60 infected mosquito bites per person per month in August or September [23,24]. *P. falciparum* represents 97% of malaria infections with 3% due to *P. malariae* and rare infections with *P. ovale*. Despite the seasonal transmission pattern, the malaria burden is heavy: children aged less than 10 years have an average of 2 clinical malaria episodes every transmission season [24], and severe malaria afflicts 1 in 50 children aged less than 6 years each year [23]. Older children and adults are relatively protected against malaria disease, but remain susceptible to infection.

Participants

After obtaining community permission as described by Diallo et al. [25], the trial was publicized by local radio broadcast. Parents were invited to bring children aged 1 to 6 years to the research clinic to be screened for eligibility. Children were eligible for inclusion if they planned to remain in Bandiagara for at least 12 months and if their parents or guardians gave written informed consent. Exclusion criteria included: significant current illness as indicated by history, examination and/or laboratory testing including complete blood counts, alanine aminotransferase (ALT) and serum creatinine; previous immunization with a rabies vaccine or any experimental vaccine; chronic use of immunosuppressants; receipt of blood products during the previous 6 months; and allergy to substances present in the vaccines.

Ethics

The trial was conducted in compliance with the International Conference on Harmonisation Good Clinical Practices, the Declaration of Helsinki and regulatory requirements of Mali. The protocol was approved by institutional review boards of the University of Bamako Faculty of Medicine, University of Maryland Baltimore, and the U.S. Army Surgeon General. Separate written informed consent was obtained for screening and enrollment. Verbal consent of illiterate parents or guardians was administered and then documented using their thumbprints, a process verified by signatures of independent witnesses. Permission to import and administer the investigational products in Mali was granted by the Republic of Mali Ministry of Health. The trial was monitored by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of Microbiology and Infectious Diseases and the United States Army Medical Material Development Activity.

Interventions

The FMP2.1 antigen (Lot 1046) is comprised of amino acids #83-531 corresponding to the ectodomain of AMA1 derived from the 3D7 clone of *P. falciparum*. The protein was produced in and purified from *E. coli* bacteria under current Good Manufacturing Practices (cGMP) at the Walter Reed Army Institute of Research Pilot Bioproduction Facility (Forest Glen, Maryland, United States) [21]. The vaccine was provided in vials containing approximately 50 µg of lyophilized protein.

The AS02_A Adjuvant System is composed of an oil-in-water emulsion and 2 immuno-stimulants, 3-deacylated monophosphoryl lipid A and QS21, a saponin agent derived from the soap bark tree, *Quillaja saponaria* [26,27]. AS02_A was manufactured by GlaxoSmithKline Biologicals (Rixensart, Belgium) according to cGMP and provided in pre-filled syringes. The whole content of each FMP2.1 vial was dissolved by adding the contents of 0.62 mL

pre-filled syringes of AS02_A to the vial immediately before injection, mixing well, and withdrawing into a new syringe. The RabAvert[®] rabies vaccine (Chiron Corporation, Emeryville, California, United States) is a sterile freeze-dried vaccine obtained by growing the fixed-virus strain Flury LEP in primary cultures of chicken fibroblasts. It is supplied in pre-filled syringes containing lyophilized antigen to which 1 mL of sterile water was added as diluent before injection. All doses of all vaccines were administered by intramuscular injection preferably in the left deltoid muscle.

One hundred children aged 1 to 6 years were sequentially assigned to 3 cohorts of 20, 40 and 40 participants with stratification for age by 2-year increments (1–2 years, 3–4 years, and 5–6 years) to ensure that the study groups were balanced by age in case of age-related differences in tolerability or immunogenicity. Within each cohort, participants were randomized in a 3:1 fashion to receive 10, 25 or 50 µg of FMP2.1 adjuvanted with a proportionate volume of AS02_A, or rabies vaccine. After reconstitution, the doses of FMP2.1/AS02_A were approximately: 10 µg of FMP2.1 in a final volume of 0.10 mL AS02_A in Cohort 1, 25 µg of FMP2.1 in a final volume of 0.25 mL AS02_A in Cohort 2, and 50 µg FMP2.1 in a final volume of 0.5 mL in Cohort 3. Because the final injection volumes were slightly smaller than the reconstitution volumes, the doses of the FMP2.1 antigen delivered were slightly less than 10, 25 or 50 µg. Vaccines were given on a 0-, 1- and 2-month schedule. In each cohort, older children were immunized at least one day before younger children so that vaccine responses could be observed first in older children before exposing younger children to potential risks of vaccination. The first vaccination was given in early November 2006 near the end of the peak malaria transmission season; the second and the third doses were given in December - February 2007, when malaria transmission typically declines to virtually undetectable levels at this site. The final study follow-up visit on day 364 coincided with the end of the 2007 malaria transmission season. The cohorts were immunized in a staggered fashion to permit interim safety analyses; each successive immunization of Cohort 1 was followed in approximately 3 weeks by the corresponding immunization of Cohort 2. Immunizations of Cohort 2 were followed in a similar way by immunizations of Cohort 3. Two interim safety analyses were reviewed by an independent Data and Safety Monitoring Board, which provided written recommendations to proceed before each of the first immunizations of Cohorts 2 and 3.

Objectives

The primary objective was to evaluate the safety and reactogenicity of 3 injections of 3 different dose levels of the malaria vaccine FMP2.1/AS02_A in malaria-experienced Malian children. The secondary objective was to measure the magnitude and duration of antibody responses to FMP2.1. Exploratory objectives include measuring vaccine-induced cellular immune responses at baseline and after immunization (results to be presented elsewhere).

Outcomes

The primary outcome was safety, measured as 1) occurrence of solicited symptoms during a 7-day follow-up period after immunization (day of immunization and days 1, 2, 3 and 7 after immunization); 2) occurrence of unsolicited symptoms during a 30-day follow-up period after each immunization (day of immunization and 29 subsequent days); and 3) occurrence of serious adverse events (SAE) during the study period. Secondary outcome measures include serum antibody levels and activity of anti-FMP2.1 measured against recombinant 3D7 AMA1 at baseline and at specified times during and after immunization.

Assessment of safety and tolerability. Following each immunization, participants were directly observed for 60 minutes, then evaluated at the study clinic 1, 2, 3, 7, 14 and 30 days after each immunization and on study days 120, 180, 272 and 364. Starting on day 180, monthly home visits were made to check the health status of participants and to encourage parents or guardians to bring them to the research clinic if they felt ill. Study physicians were available at the research clinic at all times throughout the 12-month study period to assess and treat adverse events.

Clinical evaluations consisted of measurement of vital signs and assessment for local injection site and general solicited signs or symptoms. Local signs and solicited symptoms included pain or tenderness, swelling, and erythema at the injection site. General signs and solicited symptoms included fever (oral temperature $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$), vomiting, irritability/fussiness, drowsiness and loss of appetite. Any other signs or symptoms were considered to be unsolicited, as were signs or symptoms that occurred more than 7 days after immunization. Solicited symptoms were considered to be related to the study vaccines. Unsolicited signs and symptoms were recorded during the 30 days after each immunization, whereas SAEs were monitored throughout the 12-month study period.

Blood was collected at screening, on immunization days, 7 days after each immunization and on study days 90, 180, 272 and 364 to determine complete blood count, ALT and serum creatinine. Although clinical malaria episodes were not formally assessed as a study endpoint, malaria microscopy was performed for diagnostic purposes whenever participants presented with symptoms suggestive of malaria.

Adverse events were graded by severity and judged for potential association to study vaccines. Solicited adverse events were graded according to the system outlined in Table 1. Other non-laboratory adverse events were classified as grade 1–3 adverse events. Grade 1 adverse events were easily tolerated, causing minimal discomfort and not interfering with daily activities. Grade 2 adverse events were sufficiently discomforting to interfere with normal activities. Grade 3 adverse events prevented normal daily activities. For laboratory tests, toxicity grading was assigned using normal reference ranges based on a similar local pediatric population with the exception of absolute lymphocyte counts, which were based on normal values in Ugandan children [28].

Antibody responses to AMA1. Antibody levels (µg/mL) measuring total IgG against the *P. falciparum* 3D7 AMA1 vaccine antigen were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [16]. Briefly, plates were coated overnight at 4°C with the FMP2.1 recombinant AMA1 antigen (100 µL/well, 0.5 µg/mL), after which they were blocked with a 0.5% boiled casein buffer for 1 hour at 22°C. Test samples were added to the plate, serially diluted in 8 sequential 2-fold serial dilutions (done in triplicate) and incubated for 2 hours at 22°C. Secondary antibody (Affinity Purified Antibody Peroxidase Labeled Goat Anti-Human IgG (γ), KPL, Gaithersburg, Maryland, United States: Cat#074-1002) at a 1:4,000 dilution, was added and incubated for 1 hour at 22°C, after which substrate (ABTS Peroxidase Substrate System (2-Component), KPL: Cat#50-62-01) was added and incubated for an additional hour at 22°C. A stop solution (20% SDS) was added and the plates were read using a Spectromax 340PC Plate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, California, United States). Between each incubation step the wells were washed in PBS using a SkanWasher Plate Washer (Molecular Devices) with four washing cycles of 400 µl each. Antibody responses were measured on serum obtained from participants at the time of each immunization (study days 0 [baseline], 30 and 60), and 1, 4, 7 and 10 months after the scheduled time of the last immunization (study days 90, 180, 272 and 364).

Table 1. Assessment of Solicited Adverse Event (AE) Intensity.

Solicited AE	Grade	Intensity Definition
Pain/tenderness at injection site	0	Absent
	1	Minor reaction to touch
	2	Cries/protests on touch
	3	Cries when limb is moved/spontaneously painful
Swelling at injection site	0	Absent
	1	<5 mm
	2	5–20 mm
	3	>20 mm
Erythema at injection site	0	Absent
	1	<5 mm
	2	5–20 mm
	3	>20 mm
Limitation of arm motion/shoulder abduction	0	None
	1	>90° but <120°
	2	>30° but ≤90°
	3	≤30°
Fever	0	<37.5°C
	1	37.5–38.0°C
	2	38.1–39.0°C
	3	>39.0°C
Irritability/fussiness	0	Behavior as usual
	1	Crying more than usual/no effect on normal activity
	2	Crying more than usual/interferes with normal activity
	3	Crying that cannot be comforted/prevents normal activity
Drowsiness	0	Behavior as usual
	1	Drowsiness easily tolerated
	2	Drowsiness that interferes with normal activity
	3	Drowsiness that prevents normal activity
Loss of appetite	0	Normal
	1	Eating less than usual/no effect on normal activity
	2	Eating less than usual/interferes with normal activity
	3	Not eating at all
Vomiting	0	Absent
	1	Occasional but able to eat/drink normal amounts
	2	Repeated with limited oral intake
	3	Continuous, unable to keep down liquids or solids

doi:10.1371/journal.pone.0009041.t001

Sample Size

The sample size of 15 in the 10 µg dose group and 30 each in the 25 µg and 50 µg dose groups was chosen to balance the need to detect any possible untoward reactions against the need to limit

the number of volunteers exposed to an experimental vaccine for evaluation of safety. This Phase 1 trial was thus not powered to detect differences between groups. We used a comparator vaccine group of 25 to permit broad estimates of the incidence of local and general side effects and of immune responses among vaccine recipients compared to controls. We began with a group of 20 children randomized 3:1 to receive 10 µg of FMP2.1 in 0.1 mL of AS02_A or rabies vaccine to rule out a common adverse reaction in children that would preclude further testing. This was not considered a dose level to be evaluated for further clinical development and thus did not warrant the larger sample size of the 25 µg and 50 µg dose level groups.

Randomization—Sequence Generation

Participants were randomized to one of 3 cohorts in the order of enrollment, with stratification for age by 2-year increments (1–2 years, 3–4 years, 5–6 years). Within each of the 3 cohorts, individual participants were randomized in a 3:1 ratio to receive either FMP2.1/AS02_A or rabies vaccine. The randomization sequence was generated by a computer program to ensure a 3:1 ratio of vaccine allocation. Randomly generated sequential codes linked each study number to a vaccine assignment (FMP2.1/AS02_A or rabies vaccine).

Randomization—Allocation Concealment

The randomization sequence was provided by the study statistician in an opaque sealed envelope to the study pharmacists. In addition the local safety monitor was provided with a sealed envelope to be opened if it was deemed necessary to determine urgently the intervention a participant had received; no such emergency unblinding occurred. The only people at the study site with access to the randomization codes during the study were the 2 study pharmacists, who had no contact with study participants and did not reveal vaccine assignments to anyone else. Study participants and investigators who assessed outcomes were blinded to vaccine assignment.

Randomization—Implementation

Clinical investigators assigned study numbers to participants of each group in the order in which they arrived at the clinic on the first day of immunization. On this day, study pharmacists opened the sealed envelope containing the vaccine assignments and prepared the vaccine to be administered to the respective study participant. The vaccine and dose assigned during the first immunization were maintained for second and third immunizations. The study pharmacists prepared the vaccines in a special room with access strictly limited to them and to study monitors. Syringes containing the prepared vaccines were passed through small sliding doors from the vaccine preparation room to separate, private vaccine administration rooms, where the immunizations were administered.

Blinding

The reconstituted rabies vaccine was a clear to slightly opaque, colorless suspension of 1 mL volume, while FMP2.1/AS02_A was off-white and 0.10, 0.25 or 0.5 mL in volume. Syringes containing vaccines were covered with opaque tape to conceal their contents from participants and immunizers. The study pharmacists, who were unblinded, had no study-related contact with participants and were not involved in outcome assessment. Because of the difference in volumes, the immunizers could potentially have deduced which vaccine was given to a specific participant, and therefore they did not participate in other study procedures, including follow-up assessments. The presence of both study

pharmacists and immunizers at the site was limited to the periods during which immunizations were given, and these individuals did not discuss vaccine allocation with other study staff.

Statistical Methods

Statistical analyses were performed using SAS version 9.2 (SAS, Cary, North Carolina, United States). Confidence intervals for geometric mean AMA1 antibody levels ($\mu\text{g/mL}$) were estimated by using \log_{10} -transformed values, calculating the 95% confidence interval based on the normal distribution, and then converting the limits to the original scale for presentation. T-tests were used to compare log-transformed antibody levels at each study time point. Longitudinal mixed models were also used to estimate the effect of vaccine dose on mean log-transformed antibody levels over time, using a spatial exponential covariance structure to model the correlation between measurements from the same individual while taking into account the number of study days between measurements. Safety and immunogenicity analyses were based on intention-to-treat, such that all available data were included in analyses.

Results

Participant Flow

Three hundred and one (301) children were screened, and 100 who fulfilled the criteria for inclusion were enrolled in the study (Figure 1). The most common reasons for exclusion were medical illnesses such as anemia, respiratory infections and malaria. Nine parents of screened children subsequently declined to allow their children to participate in the study. In Cohort 1, one participant missed the third vaccine dose due to an episode of anemia. In Cohort 2, the third dose was not given to 5 children due to: hepatitis B infection in one child, hepatitis A infections in 3 children and a new asymptomatic systolic heart murmur in another child, further assessments of whom uncovered no evidence of cardiac disease. In Cohort 3, one child had hepatitis A and was not given the third vaccine dose. In the same cohort, 2 children missed the second and third vaccine doses, in one case because of anemia diagnosed on the day that the second dose was due, and in the other case, because the participant's father withdrew consent for blood collection after first vaccination. Children who missed vaccine doses continued to be followed throughout the duration of the study.

Recruitment and Surveillance

Participants were recruited between October 28 and November 30, 2006. Immunizations for Cohort 1 began on November 3, 2006, for Cohort 2 on November 23, 2006, and for Cohort 3 on December 13, 2006. Subsequent immunizations were done at 30-day intervals following this staggered start. Active surveillance of participants for 30 days after each immunization was completed in March 2007, corresponding to study day 90. The database was locked for the primary unblinded analysis after study day 90 so that results could be used to plan a Phase 2 trial, and the study continued in a single-blinded fashion, although individual study allocations were not disclosed to on-site study investigators or staff, with the exception of the principal investigator. The extended surveillance phase included continuous free access to basic medical care at the research clinic, monthly home visits, and scheduled visits on study days 180, 272 and 364. Of the 100 children enrolled, 96 completed the follow-up schedule.

Baseline Data

The four study groups were similar at enrollment with regard to gender, age or laboratory parameters (Table 2). Forty-nine of 100 participants were female.

Numbers Analyzed

All available data from all participants, including partial data from participants lost to follow-up, were included in both safety and immunogenicity analyses.

Safety and Reactogenicity

Local solicited adverse events. Injection site swelling and pain were the most common local solicited adverse events reported during the 7 day post-immunization period (Tables 3 and 4). The study was not powered for statistical comparisons of event rates between groups, but the frequency and severity of these local events tended to decrease with successive immunizations, especially in the 10 μg group. The proportion of children who experienced local pain or swelling was higher in the malaria vaccine groups compared to the rabies vaccine group. Grade 3 local adverse events consisted mainly of injection site swelling (Figure 2), which was reported in all study groups, but had a higher frequency in the 50 μg malaria vaccine group. Grade 3 local swelling was generally associated with minor injection site pain. Other grade 3 local reactions consisted of injection site pain and erythema. Grade 3 pain was always associated with grade 3 injection site swelling. One participant experienced grade 3 local erythema that was associated with grade 3 injection site swelling with no report of local pain.

Overall, the lowest proportion of children (80%) having at least one local adverse event was observed in the 10 μg group among the younger children aged 1–2 years. All local solicited adverse events resolved without sequelae during the 7-day post-immunization periods.

Systemic solicited adverse events. Fever was the most common systemic adverse event observed and was more frequent in malaria vaccine recipients (Tables 3 and 4). The highest proportion of children with fever was observed in the 25 μg group, in which 30% of children had fever of mild to moderate intensity after immunization 1. The proportion of children reporting at least one systemic adverse event was the lowest among those aged 1–2 years and 5–6 years. Children in the 10 μg malaria vaccine and the rabies vaccine groups experienced the fewest systemic adverse events. All systemic solicited symptoms were of Grade 1 or Grade 2 intensity and all resolved during the 7-day follow-up period.

Unsolicited adverse events. Overall, 1,131 unsolicited adverse events were reported during the 30-day post immunization period. Unsolicited adverse events were balanced by study groups and were representative of local patterns of childhood illnesses. The majority of unsolicited symptoms for all age groups were acute respiratory tract infections, followed by malaria episodes and gastrointestinal disorders. Three unsolicited adverse events were graded as severe; all were instances of abnormal laboratory values in children aged 1–2 years old. A white blood cell (WBC) count of $17.7 \times 10^3/\mu\text{L}$ was detected on the day of the first immunization (prior to immunization) with the 10 μg dose of the malaria vaccine, and a WBC of $22.6 \times 10^3/\mu\text{L}$ was detected in another child 1 week after the first rabies vaccine immunization. Both of these elevated WBC counts were associated with concurrent minor infections. In the third case, a serum ALT of 364 U/L that was detected 1 week after the third immunization with the 50 μg dose of the malaria vaccine was determined to be due to hepatitis A infection, confirmed by serology. All abnormal lab values resolved within 1 month.

Serious adverse events. Four serious adverse events (SAE) occurred during the study. The first was a WBC elevation to $30.3 \times 10^3/\mu\text{L}$ (defined according to the protocol as an SAE) that was detected 1 week after the second immunization with the 10 μg malaria vaccine. This leukocytosis occurred contemporaneously

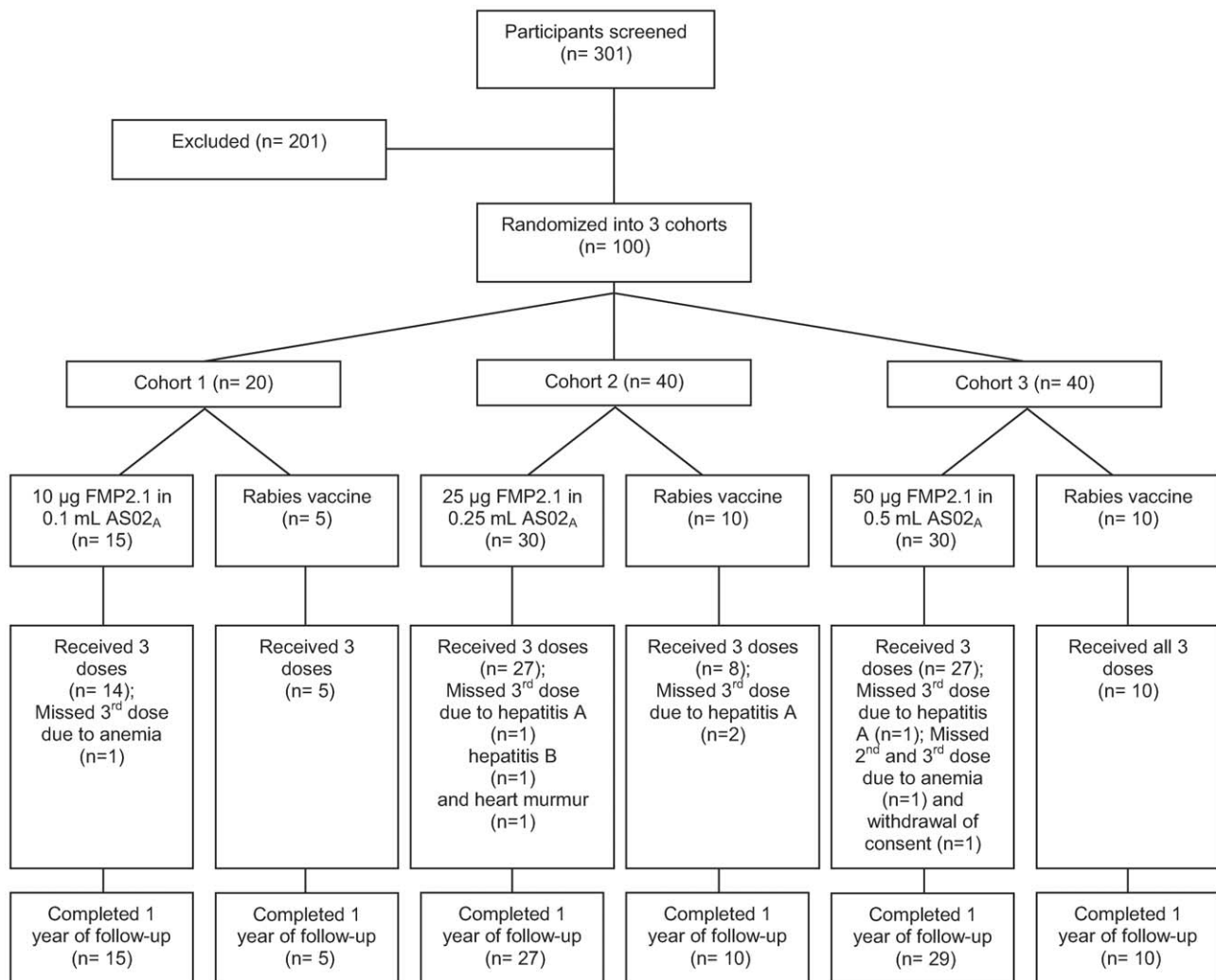


Figure 1. Trial profile.
doi:10.1371/journal.pone.0009041.g001

Table 2. Baseline Characteristics of FMP2.1/AS02_A and Rabies Vaccine groups.

Characteristics	FMP2.1/AS02 _A 10 µg	FMP2.1/AS02 _A 25 µg	FMP2.1/AS02 _A 50 µg	Rabies Vaccine
	n = 15	n = 30	n = 30	n = 25
Mean age in year (SD)	3.5 (1.8)	3.5 (1.7)	3.6 (1.7)	3.2 (1.9)
Number of Females (%)	7 (46.7)	15 (50.0)	12 (40.0)	15 (60.0)
Mean WBC x 10 ³ /µL (SD)	9.47 (3.67)	8.83 (2.20)	9.53 (2.59)	9.62 (3.02)
Mean hemoglobin g/dL (SD)	10.9 (1.2)	11.0 (1.0)	11.0 (1.1)	10.6 (0.8)
Mean platelets x 10 ³ /µL (SD)	448 (129)	422 (152)	410 (151)	423 (132)
Mean lymphocytes x 10 ³ /µL (SD)	5.03 (2.02)	4.84 (1.64)	4.75 (1.75)	5.26 (1.96)
Mean creatinine µM/L (SD)	44.1 (0.0)	44.1 (0.0)	44.3 (1.3)	44.1 (0.0)
Mean ALT U/L (SD)	13.53 (5.34)	20.10 (21.82)	18.23 (8.55)	15.44 (6.92)
GMT Anti-AMA-1 antibody titer	532	500	1,088	456
(95% CI)	(97-2,922)	(168-1,489)	(448-2,645)	(151-1,377)

GMT, geometric mean titer; CI, confidence interval; ALT, alanine aminotransferase; SD, standard deviation.
doi:10.1371/journal.pone.0009041.t002

Table 3. Signs and Solicited Symptoms during 7-Day Follow-Up Periods after Each Immunization: Malaria Vaccine by Dose Regimen.

	FMP2.1/AS02 _A 10 µg						FMP2.1/AS02 _A 25 µg						FMP2.1/AS02 _A 50 µg					
	Immunization 1		Immunization 2		Immunization 3		Immunization 1		Immunization 2		Immunization 3		Immunization 1		Immunization 2		Immunization 3	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Local																		
Pain (%)	8 (53.3)	0	7 (46.7)	0	3 (21.4)	0	19 (63.3)	2 (6.7)	15 (50.0)	0	12 (44.4)	0	16 (59.3)	1 (3.3)	19 (87.9)	0	16 (59.3)	0
Swelling (%)	11 (73.3)	11 (73.3)	7 (46.7)	7 (46.7)	10 (71.4)	9 (64.3)	12 (40.0)	11 (36.7)	22 (73.3)	22 (73.3)	16 (59.3)	16 (59.3)	28 (93.3)	27 (90.0)	22 (75.9)	22 (75.9)	23 (85.2)	23 (85.2)
Erythema (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (3.7)	1 (3.7)
General																		
Fever (%)	0	0	2 (13.3)	0	2 (13.3)	0	9 (30.0)	0	7 (23.3)	0	5 (18.5)	0	8 (26.7)	0	6 (21.4)	0	6 (22.2)	0
Drowsiness (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Irritability/Fussiness (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Loss of appetite (%)	2 (13.3)	0	2 (13.3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (3.3)	0	0	0	0	0
Vomiting (%)	1 (6.7)	0	0	0	1 (7.1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

doi:10.1371/journal.pone.0009041.t003

Table 4. Signs and Solicited Symptoms during the 7-Day Follow-Up Periods after Each Immunization: All Dose Regimens of Malaria Vaccine and Rabies Vaccine.

	FMP2.1/AS02 _A						Rabies vaccine					
	Immunization 1		Immunization 2		Immunization 3		Immunization 1		Immunization 2		Immunization 3	
	n = 75		n = 73		n = 68		n = 25		n = 25		n = 23	
	Overall	Severe	Overall	Severe	Overall	Severe	Overall	Severe	Overall	Severe	Overall	Severe
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Local												
Pain (%)	43 (57.3)	3 (4.0)	41 (56.2)	0	31 (45.6)	0	2 (8.0)	0	4 (16.0)	0	1 (4.3)	0
Swelling (%)	51 (68.0)	49 (65.3)	51 (69.9)	51 (69.9)	49 (72.1)	48 (70.6)	6 (24.0)	5 (20.0)	4 (16.0)	4 (16.0)	3 (13.0)	3 (13.0)
Erythema (%)	0	0	0	0	1 (1.5)	1 (1.5)	0	0	0	0	0	0
General												
Fever (%)	17 (22.7)	0	15 (20.5)	0	13 (19.1)	0	0	0	2 (8.0)	0	4 (17.4)	0
Drowsiness (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Irritability/Fussiness (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Loss of appetite (%)	3 (4.0)	0	2 (2.7)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vomiting (%)	1 (1.3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

doi:10.1371/journal.pone.0009041.t004

with a malaria illness episode and resolved shortly after the end of the malaria episode. The second SAE was an elevation of serum ALT to grade 4 toxicity level at 521 U/L that was detected 1 week after receipt of the second dose of rabies vaccine. The high value was detected at a scheduled clinic visit and was not associated with any concerning clinical symptoms. Serological testing identified hepatitis A infection as the cause of the elevated ALT, which returned to normal after 2 weeks. Nevertheless the third immunization was withheld. The third and fourth SAEs were both ALT elevations that occurred in children with minor clinical symptoms and were determined by serological testing to be caused by a hepatitis B infection. In the first case, a moderate ALT elevation to 53 U/L was reported after the third immunization with the 25 µg dose of malaria vaccine. Thirty days later the ALT level was 1,260 U/L, constituting grade 4 toxicity and an SAE. Given the temporal relationship with vaccination an association cannot be ruled out, in that even with hepatitis B infection as the primary cause of ALT elevation, vaccination could have amplified the rise of ALT. The second case of hepatitis B occurred with a rise in ALT to 1,371 U/L on study day 90, a month after all 3 rabies vaccine immunizations had been completed, and was

deemed not related to study products. All 4 SAEs resolved within 3 to 4 weeks of follow up with no sequelae.

Laboratory safety tests. Grade 1 elevated platelet count was the most common laboratory abnormality and was observed in 8, 16, 12 and 15 children in the 10 µg, 25 µg 50 µg and rabies vaccine groups, respectively. The highest platelet counts were reported in a 10 µg malaria vaccine recipient, with values of $1,096 \times 10^3/\mu\text{L}$ on the day of the second immunization (prior to immunization) and $1,397 \times 10^3/\mu\text{L}$ a week after the second immunization. These values were observed 5 weeks apart, with a normal platelet count in between. This child experienced several concurrent illnesses, including the SAE with very high WBC, and was not given the third vaccine dose due to moderate anemia.

Hemoglobin levels remained within or slightly above the normal range (9.8 g/dL to 12.4) for all but 4 participants throughout the study. Four children had grade 1 low hemoglobin levels measured at limited time points, one in the 10 µg group a week after the second immunization; and 3 in the 25 µg group occurring on the days of the first and second immunizations and a month after the third immunization, respectively. One grade 2 low hemoglobin was recorded in the 50 µg group on the day of the second



Figure 2. Grade 3 injection site swelling 1–2 days following immunization with the malaria vaccine. Injection site swelling was considered grade 3 if it exceeded 20 mm in its widest dimension. Grade 3 swelling was typically unnoticed by participants and parents and came to attention only during physical examinations. It was transient, lasting 1–3 days, and not associated with functional impairment. Shown here is grade 3 injection site swelling of the left shoulder of a study participant.

doi:10.1371/journal.pone.0009041.g002

immunization. Laboratory abnormalities detected on days of immunization were seen in blood samples that had been collected just prior to immunization.

Other abnormal hematology (lymphocyte count) and biochemistry (serum creatinine and ALT) laboratory abnormalities were evenly distributed among study groups. In addition to the 3 ALT abnormalities constituting SAEs described above (1 in the 25 μg group and 2 in the rabies vaccine group), 9 additional elevated ALT values were reported; 2 in the 10 μg group, 2 in the 25 μg group (1 attributed to hepatitis B); 4 in the 50 μg group (2 attributed to hepatitis A) and 1 in the rabies vaccine group (attributed to hepatitis A). No temporal pattern relative to immunizations was apparent in these cases of ALT elevation.

Immunogenicity

Baseline antibody levels were low in all groups (Figure 3). Immunization with the 3 dose levels was followed by a dramatic rise in anti-AMA1 antibodies, significantly higher than in the control group after a single immunization. Antibody levels peaked 4 weeks after the third immunization on study day 90 with 100-fold or greater rise relative to baseline, and remained significantly higher than in the control group throughout the 12 months of the study. In all groups the antibodies waned as the malaria transmission season was ending and rose as the new malaria season began. At all post-immunization time points, mean log antibody levels ($\mu\text{g}/\text{mL}$) were significantly higher in the malaria vaccine groups compared to the rabies vaccine group (t-test p-values <0.0001 at all post-immunization time points for each malaria vaccine dose group compared to rabies vaccine group).

Longitudinal models showed the same results, with p-values <0.0001 at all post-immunization time points for each malaria vaccine dose group compared to rabies vaccine. All doses of the malaria vaccine induced similar high levels of antibodies, with overlapping 95% confidence intervals among the 3 malaria vaccine dose groups at all time points. Pre-immunization anti-AMA antibody levels tended to be lower in children in the youngest age group (1–2 years) than in older children (data not shown).

Discussion

Interpretation

This study is the first evaluation of the AMA1-based malaria vaccine FMP2.1/AS02_A in malaria-experienced children. The 3 dose levels of the malaria vaccine had acceptable tolerability. Local reactions were more frequent in malaria vaccine groups than in the comparator group. Pain and/or swelling at the injection site were experienced by most recipients of the malaria vaccine. Although swelling was often classified as grade 3 based on the size of the reaction (>20 mm), these episodes of swelling were short-lived and were usually unnoticed by participants (Figure 2). Nine participants received fewer than 3 vaccine doses. Four SAEs were observed; all were instances of grade 4 laboratory abnormalities. A high follow-up rate (96%) was achieved.

All 3 dose levels of the malaria vaccine elicited high levels of antibodies recognizing the vaccine antigen after a single immunization, peaking a month after the third immunization. The children in this trial had almost 30-fold lower baseline levels of anti-AMA1 antibodies than adults had in a previous trial of this

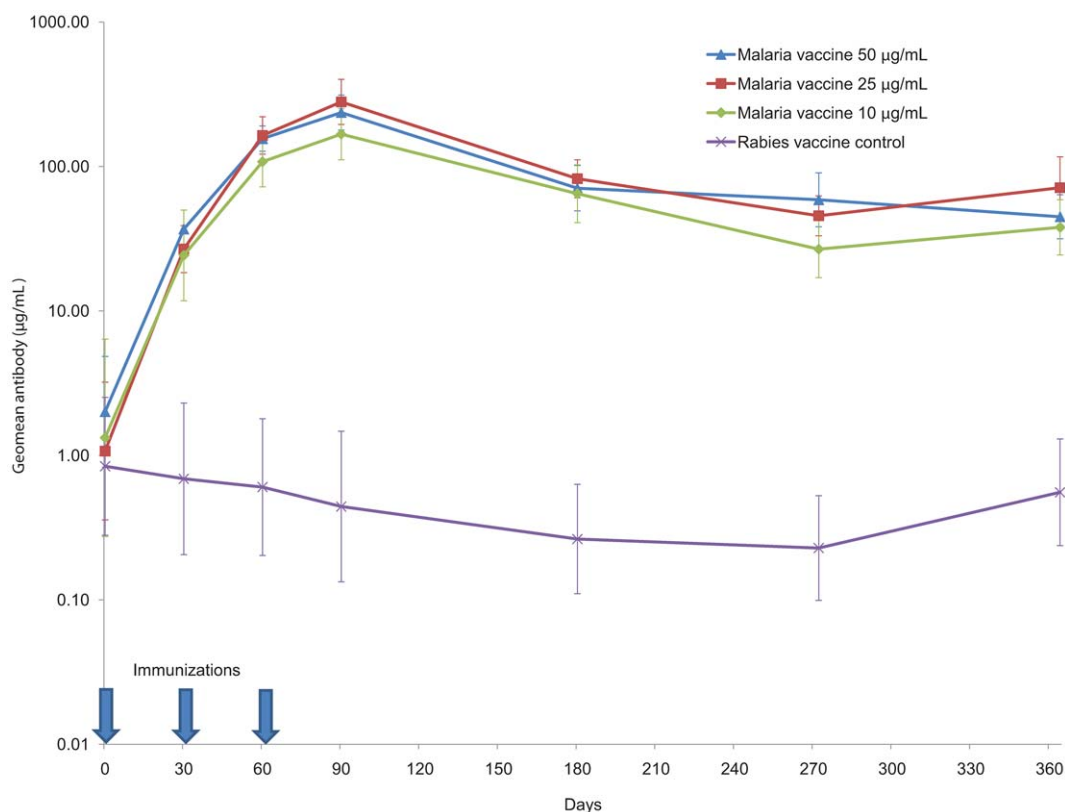


Figure 3. Anti-AMA1 antibody levels. Geometric mean of antibodies ($\mu\text{g}/\text{mL}$) to homologous recombinant AMA1 for FMP2.1/AS02_A 50 μg dose, FMP2.1/AS02_A 25 μg dose, FMP2.1/AS02_A 10 μg dose and rabies vaccine recipients. Times of each of 3 immunizations are indicated by arrows. Error bars represent 95 percent confidence intervals. doi:10.1371/journal.pone.0009041.g003

vaccine at this site [17], and this lower baseline likely accounts for the more than 100-fold increase following immunization, compared to a 5- to 6-fold rise in the adult trial. These high levels were sustained for 1 year after the first dose was given. No significant differences in antibody levels were observed between the malaria vaccine groups.

The peak antibody levels reached a month after the third immunization in these children were similar to, or even slightly higher than, those seen previously in adults at this site. In adults we observed a tendency toward a dose response, with the 50 µg group having the highest antibody levels, while in children the 25 µg antibody levels were slightly higher. None of these differences, however, were statistically significant, and the proportions of children with 4-fold or higher rises in antibody levels was similarly high in all age groups and at all post-immunization time points (data not shown), supporting the conclusion that there was no dose effect. Since data on the duration of these responses were not available at the time the Phase 2 trial began, the highest dose with an acceptable safety profile, 50 µg, was selected for further evaluation.

Generalizability

The safety and tolerability profile of the FMP2.1/AS02_A vaccine was similar to that seen in previous trials of this vaccine in North American malaria-naïve volunteers [16] and in Malian adults [17], as well as in trials of a similar recombinant protein blood-stage malaria vaccine with the same adjuvant in this and other African populations [29,30]. As in these other trials, most of the adverse reactions both to the malaria vaccine and to the rabies vaccine were local and transient. There was no evidence of an increased risk of anemia, a concern raised in the report of the Phase 2 trial of the AMA1-C1 vaccine [20]

All 3 dose levels of the FMP2.1/AS02_A vaccine resulted in at least 100-fold increases in AMA1 antibody levels. While it is not possible to compare antibody levels measured in this trial with those seen in trials of other AMA1 vaccines, based on the relative fold-rise and duration of antibody responses this profile compares favorably with much lower and shorter-lived increases in antibody levels observed in Malian children immunized with AMA1-C1, an AMA1 vaccine adjuvanted with aluminum hydroxide [19], which provided no measurable protection in a recently reported Phase 2 trial at another site in Mali. Notably, while baseline antibody levels among children in this trial were about 10-fold to 50-fold lower than pre-immunization levels in adults at this same site, children achieved post-immunization AMA1 antibody levels that were at least as high as those seen in vaccinated adults [17,20]. Moreover, the post-immunization AMA1 antibody levels in children were about 10-fold higher than baseline levels in semi-immune adults who have robust naturally acquired immunity that protects them against clinical malaria disease despite frequent infection.

Although the strong and sustained antibody responses observed in this trial are encouraging, it is not known whether antibodies raised against AMA1 based on the 3D7 clone of *P. falciparum* will protect against infection with the highly diverse forms of AMA1 found in nature [9,13,15]. The AMA1 vaccine that recently failed to demonstrate protection, AMA1-C1, is a bivalent vaccine based on genetically diverse AMA1 sequences derived from two different *P. falciparum* isolates. It is not yet known whether this lack of efficacy is due to an insufficiently robust immune response, to failure of allele-specific antibodies to protect against the wide array of AMA1 variants, or because immune responses to AMA1 alone are simply unable to prevent clinical malaria. High levels of inhibitory AMA1 antibodies were correlated with protection in a recent trial of AMA1 vaccines in Aotus monkeys [31], supporting

the idea that AMA1-C1 could have failed because it was insufficiently immunogenic.

Previous studies have shown that the FMP2.1/AS02_A vaccine elicits antibodies that inhibit both parasite growth and AMA1 processing in homologous parasites [16] as well as measurable cellular immune responses [22]. Post-immunization sera from Malian adults who received the 50 µg dose of FMP2.1/AS02_A (but not sera from those who received the 25 µg dose) of the malaria vaccine had significantly greater growth inhibition activity against both 3D7 and FVO parasites than did post-immunization sera from the rabies comparator group in the previous Phase 1 trial [17]. However, until an AMA1 malaria vaccine demonstrates clinical efficacy against genetically diverse natural parasites, the relevance of growth inhibition assays and other humoral and cellular immunogenicity endpoints for clinical development decisions will remain a matter of reasoned conjecture.

Overall Evidence

Based on its good safety profile, acceptable tolerability, and very robust antibody responses, the 50 µg dose of the AMA1-based malaria vaccine FMP2.1/AS02_A was selected for evaluation in a Phase 2 efficacy trial in children aged 1–6 years at the Bandiagara Malaria Project in Mali. If the results of this trial are promising, the development pathway for this vaccine could include incorporating the FMP2.1 antigen as one component of a multi-stage, multi-antigen malaria vaccine in combination with RTS,S [8], improved adjuvant formulations [32] and/or separate development as a disease-blocking vaccine for use in targeted populations in malaria transmission areas. As AMA1 malaria vaccines are evaluated in efficacy trials, the impact of genetic diversity of parasite antigens on vaccine efficacy is likely to emerge as a critical problem requiring integration of methods and concepts drawn from molecular epidemiology, molecular evolution, immunology and structural vaccinology [9,13].

Supporting Information

Protocol S1 Trial protocol

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009041.s001 (0.39 MB PDF)

Checklist S1 Completed CONSORT checklist

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009041.s002 (0.19 MB DOC)

Acknowledgments

We thank Abdi Naficy and Lee Hall of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases for support and advice; Guindo Mariam Traore and Boubacar Kouyate for serving as Local Medical Monitors; the study monitors, Norbert Tamm and Denise McKinney; Mirjana Nesin and members of the Data Safety Monitoring Board; Mahamadou Traore, Bourama Kane, and Mamadou Dembélé for clinical assistance; Danzele Coulibaly and Moctar Traore for administrative support; the chief medical officer of the Bandiagara District Hospital Mahamadou Cisse for technical support; Nicole Eddington and Lisa Ware for technical and administrative support; Karen Ball for regulatory support; the team of the Bandiagara Malaria Project in Bandiagara for their dedication; and the community of Bandiagara, Mali.

The views expressed by the authors are private and not to be construed as official positions of the United States Departments of the Army or Defense.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MAT OKD DC AKK ABG KT DAD AD MSS IS AN AO OG AL MCD WRB JC LS CD KEL DGH CVP. Performed the experiments: MAT OKD DC MBL AKK ABG KT MS DAD ID BK MD AD MB MSS IS AN IT KEL BH CVP. Analyzed

the data: MAT MBL MSS IS DT TJD SLT KEL BH CVP. Contributed reagents/materials/analysis tools: AO OG AL MCD WRB JC DL SD

DGH. Wrote the paper: MAT MBL OG MCD JC LS CD SLT KEL DGH CVP.

References

- Kocken CH, van der Wel AM, Dubbeld MA, Narum DL, van de Rijke FM, et al. (1998) Precise timing of expression of a *Plasmodium falciparum*-derived transgene in *Plasmodium berghei* is a critical determinant of subsequent subcellular localization. *J Biol Chem* 273: 15119–15124.
- Deans JA, Alderson T, Thomas AW, Mitchell GH, Lennox ES, et al. (1982) Rat monoclonal antibodies which inhibit the in vitro multiplication of *Plasmodium knowlesi*. *Clin Exp Immunol* 49: 297–309.
- Thomas AW, Deans JA, Mitchell GH, Alderson T, Cohen S (1984) The Fab fragments of monoclonal IgG to a merozoite surface antigen inhibit *Plasmodium knowlesi* invasion of erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 13: 187–199.
- Hodder AN, Crewther PE, Anders RF (2001) Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. *Infect Immun* 69: 3286–3294.
- Dutta S, Haynes JD, Moch JK, Barbosa A, Lanar DE (2003) Invasion-inhibitory antibodies inhibit proteolytic processing of apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12295–12300.
- Thomas AW, Trape JF, Rogier C, Goncalves A, Rosario VE, et al. (1994) High prevalence of natural antibodies against *Plasmodium falciparum* 83-kilodalton apical membrane antigen (PF83/AMA-1) as detected by capture-enzyme-linked immunosorbent assay using full-length baculovirus recombinant PF83/AMA-1. *Am J Trop Med Hyg* 51: 730–740.
- Udhayakumar V, Kariuki S, Kolczack M, Girma M, Roberts JM, et al. (2001) Longitudinal study of natural immune responses to the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen (AMA-1) in a holoendemic region of malaria in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project VIII. *Am J Trop Med Hyg* 65: 100–107.
- Heppner DG Jr, Kester KE, Ockenhouse CF, Tornieporth N, Ofori O, et al. (2005) Towards an RTS,S-based, multi-stage, multi-antigen vaccine against *falciparum* malaria: progress at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine* 23: 2243–2250.
- Takala SL, Coulibaly D, Thera MA, Batchelor AH, Cummings MP, et al. (2009) Extreme polymorphism in a vaccine antigen and risk of clinical malaria: Implications for vaccine development. *Sci Transl Med* 1: 2ra5.
- Healer J, Murphy V, Hodder AN, Masciantonio R, Gemmill AW, et al. (2004) Allelic polymorphisms in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 52: 159–168.
- Kennedy MC, Wang J, Zhang Y, Miles AP, Chitsaz F, et al. (2002) In vitro studies with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1): production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response. *Infect Immun* 70: 6948–6960.
- Kocken CH, Withers-Martinez C, Dubbeld MA, van der WA, Hackett F, et al. (2002) High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. *Infect Immun* 70: 4471–4476.
- Takala SL, Plowe CV (2009) Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming ‘vaccine resistant malaria’. *Parasite Immunol* 31: 560–573.
- Dutta S, Lee SY, Batchelor AH, Lanar DE (2007) Structural basis of antigenic escape of a malaria vaccine candidate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12488–12493.
- Duan J, Mu J, Thera MA, Joy D, Kosakovsky Pond SL, et al. (2008) Population structure of the genes encoding the polymorphic *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1: implications for vaccine design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7857–7862.
- Polhemus ME, Magill AJ, Cummings JF, Kester KE, Ockenhouse CF, et al. (2007) Phase I dose escalation safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* apical membrane protein (AMA-1) FMP2.1, adjuvanted with AS02A, in malaria-naïve adults at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine* 25: 4203–4212.
- Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Diallo DA, Kone AK, et al. (2008) Safety and Immunogenicity of an AMA-1 Malaria Vaccine in Malian Adults: Results of a Phase I Randomized Controlled Trial. *PLoS ONE* 3: e1465.
- Malkin EM, Diemert DJ, McArthur JH, Perreault JR, Miles AP, et al. (2005) Phase 1 clinical trial of apical membrane antigen 1: an asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 73: 3677–3685.
- Dicko A, Sagara I, Ellis RD, Miura K, Guindo O, et al. (2008) Phase 1 study of a combination AMA1 blood stage malaria vaccine in Malian children. *PLoS ONE* 3: e1563.
- Sagara I, Dicko A, Ellis RD, Fay MP, Diawara SI, et al. (2009) A randomized controlled phase 2 trial of the blood stage AMA1-C1/Alhydrogel malaria vaccine in children in Mali. *Vaccine* 27: 3090–3098.
- Dutta S, Lalitha PV, Ware LA, Barbosa A, Moch JK, et al. (2002) Purification, characterization, and immunogenicity of the refolded ectodomain of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 expressed in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 70: 3101–3110.
- Lyke KE, Daou M, Diarra I, Kone A, Kouriba B, et al. (2009) Cell-mediated immunity elicited by the blood stage malaria vaccine apical membrane antigen 1 in Malian adults: results of a Phase I randomized trial. *Vaccine* 27: 2171–2176.
- Lyke KE, Dicko A, Kone A, Coulibaly D, Guindo A, et al. (2004) Incidence of severe *Plasmodium falciparum* malaria as a primary endpoint for vaccine efficacy trials in Bandiagara, Mali. *Vaccine* 22: 3169–3174.
- Coulibaly D, Diallo DA, Thera MA, Dicko A, Guindo AB, K, et al. (2002) Impact of pre-season treatment on incidence of *falciparum* malaria and parasite density at a site for testing malaria vaccines in Bandiagara, Mali. *Am J Trop Med Hyg* 67: 604–610.
- Diallo DA, Doumbo OK, Plowe CV, Wellems TE, Emanuel EJ, Hurst SA (2005) Community permission for medical research in developing countries. *Clin Infect Dis* 41: 255–259.
- Wu JY, Gardner BH, Murphy CI, Seals JR, Kensil CR, et al. (1992) Saponin adjuvant enhancement of antigen-specific immune responses to an experimental HIV-1 vaccine. *J Immunol* 148: 1519–1525.
- Soltysik S, Bedore DA, Kensil CR (1993) Adjuvant activity of QS-21 isomers. *Ann N Y Acad Sci* 690: 392–395.
- Lugada ES, Mermin J, Kaharuzza F, Ulvestad E, Were W, et al. (2004) Population-based hematologic and immunologic reference values for a healthy Ugandan population. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 29–34.
- Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Diallo DA, Sagara I, et al. (2006) Safety and Allele-Specific Immunogenicity of a Malaria Vaccine in Malian Adults: Results of a Phase I Randomized Trial. *PLoS Clin Trials* 1: e34.
- Withers MR, McKinney D, Ogutu BR, Waitumbi JN, Milman JB, et al. (2006) Safety and Reactogenicity of an MSP-1 Malaria Vaccine Candidate: A Randomized Phase Ib Dose-Escalation Trial in Kenyan Children. *PLoS Clin Trials* 1: e32.
- Dutta S, Sullivan JS, Grady KK, Haynes JD, Komisar J, et al. (2009) High antibody titer against apical membrane antigen-1 is required to protect against malaria in the Aotus model. *PLoS ONE* 4: e8138.
- Spring MD, Cummings JF, Ockenhouse CF, Dutta S, Reidler R, et al. (2009) Phase 1/2a study of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen-1 (AMA-1) administered in adjuvant system AS01B or AS02A. *PLoS ONE* 4: e5254.

4.3 Essai clinique contrôlé et randomisé de phase 2b chez l'enfant

Article III : Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Laurens MB, Ouattara A, Kone AK, Guindo AB, Traore K, Traore I, Kouriba B, Diallo DA, Diarra I, Daou M, Dolo A, Tolo Y, Sissoko MS, Niangaly A, Sissoko M, Takala-Harrison S, Lyke KE, Wu Y, Blackwelder WC, Godeaux O, Vekemans J, Dubois MC, Ballou WR, Cohen J, Thompson D, Dube T, Soisson L, Diggs CL, House B, Lanar DE, Dutta S, Heppner DG Jr, Plowe CV. A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. *N Engl J Med.* 2011 Sep 15;365(11):1004-13.

Cette étude a constitué un essai pivot de phase 2b pour déterminer la preuve du concept d'efficacité du vaccin candidat FMP2.1/AS02_A. La visite de sélection a examiné 745 enfants éligible à Bandiagara pour en retenir 400. Les principales raisons de non inclusion étaient la présence d'anomalies biologiques constatées au laboratoire clinique, la présence d'une maladie aiguë, ou la volonté de ne pas participer. Les enfants ont été randomisés dans un ratio 1:1 pour recevoir FMP2.1/AS02_A, 50mcg d'antigène associé à 0,5ml d'adjuvant ou la vaccin témoin antirabique. La base de données de l'étude a été vérifiée et congelée avec les données récoltées jusqu'au Jour 240 d'étude; conformément au protocole, ceci correspondait au moment de l'analyse du critère de jugement primaire. Sur les 400 enfants, 199 ont été randomisés dans le groupe FMP2.1/AS02_A et 201 dans le groupe antirabique. Au total 186 enfants ont reçu les trois doses du vaccin antipaludique (93,5%) et 191 ont reçu trois dose du vaccin antirabique (95%). Au jour 240, 193 enfants avaient complété les procédures de l'étude dans le groupe FMP2.1/AS02_A et 190 dans le groupe antirabique.

L'incidence cumulée du paludisme tel que définit par le critère de jugement primaire était de 48,4% dans le groupe FMP2.1/AS02_A et de 54,4% dans le groupe témoin. Cela donne une efficacité brute estimée par la régression de Cox égale à 17,4%; le risque ratio du critère de jugement primaire étant 0,83 IC à 95% [0,63-1.09], $p=0,18$. Vingt deux épisodes cliniques avec des parasites ayant l'haplotype 3D7 au niveau du groupe c1L ont été dénombrés: 16 sont survenue dans le groupe témoin montrant une efficacité contre AMA1 3D7 au niveau c1L de 64,3%, le risque ratio de l'incidence spécifique d'allèle dans le groupe FMP2.1/AS02_A vs. le groupe antirabique étant 0,36 IC à 95% [0,08-0.86], $p=0,03$. L'efficacité contre les épisodes multiples de paludisme était de 20%, risque ratio égal à 0,80 IC à 95% [0,36 - 1,02]. Quand on utilise différentes définitions du paludisme, en ayant des seuils de densité parasitaire permettant d'inclure un effectif plus grand dans l'analyse, l'efficacité reste autour de 20% et devient statistiquement significative avec $p<0,05$. Les analyses conforme au protocole donne les mêmes résultats que ces analyses en ITT. Dans l'analyse ITT de l'impact du vaccin sur la densité parasitaire, la médiane cumulée des AUC individuels était de 168,600 parasites par

mm³ dans le groupe FMP2.1/AS02A et de 376,900 parasites par mm³ dans le groupe antirabique, $p=0,01$. En analyse conforme au protocole la médiane cumulée des AUC était de 97,700 parasites par mm³ dans le groupe FMP2.1/AS02_A et de 308,600 parasites par mm³ dans le groupe antirabique, $p=0,01$. On a observé chez 17 épisodes d'anémie chez 16 enfants dans le groupe FMP2.1/AS02_A et 18 épisodes d'anémie chez 16 enfants dans le groupe témoin, $p=1,00$.

Le profil de tolérance observé a été similaire à celui rencontré dans les essais précédents: une bonne tolérance et une réactogénicité locale acceptable. Les EI sollicités locaux sont survenus chez 99,0% IC à 95% [96,4 - 99,0] des enfants dans le groupe FMP2.1/AS02_A et chez 82,1% IC à 95% [76,1 - 87,1] dans le groupe témoin. L'œdème au site d'injection a été l'EI sollicité local le plus fréquent. La fièvre a été l'EI sollicité général le plus fréquent survenant chez 61,3% des enfants du groupe FMP2.1/AS02_A et chez 25,9% des enfants du groupe témoin. L'irritabilité et la perte de l'appétit étaient aussi plus fréquentes chez les enfants du groupe FMP2.1/AS02_A. Parmi les EI non sollicités la fièvre rapportée a été la plus fréquente, rapportée par 40,2% des enfants du groupe FM2.1/AS02_A et par 17,4% des enfants du groupe antirabique. Les autres EI non sollicités ont présenté une distribution équilibrée entre les deux groupes. Il n'y a pas eu d'anomalies biologiques significatives différentes entre les deux groupes. Il n'y a pas eu de décès ni d'EIGs liés aux produits d'investigation. Les EIGs sont survenus chez 5 enfants dans le groupe FM2.1/AS02_A : un cas de paludisme grave, un cas de convulsion fébrile au décours d'un accès palustre, un cas de détresse respiratoire, un cas de malnutrition et de déshydratation grave et un cas d'iléus paralytique. Un cas d'EIG est survenu dans le groupe témoin : une convulsion fébrile au décours d'un accès palustre. Comme dans les essais précédents, le vaccin a induit une forte réponse immunitaire humorale. Le titre des IgG anti-AMA1 chez les enfants dans le groupe FMP2.1/AS02_A a augmenté par une amplitude de 54 fois un mois après la première dose pour culminer à un taux de 479 fois le niveau de base 30 jours après la troisième vaccination. En dépit de cette forte production d'IgG, ni le titre des anticorps au début, ni le taux maximal n'étaient associés à la protection contre le paludisme. Toutefois l'augmentation du titre d'anticorps entre le niveau de base et celui du jour de l'épisode clinique de paludisme, a été significativement associé à la protection contre le paludisme, risque ratio de 0,72 IC à 95% [0,60 - 0,87], $p<0,001$.

ORIGINAL ARTICLE

A Field Trial to Assess a Blood-Stage Malaria Vaccine

Mahamadou A. Thera, M.D., M.P.H., Ogobara K. Doumbo, M.D., Ph.D.,
 Drissa Coulibaly, M.D., Matthew B. Laurens, M.D., M.P.H.,
 Amed Ouattara, Pharm.D., Abdoulaye K. Kone, M.D., Ando B. Guindo, M.D.,
 Karim Traore, M.D., Idrissa Traore, M.D., Bourema Kouriba, Pharm.D., Ph.D.,
 Dapa A. Diallo, M.D., Issa Diarra, Pharm.D., Modibo Daou, Pharm.D.,
 Amagana Dolo, Pharm.D., Ph.D., Youssouf Tolo, Pharm.D.,
 Mahamadou S. Sissoko, M.D., M.S.P.H., Amadou Niangaly, Pharm.D.,
 Mady Sissoko, Pharm.D., Shannon Takala-Harrison, Ph.D., Kirsten E. Lyke, M.D.,
 Yukun Wu, Ph.D., William C. Blackwelder, Ph.D., Olivier Godeaux, M.D.,
 Johan Vekemans, M.D., Ph.D., Marie-Claude Dubois, M.Sc.,
 W. Ripley Ballou, M.D., Joe Cohen, Ph.D., Darby Thompson, M.S.,
 Tina Dube, Ph.D., Lorraine Soisson, Ph.D., Carter L. Diggs, M.D., Ph.D.,
 Brent House, Ph.D., David E. Lanar, Ph.D., Sheetij Dutta, Ph.D.,
 D. Gray Heppner, Jr., M.D., and Christopher V. Plowe, M.D., M.P.H.

ABSTRACT

BACKGROUND

From the Malaria Research and Training Center, University of Bamako, Bamako, Mali (M.A.T., O.K.D., D.C., A.O., A.K.K., A.B.G., K.T., I.T., B.K., D.A.D., I.D., M.D., A.D., Y.T., M.S.S., A.N., M.S.); Howard Hughes Medical Institute and Center for Vaccine Development at the University of Maryland School of Medicine, Baltimore (M.B.L., A.O., S.T.-H., K.E.L., Y.W., W.C.B., C.V.P.); GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium (O.G., J.V., M.-C.D., W.R.B., J.C.); EMMES, Rockville, MD (D.T., T.D.); the Malaria Vaccine Development Program, U.S. Agency for International Development, Washington, DC (L.S., C.L.D.); and Walter Reed Army Institute of Research, Silver Spring, MD (B.H., D.E.L., S.D., D.G.H.). Address reprint requests to Dr. Plowe at Howard Hughes Medical Institute, Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine, 685 W. Baltimore St., HSF1-480, Baltimore, MD 21201, or at cplowe@medicine.umaryland.edu.

Blood-stage malaria vaccines are intended to prevent clinical disease. The malaria vaccine FMP2.1/AS02_A, a recombinant protein based on apical membrane antigen 1 (AMA1) from the 3D7 strain of *Plasmodium falciparum*, has previously been shown to have immunogenicity and acceptable safety in Malian adults and children.

METHODS

In a double-blind, randomized trial, we immunized 400 Malian children with either the malaria vaccine or a control (rabies) vaccine and followed them for 6 months. The primary end point was clinical malaria, defined as fever and at least 2500 parasites per cubic millimeter of blood. A secondary end point was clinical malaria caused by parasites with the AMA1 DNA sequence found in the vaccine strain.

RESULTS

The cumulative incidence of the primary end point was 48.4% in the malaria-vaccine group and 54.4% in the control group; efficacy against the primary end point was 17.4% (hazard ratio for the primary end point, 0.83; 95% confidence interval [CI], 0.63 to 1.09; $P=0.18$). Efficacy against the first and subsequent episodes of clinical malaria, as defined on the basis of various parasite-density thresholds, was approximately 20%. Efficacy against clinical malaria caused by parasites with AMA1 corresponding to that of the vaccine strain was 64.3% (hazard ratio, 0.36; 95% CI, 0.08 to 0.86; $P=0.03$). Local reactions and fever after vaccination were more frequent with the malaria vaccine.

CONCLUSIONS

On the basis of the primary end point, the malaria vaccine did not provide significant protection against clinical malaria, but on the basis of secondary results, it may have strain-specific efficacy. If this finding is confirmed, AMA1 might be useful in a multicomponent malaria vaccine. (Funded by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases and others; ClinicalTrials.gov number, NCT00460525.)

N Engl J Med 2011;365:1004-13.

Copyright © 2011 Massachusetts Medical Society.

AN EFFECTIVE MALARIA VACCINE WOULD improve the prospects for eradicating malaria.¹ Vaccines that interrupt the transmission of malaria are emphasized in discussions of eradication,² but the ideal malaria vaccine would provide a direct clinical benefit. Vaccines targeting the blood stages of malaria are intended to reduce morbidity and mortality and are being developed in hopes of creating a multistage, multi-antigen vaccine.³

Vaccines based on two polymorphic *Plasmodium falciparum* blood-stage proteins, merozoite surface protein 1⁴ and apical membrane antigen 1 (AMA1),⁵ were not shown to be effective in recent studies, probably because of insufficient cross-protection against diverse malaria strains^{6,7} or insufficient immunogenicity. A vaccine based on three non-AMA1 blood-stage antigens failed to prevent clinical malaria but reduced the risk of infections with vaccine-type strains.⁸ No such strain specificity was seen with a vaccine based on a pre-erythrocytic protein that prevents clinical malaria.⁹⁻¹¹

FMP2.1/AS02_A is a monovalent blood-stage malaria vaccine based on AMA1 from the 3D7 strain of *P. falciparum*.¹² It had acceptable safety and tolerability in volunteers in the United States with no history of malaria^{13,14} and in malaria-exposed adults¹⁵ and children¹⁶ in Mali. In all these populations, FMP2.1/AS02_A produced higher and more sustained antibody responses than a bivalent AMA1 vaccine that showed neither overall⁵ nor strain-specific¹⁷ efficacy in a recent trial in Mali. We conducted a proof-of-concept trial to assess the efficacy of FMP2.1/AS02_A against clinical falciparum malaria in Malian children and to determine whether the efficacy was strain-specific.

METHODS

STUDY DESIGN

We conducted a randomized, controlled, double-blind trial. The protocol (available with the full text of this article at NEJM.org) was approved by the institutional review boards at the University of Bamako Faculty of Medicine, the University of Maryland, Baltimore, the Walter Reed Army Institute of Research, and the U.S. Army Surgeon General. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases and the U.S. Agency for International Development reviewed the study protocol. The trial was monitored by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases and the U.S. Army Medical Material Development Activity.

An independent data and safety monitoring board and a local safety monitor were appointed by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. The trial was conducted in compliance with the study protocol, the International Conference on Harmonization of Good Clinical Practices, the Declaration of Helsinki, and regulatory requirements of Mali. Program staff from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases contributed to the study design but played no role in the collection, analysis, or interpretation of the data, the writing of the manuscript, or the decision to submit it for publication, all of which were done by the authors. Authors from GlaxoSmithKline Biologicals contributed to the study design, provided edits to the version of the manuscript submitted for publication (including interpretation of the data), and agreed with the decision to submit the manuscript for publication; these industry authors played no role in the collection or analysis of the data. Data management and statistical support were provided by EMMES, a contract research organization. All authors vouch for the veracity and completeness of the data presented as well as the fidelity of this report to the study protocol.

STUDY PARTICIPANTS

The study was conducted at the Bandiagara Malaria Project research clinic in rural Mali from May 2007 through February 2008. Four hundred healthy children 1 to 6 years of age were enrolled and randomly assigned to receive either the malaria vaccine or a rabies vaccine (control vaccine). Written informed consent was obtained from a parent or guardian of each child. Active and passive surveillance for malaria began at the time of the first vaccination and continued throughout the follow-up period. Venous-blood samples were obtained for safety and immunogenicity analyses on the day of each vaccination and 1, 3, and 6 months after the third vaccination; samples were also collected 1 week after each vaccination for the safety analysis. The duration of follow-up for the primary analysis was 8 months (i.e., the 2-month vaccination period and 6 months of postvaccination surveillance, spanning one malaria season).

VACCINES

Children received either 50 μ g of lyophilized FMP2.1 (from the Walter Reed Army Institute of Research), which was resuspended shortly before vaccination in 0.5 ml of adjuvant (AS02_A, GlaxoSmithKline Biologicals),¹⁵ or 1 ml of purified chick-

embryo rabies vaccine (RabAvert, Chiron Vaccines). Vaccines were prepared in identical syringes and covered to conceal their contents.

RANDOMIZATION AND VACCINATION

Children were randomly assigned, in a 1:1 ratio, to receive three doses (one dose each month) of either vaccine. Block randomization was used, with stratification by age group. Participants were assigned study numbers in the order in which they arrived at the clinic on the first day of vaccination. Vaccines were administered intramuscularly in the left deltoid.

EFFICACY END POINTS

All primary, secondary, and exploratory end points were specified in the study protocol and in a statistical analysis plan that was finalized before unblinding. The primary end point was a clinical episode of malaria, defined as fever (axillary temperature of 37.5°C or higher) with an asexual *P. falciparum* density of at least 2500 parasites per cubic millimeter of blood. Secondary end points included one or more episodes of clinical malaria due to parasites that had AMA1 genotypes identical to the 3D7 vaccine strain with respect to designated immunologically important AMA1 polymorphisms (codons 196, 197, 199, 200, 201, 204, 206, and 207 in the cluster 1 loop of domain I)⁷ and the incidence of multiple episodes of clinical malaria. Exploratory efficacy end points included clinical episodes of malaria according to various definitions (i.e., parasitemia thresholds ranging from any level above 0 to 100,000 parasites per cubic millimeter and episodes with fever or with symptoms consistent with malaria, irrespective of the axillary temperature), cumulative asexual *P. falciparum* parasite density measured for each child as the total area under the curve (AUC) for parasitemia in both clinical malaria episodes and asymptomatic infections detected in monthly surveys, and the incidence of anemia, defined (on the basis of local norms) as a hemoglobin level of less than 8.4 g per deciliter.

MONITORING FOR EFFICACY AND SAFETY

Passive case detection was achieved by means of continuously available medical care, including prompt diagnosis and treatment of malaria. Active surveillance to detect asymptomatic malaria and anemia consisted of frequent, scheduled clinic visits during the vaccination period, followed by monthly visits during the 6-month period after

the third vaccination. Blood smears collected at monthly visits were not read at the time of collection unless symptoms were present. Solicited adverse events were recorded on vaccination days and 1, 2, 3, and 7 days after each vaccination. Unsolicited adverse events (those reported spontaneously by a parent or guardian) were recorded throughout the 8-month study period.

PARASITE GENOTYPING

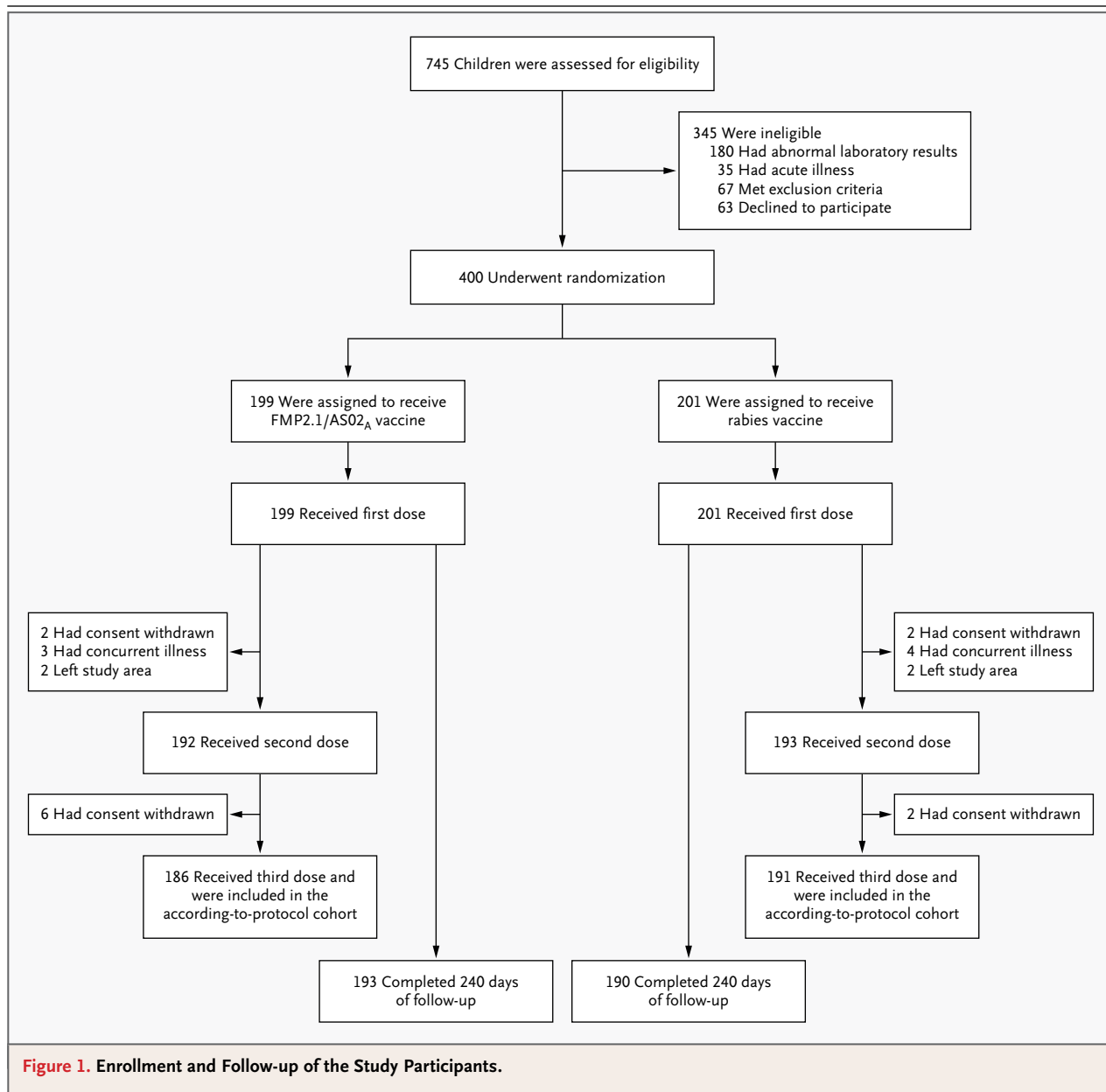
DNA was extracted from dried-blood spots collected during clinical malaria episodes, and the gene encoding *P. falciparum* AMA1 was sequenced.⁷ Clinical episodes were classified according to whether the AMA1 sequence of the infecting parasites matched or did not match that of the vaccine strain 3D7, with matching ascertained as complete concordance at eight polymorphic amino acid positions in the cluster 1 loop of AMA1 domain I. These eight positions had been identified before the analysis as important in the development of strain-specific immunity against AMA1, on the basis of both *in vitro*¹⁸ and molecular epidemiologic⁷ evidence.

STATISTICAL ANALYSIS

The study was designed to have 90% power to detect an efficacy rate of 20% for the malaria vaccine, with a two-tailed significance level of 0.05, assuming a 75% incidence of a first episode of clinical malaria. This relatively low overall efficacy rate was chosen in anticipation that the vaccine might have strain-specific efficacy only. All reported P values are two-sided.

The primary analysis estimated the hazard ratio for the first or only episode of clinical malaria in the intention-to-treat cohort (all randomly assigned children, with data collection starting on the day of the first vaccination). Secondary efficacy analyses were conducted to estimate the hazard ratio for the first or only clinical episode of malaria (according to the definition of the primary end point) with an AMA1 genotype matching that of the vaccine strain,⁷ the hazard ratio for multiple episodes, and the same end points in the per-protocol cohort (children who received all three doses of the assigned vaccine and completed at least 14 days of follow-up after the third vaccination, with data collection starting 14 days after the third vaccination).

The relationship between anti-AMA1 antibodies and the risk of clinical malaria was examined by estimating the hazard ratio for the first or only episode of clinical malaria. To estimate vaccine-



induced (as opposed to naturally acquired) anti-AMA1 antibodies, we subtracted the \log_{10} -transformed antibody level at baseline from the level at the time point, at least 2 weeks after the third vaccination, that was closest to but not after the first malaria episode.

Cumulative parasite density was estimated for each child by measuring the AUC for the entire study period and also for the period from 2 weeks after the third vaccination until the end of the follow-up period. All recorded episodes of parasitemia were included, irrespective of the presence

or absence of symptoms of malaria; parasite density was assumed to decline linearly to zero 3 days after a treated malaria episode. Additional details of the methods are given in the Supplementary Appendix, available at NEJM.org.

RESULTS

PARTICIPANTS

A total of 745 children were screened; 400 were randomly assigned to a vaccine, received at least one vaccination, and were included in the inten-

Table 1. Baseline Characteristics of the Study Participants, According to Vaccine Group.*

Characteristic	FMP2.1/AS02 _A Vaccine (N=199)	Rabies Vaccine (N=201)	P Value
Age — yr	3.4±1.6	3.4±1.5	0.94
Female sex — no. (%)	103 (51.8)	112 (55.7)	0.43
White-cell count — ×10 ⁻³ /mm ³	8.95±2.50	8.88±2.46	0.78
Hemoglobin — g/dl	10.8±0.9	10.7±0.9	0.23
Platelet count — ×10 ⁻³ /mm ³	340±110	342±106	0.83
Lymphocyte count — ×10 ⁻³ /mm ³	4.93±1.85	4.96±1.81	0.90
Creatinine — μmol/liter†	44.2±0.5	44.3±0.9	0.66
Alanine aminotransferase — U/liter	15.08±9.28	15.98±16.77	0.80
Anti-AMA1 antibody — g/ml			—
Geometric mean titer	0.73	0.85	
95% CI	0.51–1.05	0.59–1.22	
Used an insecticide-treated bed net the previous night — no. (%)	62 (31.2)	61 (30.3)	0.94

* Plus-minus values are means ±SD. AMA1 denotes apical membrane antigen 1, and CI confidence interval.

† The lower limit of detection for creatinine was 44.2 μmol per liter (0.5 mg/dl); results below the limit of detection were recorded as 44.2 μmol per liter. To convert values for creatinine to milligrams per deciliter, divide by 88.4.

tion-to-treat analysis. A total of 186 of 199 children (93.5%) in the malaria-vaccine group and 191 of 201 (95.0%) in the control group received all three immunizations. Of all 400 children, 383 (95.8%) completed follow-up to study day 240 (Fig. 1). Demographic and other characteristics were balanced between the two groups at enrollment (Table 1).

EFFICACY

The Kaplan–Meier cumulative incidence of the first or only malaria episode, as defined for the primary end point, was 48.4% in the malaria-vaccine group and 54.4% in the control group. The unadjusted efficacy of the malaria vaccine as compared with the control vaccine, ascertained by means of Cox regression analysis, was 17.4% (hazard ratio for the primary end point, 0.83; 95% confidence interval [CI], 0.63 to 1.09; $P=0.18$) (Fig. 2A). Of 22 clinical episodes of infection with a *P. falciparum* strain with vaccine-type AMA1, 16 occurred in the control group; efficacy against clinical malaria with vaccine-type AMA1 was 64.3% (hazard ratio with malaria vaccine vs. control vaccine, 0.36; 95% CI, 0.08 to 0.86; $P=0.03$) (Fig. 2B). Efficacy against multiple clinical episodes as defined for the primary end point was 20.0% (hazard ratio, 0.80; 95% CI, 0.63 to 1.02; $P=0.07$) and remained approximately 20% with the use of various definitions of malaria; the more permissive

definitions (i.e., those that resulted in an increased number of identified episodes) were associated with significant between-group differences ($P<0.05$) (Table 2). Per-protocol analyses produced similar efficacy estimates (see the Supplementary Appendix).

The median individual cumulative AUC for parasite density was 168,600 parasites per cubic millimeter in the vaccine group and 376,900 in the control group in the intention-to-treat analysis and 97,700 per cubic millimeter in the malaria-vaccine group and 308,600 in the control group in the per-protocol analysis ($P=0.01$ for both analyses). Figure 2 in the Supplementary Appendix shows cumulative total AUC for parasitemia in each group.

There were 17 anemia episodes in 16 children in the vaccine group and 18 episodes in 16 children in the control group ($P=1.00$). No significant differences between the two groups were seen in the incidence of anemia during clinical malaria episodes or in the incidence of severe anemia, both of which were rare.

SAFETY AND REACTOGENICITY

Results for safety and reactogenicity were similar to those in earlier trials of this vaccine in the same population.^{15,16} There were no deaths and no vaccine-related serious adverse events. Serious adverse

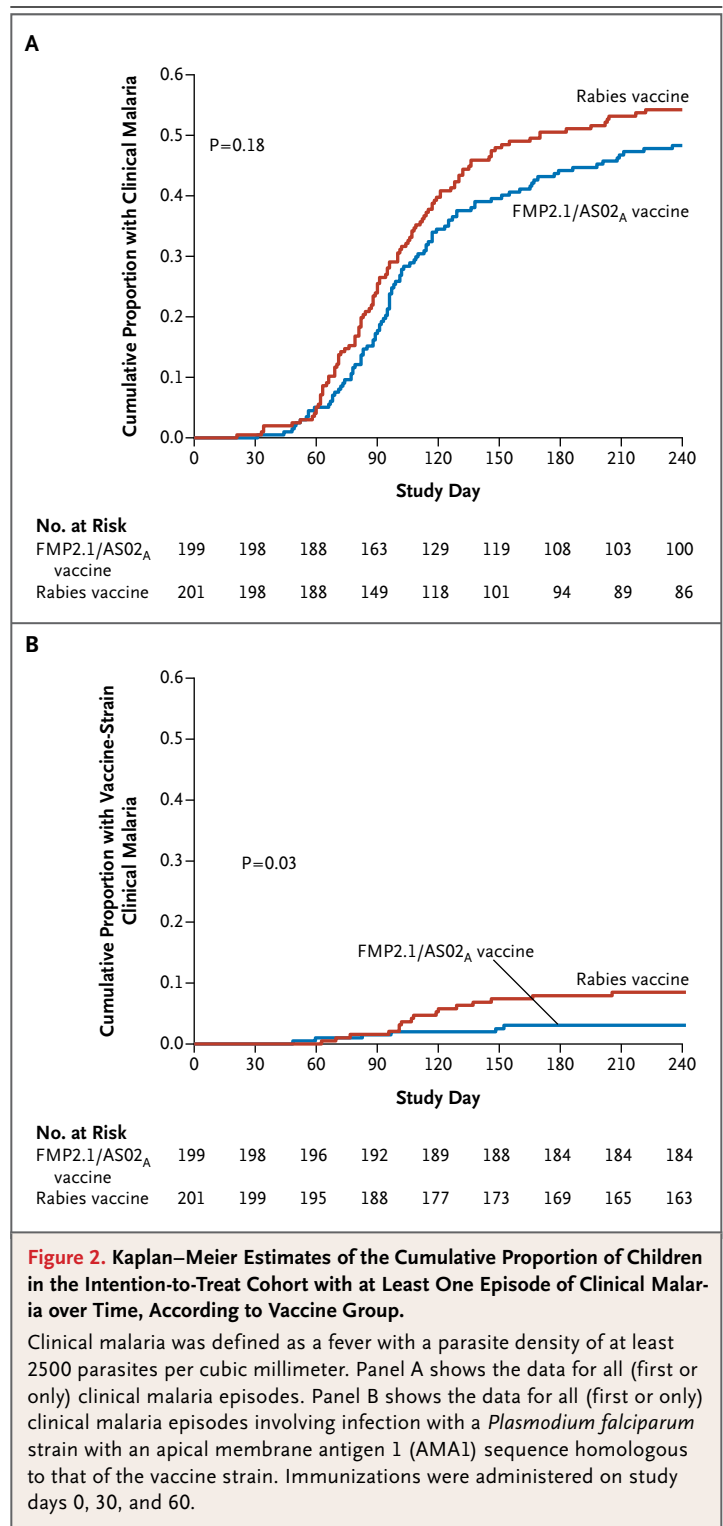
events occurred in five children in the malaria-vaccine group (one episode each of severe malaria, febrile seizure associated with malaria, respiratory distress attributed to bronchiolitis, severe dehydration and malnutrition, and paralytic ileus) and in one child in the control group (febrile seizure associated with malaria). Laboratory safety tests revealed no significant differences between the two groups in the number of out-of-range values or of severity values of grade 2 or higher (Table 3).

Local reactions occurred in 99.0% of children in the vaccine group (95% CI, 96.4 to 99.0) and in 82.1% in the control group (95% CI, 76.1 to 87.1). Most local reactions consisted of swelling, typically noted only on physical examination and not of concern to parents. The most common unsolicited adverse event was subjective fever, reported in 40.2% of children in the malaria-vaccine group and 17.4% of those in the control group ($P < 0.001$). There were no other imbalances between the two groups with respect to other, less-frequent unsolicited adverse events (Table 3). Fever was also the most common solicited symptom in both groups, recorded for 61.3% of children in the malaria-vaccine group and for 25.9% of children in the control group. Irritability or fussiness and loss of appetite were reported more frequently in the malaria-vaccine group than in the control group (Table 1 in the Supplementary Appendix).

IMMUNOGENICITY

The geometric mean titer of anti-AMA1 antibodies 1 month after the third vaccination was 188,449 enzyme-linked immunosorbent assay units (EU) per milliliter (95% CI, 165,626 to 214,418) in the malaria-vaccine group and 782 EU per milliliter (95% CI, 525 to 1165) in the control group (Fig. 3). Antibody titers increased by a factor of 54 a month after the first vaccination with the malaria vaccine, peaking a month after the third vaccination, with an increase over the baseline titer by a factor of 479. The titers in the malaria-vaccine group remained significantly higher than those in the control group throughout the observation period. Anti-AMA1 antibody titers in the control group increased modestly during the malaria transmission season, rising by a factor of two by 1 month after the first vaccination and peaking at three times the baseline level by 3 months after the third vaccination.

Neither the AMA1 antibody titer at baseline nor the titer 1 month after the third vaccination was associated with efficacy against clinical ma-



laria, but the increase over the baseline titer at the last measurement before the first clinical episode was associated with protection against clini-

Table 2. Vaccine Efficacy against First and Multiple Episodes of Clinical Malaria in the Intention-to-Treat Cohort.

Definition of Clinical Malaria	First Episode				Multiple Episodes			
	FMP2.1/ AS02 _A Vaccine <i>no. of children</i>	Rabies Vaccine	Percent Efficacy (95% CI)	P Value	FMP2.1/ AS02 _A Vaccine <i>no. of episodes</i>	Rabies Vaccine	Percent Efficacy (95% CI)	P Value
Any axillary temperature								
Parasite load, >0/mm ³	117	134	22.1 (0.2 to 39.2)	0.048	176	224	22.2 (5.2 to 36.1)	0.01
Parasite load, ≥100/mm ³	116	133	22.3 (0.4 to 39.5)	0.047	173	222	22.8 (5.9 to 36.8)	0.01
Parasite load, ≥1000/mm ³	110	126	22.6 (0.0 to 40.0)	0.05	155	204	24.8 (7.3 to 38.9)	0.008
Parasite load, ≥2500/mm ³	107	123	22.1 (-0.9 to 39.9)	0.06	149	193	23.5 (5.3 to 38.2)	0.01
Parasite load, ≥5000/mm ³	106	122	22.0 (-1.2 to 39.9)	0.06	146	188	23.1 (4.5 to 38.0)	0.02
Parasite load, ≥10,000/mm ³	97	115	23.9 (0.3 to 41.9)	0.048	129	175	27.0 (8.3 to 41.8)	0.007
Parasite load, ≥20,000/mm ³	86	104	23.6 (-1.7 to 42.6)	0.07	112	147	24.5 (3.4 to 40.9)	0.03
Parasite load, ≥50,000/mm ³	61	71	16.7 (-17.3 to 40.8)	0.30	72	91	21.5 (-7.0 to 42.4)	0.13
Parasite load, ≥100,000/mm ³	29	36	20.4 (-29.8 to 51.2)	0.36	32	41	22.5 (-23.1 to 51.2)	0.28
Axillary temperature ≥37.5°C								
Parasite load, >0/mm ³	105	113	12.7 (-13.8 to 33.1)	0.32	144	167	14.5 (-6.9 to 31.6)	0.17
Parasite load, ≥100/mm ³	103	112	14.0 (-12.4 to 34.2)	0.27	141	166	15.8 (-5.5 to 32.7)	0.14
Parasite load, ≥1000/mm ³	98	108	16.6 (-9.7 to 36.6)	0.19	126	155	19.4 (-2.0 to 36.3)	0.07
Parasite load, ≥2500/mm ³ (primary end point)	95	106	17.4 (-8.9 to 37.4)	0.18	121	150	20.0 (-1.6 to 37.1)	0.07
Parasite load, ≥5000/mm ³	94	105	17.8 (-8.6 to 37.8)	0.17	119	149	20.8 (-0.8 to 37.8)	0.06
Parasite load, ≥10,000/mm ³	86	100	20.9 (-5.6 to 40.7)	0.11	108	139	23.0 (1.0 to 40.1)	0.04
Parasite load, ≥20,000/mm ³	78	88	16.6 (-13.2 to 38.5)	0.25	94	116	19.6 (-5.6 to 38.7)	0.12
Parasite load, ≥50,000/mm ³	54	59	11.7 (-27.7 to 39.0)	0.51	61	74	18.2 (-14.9 to 41.7)	0.25
Parasite load, ≥100,000/mm ³	26	29	11.4 (-50.4 to 47.8)	0.65	28	34	18.2 (-34.9 to 50.4)	0.43

cal malaria, as defined according to criteria for the primary end point (hazard ratio, 0.72; 95% CI, 0.60 to 0.87; $P < 0.001$).

DISCUSSION

The FMP2.1/AS02_A malaria vaccine did not have significant efficacy against clinical malaria episodes meeting the criteria for the primary efficacy end point. However, in planned secondary analyses, the vaccine had efficacy against clinical malaria caused by parasites that were identical to the vaccine strain with respect to immunologically important polymorphisms in the vaccine antigen. Sensitivity analyses provided estimates of about 20% efficacy against both first and multiple malaria episodes diagnosed according to various definitions of clinical malaria. This finding suggests that it is possible for a malaria vaccine targeting

a single blood-stage protein to provide protection against clinical malaria.

Another AMA1 vaccine was associated with a possibly increased risk of severe anemia.⁵ We found that recipients of the FMP2.1/AS02_A vaccine did not have an increased risk of anemia but had more local reactions and other adverse events than did control-vaccine recipients. The safety and adverse-event profile of this vaccine was acceptable and similar to those of other vaccines containing the same or similar adjuvant systems.

FMP2.1/AS02_A elicited sustained antibody titers. Neither baseline nor peak postimmunization antibody levels were associated with protection against clinical malaria. However, the increase in antibody levels occurring between vaccination and the first clinical episode did correlate with an increase in protection. These findings suggest that naturally acquired AMA1 antibodies might

Table 3. Unsolicited and Laboratory Adverse Events in the Intention-to-Treat Cohort, According to Vaccine Group.

Adverse Event	FMP2.1/AS02 _A Vaccine		Rabies Vaccine		P Value*
	No. of Children (N=199)	Percent (95% CI)	No. of Children (N=201)	Percent (95% CI)	
Unsolicited adverse event†					
Any	198	99.5 (98.5 to 100.5)	195	97.0 (94.7 to 99.4)	0.12
Fever	80	40.2 (33.4 to 47.0)	35	17.4 (12.2 to 23.7)	<0.001
Gastrointestinal disorder	66	33.2 (26.6 to 39.7)	74	36.8 (30.1 to 43.5)	0.46
Respiratory disorder	94	47.2 (40.3 to 54.2)	99	49.3 (42.3 to 56.2)	0.69
Eye disorder	31	15.6 (10.5 to 20.6)	30	14.9 (10.0 to 19.9)	0.89
Skin or subcutaneous-tissue disorder	29	14.6 (9.7 to 19.5)	22	10.9 (6.6 to 15.3)	0.30
Severity grade 3 (prevents everyday activities)	3	1.5 (–0.2 to 3.2)	2	1.0 (–0.4 to 2.4)	0.68
Serious	5	2.5 (0.3 to 4.7)	1	0.5 (–0.5 to 1.5)	0.12
Laboratory adverse event					
Alanine aminotransferase					
Any	9	4.5 (1.6 to 7.4)	8	4.0 (1.3 to 6.7)	0.81
Severity grade 2 or higher	2	1.0 (–0.4 to 2.4)	1	0.5 (–0.5 to 1.5)	0.62
Creatinine					
Any	2	1.0 (–0.4 to 2.4)	2	1.0 (–0.4 to 2.4)	1.00
Severity grade 2 or higher	0	0.0 (0.0 to 0.0)	0	0.0 (0.0 to 0.0)	—
Hemoglobin					
Any	23	11.6 (7.1 to 16.0)	24	11.9 (7.4 to 16.5)	1.00
Severity grade 2 or higher	0	0.0 (0.0 to 0.0)	5	2.5 (0.3 to 4.7)	0.06
Lymphocytes					
Any	30	15.1 (10.1 to 20.1)	23	11.4 (7.0 to 15.9)	0.31
Severity grade 2 or higher	0	0.0 (0.0 to 0.0)	0	0.0 (0.0 to 0.0)	—
Platelets					
Any	65	32.7 (26.2 to 39.2)	51	25.4 (19.3 to 31.4)	0.12
Severity grade 2 or higher	0	0.0 (0.0 to 0.0)	0	0.0 (0.0 to 0.0)	—
White cells					
Any	36	18.1 (12.7 to 23.4)	37	18.4 (13.0 to 23.8)	1.00
Severity grade 2 or higher	12	6.0 (2.7 to 9.3)	14	7.0 (3.4 to 10.5)	0.84

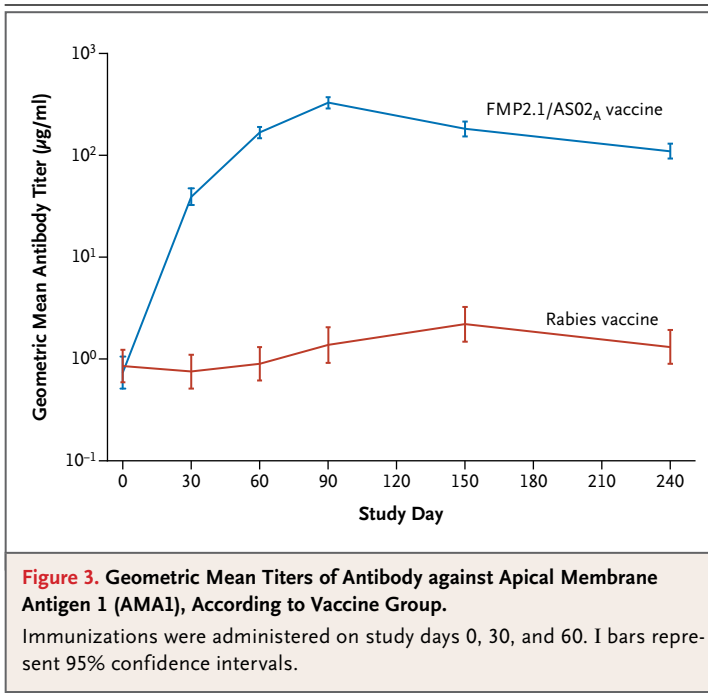
* P values are for the difference between vaccine groups.

† An unsolicited adverse event was an adverse event reported spontaneously by a parent or guardian.

reflect recent exposure to malaria and might therefore be temporally associated with an increased risk of malaria, not as the cause but as an effect of this increased risk, providing support for a role of vaccine-induced antibodies in protection against clinical malaria. Alternatively, the postvaccination rise in antibody levels may reflect enhancement of some other protective mechanism. We previously reported that FMP2.1/AS02_A elicited cellular immune responses in Malian adults.¹⁹ Studies of cellular immune responses,

IgG subclass, antibody avidity, and serologic growth inhibition may identify immune correlates of protection and inform future decisions about vaccine development for clinical use.

Several factors may account for the apparent ability of FMP2.1/AS02_A to provide partial protection even though other single-antigen blood-stage malaria vaccines provided none. No malaria vaccine has been designed on the basis of knowledge of the frequency of antigenic variants at the testing site, nor have previous trials been designed



to detect strain-specific efficacy.⁶ A low frequency of parasites that were homologous to the vaccine strain most likely contributed to the lack of efficacy reported for one blood-stage vaccine.⁴ Although one of the most frequent AMA1 variants at our study site corresponds to the *P. falciparum* strain used to create FMP2.1/AS02_A, improving prospects for measurable efficacy,⁷ our trial was underpowered to detect efficacy against strains with AMA1 completely identical to the vaccine strain, in the absence of any cross-protection. Trials of vaccines based on polymorphic antigens should be designed with consideration of strain frequencies at the study sites.

A bivalent AMA1 vaccine with aluminum hydroxide as an adjuvant, which showed no overall⁵ or strain-specific¹⁷ efficacy in Malian children, produced comparatively modest antibody responses (peak antibody level approximately 15 times the baseline level, as compared with an increase by a factor of 479 seen with FMP2.1/AS02_A) that were short-lived, suggesting that insufficient immunogenicity contributed to the lack of efficacy.⁵ Use of AS02_A most likely contributed to the apparent strain-specific efficacy of FMP2.1/AS02_A. The development of the malaria vaccine RTS,S/AS01, which reduces the risk of clinical malaria in children,^{20,21} has undergone progressive improvements in adjuvant systems.²²⁻²⁴ Adjuvants appear

to be a necessary component for efficacious subunit-protein malaria vaccines.

Previously, FMP2.1/AS02_A did not prevent or delay parasitemia in volunteers with no history of malaria who were challenged by infected mosquitoes, but it did reduce parasite density before treatment.¹⁴ This result and our observation that the vaccine prevented clinical malaria caused by homologous parasites and reduced cumulative parasite density with all infections suggest that FMP2.1/AS02_A controls parasite density by reducing the efficiency of parasitic invasion of erythrocytes.

FMP2.1/AS02_A appears to have some activity against parasites with AMA1 that is not identical to the vaccine strain, since even complete efficacy against the small proportion of parasites with an AMA1 sequence that is identical to that of the vaccine strain would not account for the modest reduction in the incidence of first or multiple clinical episodes observed in secondary and exploratory analyses or for the larger reduction in episodes caused by parasites that correspond to the vaccine strain at a few immunologically important amino acid positions but that differ from the vaccine strain at other amino acid positions.⁷ Further analyses of molecular and immunologic correlates of protection may provide insight into the extent of cross-protection and guide the development of more effective next-generation vaccines.³

The views expressed in this article are those of the authors and should not to be construed as official positions of the U.S. Department of the Army or Department of Defense.

Supported by a contract (N01AI85346) and a cooperative agreement (U19AI065683) from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, a grant (D43TW001589) from the Fogarty International Center, National Institutes of Health, and a contract (W81XWH-06-1-0427) from the Department of Defense and the U.S. Agency for International Development for site development and the conduct of the trial; by a contract (HH-SN272200800013C) from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases for data management and statistical support; by grants from the U.S. Agency for International Development and the Military Infectious Diseases Research Program, Fort Detrick, MD, for vaccine production and laboratory assays; and by the Doris Duke Charitable Foundation Distinguished Clinical Scientist Award and an award from the Howard Hughes Medical Institute (to Dr. Plowe).

Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at NEJM.org.

We thank Steven Rosenthal, Walter Jones, Abdollah Naficy, and Lee Hall of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases for support and advice; Mariam Traore Guindo and Boubacar Kouyate for serving as local medical monitors; the study monitors, Norbert Tamm (of PPD) and Denise McKinney (of the U.S. Army Medical Materiel and Development Activity); Valerie Brown and the malaria team at EMMES; Mirjana Nesin, medical monitor, National Institute of Allergy and Infectious Diseases,

and members of the data and safety monitoring board (Anna Durbin, Kathryn Edwards, Cristina Sison, Elissa Malkin, Mariam Traore Guindo, and David Diemert); Amanda Leach and the Glaxo-SmithKline Malaria Vaccine Project Team (in particular, Marie-Ange Demoitie, Yannick Vanloubbeek, and Marc Lievens); Mahamadou Traore, Bourama Kane, Mamadou Dembele, and the

Bandiagara District Hospital staff for clinical assistance; Danze Coulibaly, Sekouba Mariko, and Moctar Traore for administrative support; Nicole Eddington, Carey Martin, and Lisa Ware for technical and administrative support; Karen Ball for regulatory support; the team of the Bandiagara Malaria Project in Bandiagara for their dedication; and the community of Bandiagara, Mali.

REFERENCES

1. Plowe CV, Alonso P, Hoffman SL. The potential role of vaccines in the elimination of falciparum malaria and the eventual eradication of malaria. *J Infect Dis* 2009;200:1646-9.
2. A research agenda for malaria eradication: vaccines. *PLoS Med* 2011;8(1):e1000398.
3. Heppner DG Jr, Kester KE, Ockenhouse CF, et al. Towards an RTS,S-based, multi-stage, multi-antigen vaccine against falciparum malaria: progress at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine* 2005;23:2243-50.
4. Ogotu BR, Apollo OJ, McKinney D, et al. Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in Western Kenya. *PLoS ONE* 2009;4(3):e4708.
5. Sagara I, Dicko A, Ellis RD, et al. A randomized controlled phase 2 trial of the blood stage AMA1-C1/Alhydrogel malaria vaccine in children in Mali. *Vaccine* 2009;27:3090-8.
6. Takala SL, Plowe CV. Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming 'vaccine resistant malaria.' *Parasite Immunol* 2009;31:560-73.
7. Takala SL, Coulibaly D, Thera MA et al. Extreme polymorphism in a vaccine antigen and risk of clinical malaria: implications for vaccine development. *Sci Transl Med* 2009;1(2):2ra5.
8. Genton B, Betuela I, Felger I, et al. A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea. *J Infect Dis* 2002;185:820-7.
9. Enosse S, Dobaño C, Quelhas D, et al. RTS,S/AS02A malaria vaccine does not induce parasite CSP T cell epitope selection and reduces multiplicity of infection. *PLoS Clin Trials* 2006;1(1):e5.
10. Allouche A, Milligan P, Conway DJ, et al. Protective efficacy of the RTS,S/AS02 *Plasmodium falciparum* malaria vaccine is not strain specific. *Am J Trop Med Hyg* 2003;68:97-101.
11. Waitumbi JN, Anyona SB, Hunja CW, et al. Impact of RTS,S/AS02(A) and RTS,S/AS01(B) on genotypes of *P. falciparum* in adults participating in a malaria vaccine clinical trial. *PLoS ONE* 2009;4(11):e7849.
12. Dutta S, Lalitha PV, Ware LA, et al. Purification, characterization, and immunogenicity of the refolded ectodomain of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 expressed in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2002;70:3101-10.
13. Polhemus ME, Magill AJ, Cummings JF, et al. Phase I dose escalation safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* apical membrane protein (AMA-1) FMP2.1, adjuvanted with AS02A, in malaria-naive adults at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine* 2007;25:4203-12.
14. Spring MD, Cummings JF, Ockenhouse CF, et al. Phase 1/2a study of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen-1 (AMA-1) administered in adjuvant system AS01B or AS02A. *PLoS ONE* 2009;4(4):e5254.
15. Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, et al. Safety and immunogenicity of an AMA-1 malaria vaccine in Malian adults: results of a phase 1 randomized controlled trial. *PLoS ONE* 2008;3(1):e1465.
16. Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, et al. Safety and immunogenicity of an AMA1 malaria vaccine in Malian children: results of a phase 1 randomized controlled trial. *PLoS ONE* 2010;5(2):e9041.
17. Ouattara A, Mu J, Takala-Harrison S, et al. Lack of allele-specific efficacy of a bivalent AMA1 malaria vaccine. *Malar J* 2010;9:175.
18. Dutta S, Lee SY, Batchelor AH, Lanar DE. Structural basis of antigenic escape of a malaria vaccine candidate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:12488-93.
19. Lyke KE, Daoou M, Diarra I, et al. Cell-mediated immunity elicited by the blood stage malaria vaccine apical membrane antigen 1 in Malian adults: results of a Phase I randomized trial. *Vaccine* 2009;27:2171-6.
20. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, et al. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* 2004;364:1411-20.
21. Bejon P, Lusingu J, Olotu A, et al. Efficacy of RTS,S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age. *N Engl J Med* 2008;359:2521-32.
22. Gordon DM, McGovern TW, Krzych U, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine. *J Infect Dis* 1995;171:1576-85.
23. Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG, et al. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 1997;336:86-91.
24. Kester KE, McKinney DA, Tornieporth N, et al. Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 2001;183:640-7.

Copyright © 2011 Massachusetts Medical Society.

4.4 Le bout du tunnel de la recherche du vaccin antipaludique?

Article IV : Thera MA, Plowe CV. Vaccines for malaria: how close are we? *Annu Rev Med.* 2012;63:345-57. Epub 2011 Nov 10. Review.

La recherche du vaccin antipaludique a connu des progrès fulgurants au cours de ces vingt dernières années. L'approche la plus courante est encore basée sur l'étude des antigènes parasitaires exprimés à différents stades de développement du parasite pour tenter de les inclure dans une préparation vaccinale. L'absence d'un marqueur immunologique qui corrèle avec la protection contre le paludisme rend la démarche ardue. Elle est compliquée davantage par le génome complexe de *P. falciparum* avec ses 23 millions de paires de bases, organisées en 14 chromosomes et environ 5000 gènes. Cela fait du plasmodium un organisme beaucoup plus complexe que tous les autres pour lesquels un vaccin efficace existe. La complexité est encore augmentée par les mutations génétiques durant les divisions mitotiques des formes asexuées et les recombinaisons génétiques des divisions sexuées qui génèrent une grande diversité génétique. La diversité génétique est amplifiée et modulée par la pression sélective exercée soit par le système immunitaire de l'hôte humain, ou les médicaments. Ou plus tard par les vaccins antipaludiques, quand ceux-ci seront déployés. Parmi les vaccins candidats visant une action pré érythrocytaire, RTS,S/AS01 est le plus avancé. Il est en cours d'évaluation pivot dans le plus large essai vaccinal d'efficacité entrepris jusqu'à nos jours, a inclus plus de 15000 enfants dans 11 sites de 7 pays en Afrique à partir de 2009. Les résultats ont montré clairement l'efficacité protectrice du vaccin de 56% IC à 97.5% [51% - 60%] chez les enfants plus âgés de 5 à 17 mois au moment de leur inclusion et pendant les douze premiers mois du suivi. Chez les enfants âgés de 6-12 semaines au moment de la première vaccination l'efficacité du vaccin a été plus faible, 30,1% IC à 95% [23,6% - 36,1%]. Les résultats après 32 mois de suivi et l'administration d'une dose de rappel sont attendus en fin 2014. Le vaccin candidat RTS,S/AS01 posera aux décideurs de santé publique en Afrique de prendre des décisions aux répercussions importantes si le vaccin candidat obtient le feu vert de l'OMS. En effet, il s'agira de décider l'allocation de fonds limités à différentes interventions ayant différents niveaux d'efficacité. Le bénéfice en terme de santé publique de chaque intervention aura une place de choix. Parmi les vaccins de stades sanguins, nos résultats sur la forte efficacité spécifique d'allèle d'AMA1, efficacité en analyse PP (per protocole) de 71,6% IC à 95% [9,3 - 86,2]; $p=0.027$, a démontré la preuve du concept de vaccin de stade sanguins et a insufflé une dynamique nouvelle dans la recherche de candidats encore plus efficace. Les efforts sur d'autres candidat vaccins sont pleins de promesses. Les antigènes parasitaires

exprimés chez le moustique dans le cas des vaccins pour bloquer la transmission offrent l'avantage d'échapper à la pression sélective du système immunitaire. En fait le concept d'intervention sur la transmission a été élargi pour inclure aussi les vaccins ciblant d'autres stades mais avec une très grande efficacité, de tels vaccins réduiront aussi la transmission. Ce concept de vaccin pour interrompre la transmission bénéficie de beaucoup d'attention dans la perspective actuelle d'éradication du paludisme. Les approches organismes entiers reviennent aussi en force dans cette perspective, notamment le sporozoïte entier mais aussi le mérozoïte entier de stade sanguin. Les progrès technologiques permettent maintenant de relever le défi de la fabrication GMP de ces produits. Une utilisation encore plus prometteuse du sporozoïte entier intervient dans le modèle d'épreuve d'infection expérimentale, CHMI, acronyme en anglais pour Controlled Human Malaria Infection. Cet outil a le potentiel d'accélérer le processus d'évaluation de l'efficacité de nouveaux vaccins mais aussi de médicaments dans un environnement sous contrôle partout dans le monde, y compris en Afrique.

Vaccines for Malaria: How Close Are We?

Mahamadou A. Thera¹ and Christopher V. Plowe²

¹Malaria Research and Training Center, Faculty of Medicine, University of Bamako, Bamako, Mali, West Africa; email: mthera@icermali.org

²Howard Hughes Medical Institute/Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland 21201; email: cplowe@medicine.umaryland.edu

Annu. Rev. Med. 2012. 63:345–57

First published online as a Review in Advance on November 10, 2011

The *Annual Review of Medicine* is online at med.annualreviews.org

This article's doi:
10.1146/annurev-med-022411-192402

Copyright © 2012 by Annual Reviews.
All rights reserved

0066-4219/12/0218-0345\$20.00

Keywords

Plasmodium falciparum, malaria eradication, malaria prevention, malaria immunity, subunit vaccines, whole-organism vaccines

Abstract

Vaccines are the most powerful public health tools mankind has created, but malaria parasites are bigger, more complicated, and wilier than the viruses and bacteria that have been conquered or controlled with vaccines. Despite decades of research toward a vaccine for malaria, this goal has remained elusive. Nevertheless, recent advances justify optimism that a licensed malaria vaccine is within reach. A subunit recombinant protein vaccine that affords in the neighborhood of 50% protective efficacy against clinical malaria is in the late stages of clinical evaluation in Africa. Incremental improvements on this successful vaccine are possible and worth pursuing, but the best hope for a highly efficacious malaria vaccine that would improve prospects for malaria eradication may lie with the use of attenuated whole parasites and powerful immune-boosting adjuvants.

Pre-erythrocytic: stages of the malaria parasite that are injected by a mosquito and develop in the liver before emerging into the blood where they can cause symptoms. Vaccines targeting pre-erythrocytic stages are intended to prevent infection altogether and, if highly effective, would also prevent disease and block transmission

INTRODUCTION

Malaria is a potentially fatal parasitic disease transmitted to humans and other vertebrates by mosquitoes. The malaria parasite is thought to have killed more humans throughout history than any other single cause. Today, along with AIDS and tuberculosis, malaria remains one of the “big three” infectious diseases, every year exacting a heavy toll on human life and health in parts of Central and South America, in large regions of Asia, and throughout most of sub-Saharan Africa, where up to 90% of malaria deaths occur (1). Starting in the late 1990s, new tools, including long-lasting insecticide-impregnated nets and highly efficacious combination drug therapies, led to dramatic reductions in the malaria burden in some areas and complete elimination of malaria in others. These success stories have stimulated a renewed sense of optimism about prospects for global malaria eradication (2).

If it is to succeed, this nascent drive toward country-by-country elimination and possible eventual worldwide eradication of malaria will require powerful new tools, importantly including vaccines. A successful malaria vaccine must produce protective immune responses that surpass those acquired through natural exposure to malaria (3). Successful global or regional campaigns to eradicate smallpox, polio, and measles have all relied on vaccines. Campaigns against yellow fever, hookworm, and yaws—and malaria—have relied primarily on nonvaccine measures such as vector control or drug treatment, and have all failed (4). Although the odds of successful global malaria eradication would be long even with an ideal malaria vaccine, they are virtually nil without one. In the meantime, even a modestly effective vaccine could substantially reduce the continuing heavy burden of malaria-attributable disease and death.

VACCINES AND THE MALARIA LIFE CYCLE

Four species of *Plasmodium* cause malaria disease primarily in humans: *P. falciparum*,

P. vivax, *P. ovale*, and *P. malariae*. A fifth, *P. knowlesi*, infects mainly nonhuman primates but was recently found also to infect and sicken humans, and hundreds of other malaria species infect other mammals, reptiles and birds. Because it is responsible for most severe malaria disease and deaths, *P. falciparum* has been the target of most vaccine development efforts and is the main focus of this review.

The malaria life cycle begins when the female *Anopheles* mosquito injects worm-like sporozoites from her salivary gland into the skin as she takes a blood meal (**Figure 1**). After invading the liver, each sporozoite multiplies over several days into tens of thousands of tiny merozoites packed into a single hepatocyte. These pre-erythrocytic stages cause no clinical signs or symptoms. A highly efficacious pre-erythrocytic vaccine would thus completely block infection, preventing parasites from reaching the blood and causing disease, and also preventing transmission.

Rupturing hepatocytes release showers of merozoites into the circulation, initiating the “blood stage” of malaria infection, which is responsible for disease. Merozoites quickly invade erythrocytes and undergo asexual multiplication, dividing, growing, bursting from the erythrocyte, and reinventing in a periodic pattern with each cycle lasting two days (three days in the case of *P. malariae*), until interrupted by host immunity, drug treatment, or death. Malaria vaccines that target the blood stage are thought of as antisease vaccines, and are expected to prevent or reduce clinical illness without preventing infection.

Some blood-stage parasites develop into male and female gametocytes. These sexual forms of *Plasmodium* are taken up by the mosquito during a blood meal, then mate to form a brief diploid stage and develop through further haploid stages before migrating from the gut to the salivary glands (**Figure 1**). Each mating pair of gametocytes yields up to 1,000 infectious sporozoites, which are injected into the host to complete the transmission cycle. Vaccines targeting the sexual stages would prevent neither infection nor disease in the

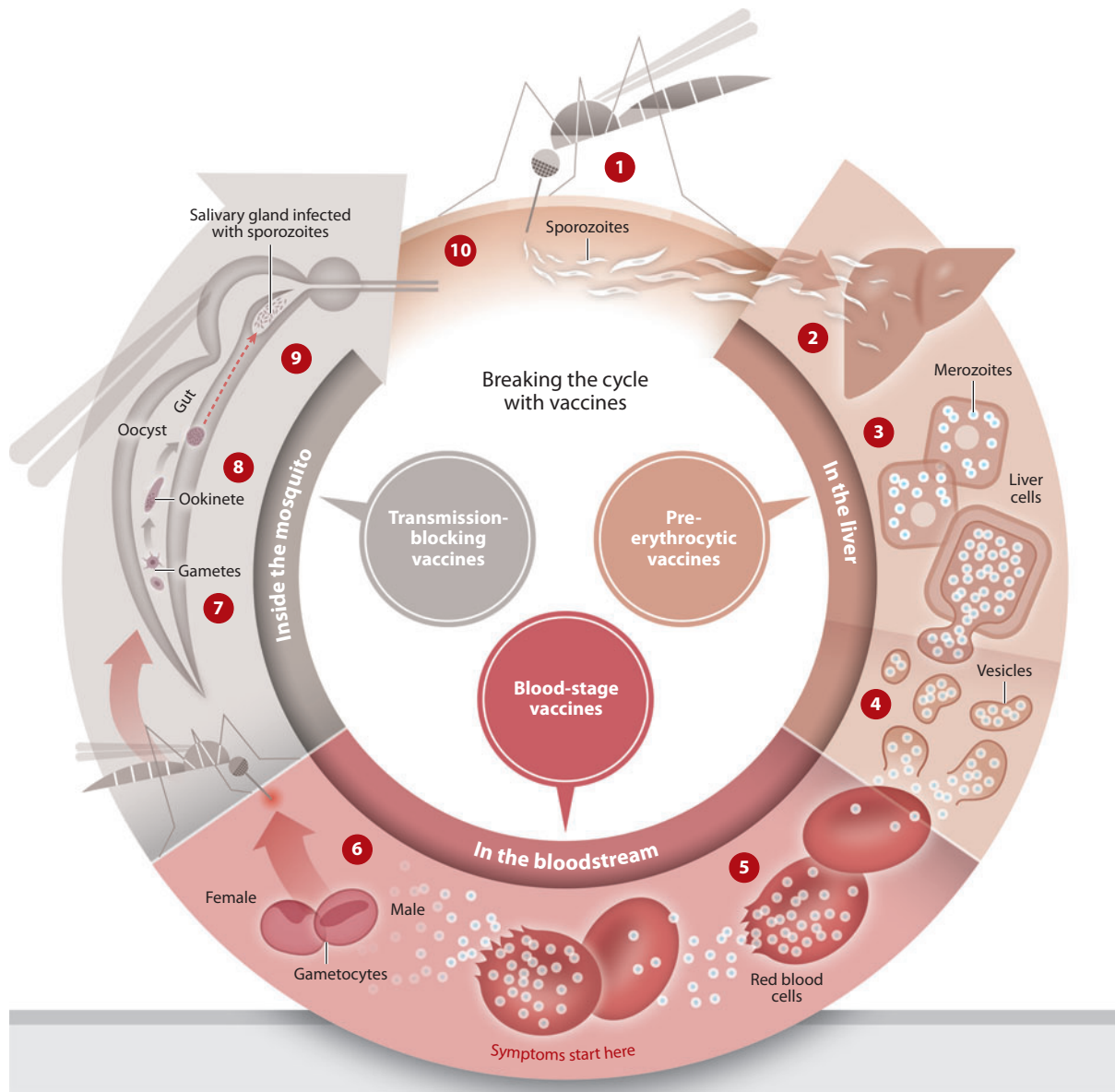


Figure 1

Life cycle of malaria and stages targeted by vaccines. ① An infected female *Anopheles* mosquito bites a person, injecting *Plasmodium* parasites, in the form of sporozoites, into the bloodstream. ② The sporozoites pass quickly into the human liver. ③ The sporozoites multiply asexually in the liver cells over the next 7–10 days, causing no symptoms. ④ The parasites, in the form of merozoites, burst from the liver cells. ⑤ In the bloodstream, the merozoites invade red blood cells (erythrocytes) and multiply again until the cells burst. Then they invade more erythrocytes. This cycle is repeated, causing fever each time parasites break free and invade blood cells. ⑥ Some of the infected blood cells leave the cycle of asexual multiplication. Instead of replicating, the merozoites in these cells develop into sexual forms of the parasite, called gametocytes, that circulate in the bloodstream. ⑦ When a mosquito bites an infected human, it ingests the gametocytes, which develop further into mature sex cells called gametes. ⑧ The gametes develop into actively moving ookinets that burrow into the mosquito's midgut wall and form oocysts. ⑨ Inside the oocyst, thousands of active sporozoites develop. The oocyst eventually bursts, releasing sporozoites that travel to the mosquito salivary glands. ⑩ The cycle of human infection begins again when the mosquito bites another person. Figure adapted from PATH Malaria Vaccine Initiative.

PfEMP1: *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1, a highly variable parasite protein expressed on the surface of host erythrocytes that mediates cytoadherence, pathogenesis, and immune evasion

vaccinated individual and are thought of as transmission-blocking vaccines. Highly efficacious pre-erythrocytic or blood-stage vaccines that prevent sexual reproduction would also block transmission, so the term “transmission-blocking” does not refer exclusively to vaccines against sexual or mosquito stages of the parasite (5).

EPIDEMIOLOGY, DISEASE, AND IMMUNITY

Clinical falciparum malaria originates with changes in the infected erythrocytes. *P. falciparum* parasites effectively hijack the host cell and its machinery, expressing on the erythrocyte surface highly variant *P. falciparum* erythrocyte membrane proteins (PfEMP1s), which are encoded by a large, diverse family of up to 60 *var* genes in each parasite genome (6). PfEMP1s are expressed on the red cell surface in cytoadherent clumps known as knobs. Infected red cells sequester in the microcirculatory compartments of organs, most notably in the brain and placenta, leading to disease. The slow acquisition of immune protection against uncomplicated malaria over years of repeated exposure to malaria is thought to represent the accumulation of protective immune responses to a repertoire of diverse antigens, probably including both PfEMP1s and the surface proteins that are the targets of most vaccine candidates.

The patterns and intensity of malaria transmission are the primary determinants of malaria epidemiology, which in turn drives the prevalence of malaria infection and the incidence of different forms of malaria disease. Depending largely on the degree of host immunity, the manifestations of malaria infection can range from completely asymptomatic parasitemia to mild disease to acute, catastrophic, life-threatening illness. Very young infants are thought to be protected from malaria disease by maternal antibodies and persistent hemoglobin F. Protective immunity against malaria disease is acquired through repeated exposure and is therefore related to transmission intensity.

Where malaria transmission is moderate or high, the risk period for death from malaria is highest in infants and young children who are in the process of developing acquired immunity. Semi-immune adults, although they remain susceptible to asymptomatic parasitemia, are protected against clinical malaria disease, rarely becoming ill even when persistently infected. This protective immunity is lost after a few years in the absence of exposure. Acquired immunity is also diminished in pregnancy, in that women pregnant with their first child are susceptible to severe *P. falciparum* disease from placental malaria because they lack immunity to placenta-specific cytoadherence proteins. In subsequent pregnancies, as placental immunity develops, there is a reduced risk of adverse effects of malaria on the mother and fetus (7).

Based on these epidemiological patterns, the primary populations targeted for malaria vaccines are infants and young children in areas of moderate and high transmission, who bear the greatest burden of disease and death; and women of child-bearing age in these same areas. Malaria-naïve travelers and military troops would also benefit from a malaria vaccine. As more countries move toward malaria elimination and global eradication is considered (2), the general population of malaria-endemic areas may be vaccinated to drive down transmission (3, 5).

Both humoral and cellular factors contribute to acquired immune protection against malaria. Broadly speaking, cellular immune responses are thought to be more important in controlling the pre-erythrocytic stages of malaria infection, and antibodies are thought to block erythrocyte invasion to suppress blood-stage infection. For these reasons, cellular immune responses are typically emphasized more in the development of pre-erythrocytic vaccines and antibody responses in the development of blood-stage vaccines. However, the basis of protective immunity against malaria is poorly understood, and no specific immune response has been established as an essential correlate of clinical protection, complicating malaria vaccine development.

OBSTACLES TO MALARIA VACCINES

In addition to the lack of an immune correlate of protection that would permit down-selection of vaccine candidates before expensive efficacy trials, several other factors have impeded malaria vaccine development. Chief among these impediments are the size and plasticity of the *P. falciparum* genome, which has about 23 million bases of DNA organized into 14 chromosomes and about 5,000 genes (8). This is orders of magnitude larger than the genomes of most of the viruses and bacteria for which vaccines have been successfully developed. Through mechanisms that are poorly understood, many of these genes are differentially expressed during the various stages of the highly complex life cycle in vertebrate hosts and mosquitoes (Figure 1). Adding further complexity, mutation during mitotic reproduction in the haploid liver and blood stages and genetic recombination during the diploid sexual reproductive stages in the mosquito result in extensive genetic diversity that is driven by selection pressure from the immune system, as well as by drugs and, when they are deployed, potentially by vaccines (9). All of this complexity and diversity greatly complicates the choice of candidate antigens for vaccine development and raises doubt that monovalent single-antigen vaccines will provide broad cross-protection.

At least 18 different forms of one leading blood-stage antigen (10) and >200 variants of another (11) have been documented in a single African village. If vaccines targeting these antigens generate immune responses that are insufficiently cross-protective, vaccines based on just one or two genetic variants are unlikely to be broadly efficacious (9). To date, the choices of which variants of target antigens to include in malaria vaccines have not been made in consideration of the frequencies of these variants in natural populations. Careful molecular epidemiological studies are beginning to pinpoint which of the many polymorphisms in some of these antigens are the most important determinants of strain-specific natural immunity

(10, 11), and this approach may help inform the design of polyvalent or chimeric vaccines that protect against diverse parasite strains (9).

Immunization with stage-specific vaccines typically protects against only that life-cycle stage, hence the notion of vaccines that specifically prevent infection, disease, or transmission by targeting the different stages. A highly efficacious pre-erythrocytic vaccine would prevent not only infection but also disease and transmission (3); however, even a single surviving sporozoite could theoretically result in infection, disease, and transmission. This is because of the parasite's ability to multiply rapidly—one sporozoite gives rise to tens of thousands of merozoites, and each merozoite multiplies roughly tenfold in 48 h, quickly resulting in billions of parasites circulating in the body. The fully sterile protection that would be required to completely prevent infection is a dauntingly high bar for a vaccine to clear. However, the ability of a partially efficacious pre-erythrocytic vaccine to reduce the risk of clinical malaria illness (12) supports the idea that there is some benefit from slowing the rate of parasite reproduction short of complete prevention of blood-stage infection. A so-called “leaky vaccine,” perhaps better thought of as an injectable bednet, could be a valuable tool for malaria control.

Most successful vaccines prevent infection or illness with pathogens that naturally result in strong and long-lasting immune protection after a single exposure. As described above, naturally acquired protective immunity to malaria is hard-won and short-lived. An effective malaria vaccine will need to produce stronger and faster immune responses than those that develop under even the most intense, continuous natural exposure to malaria. A vaccine intended to prevent infection will need to surpass natural immunity, which gradually protects against clinical illness but does not completely prevent infection.

Finally, because the host immune response contributes to malaria pathogenesis, a vaccine could theoretically increase the risk of harmful inflammatory responses to subsequent infection, especially a vaccine directed against the

AS01: Adjuvant System 01, a proprietary adjuvant system from GlaxoSmithKline Biologicals

CSP: circumsporozoite protein of *P. falciparum*, a pre-erythrocytic vaccine target

Challenge trial: small, experimental phase II/III clinical trial in which healthy volunteers receive a malaria vaccine and are exposed to the bites of malaria-infected mosquitoes or injected with malaria parasites under carefully controlled conditions

Subunit vaccine: a vaccine based on a small portion of the organism, usually a peptide or protein

Immunogenicity: the ability of a vaccine to produce specific immune responses (usually antibodies) that recognize the vaccine antigen

blood stages responsible for pathology. Vigilance for untoward inflammatory responses to malaria vaccines or to postvaccination malaria infection is an important aspect of clinical malaria vaccine development, especially for blood-stage vaccines.

TYPES OF MALARIA VACCINES

Pre-Erythrocytic Vaccines

The vaccine furthest in clinical development, RTS,S/AS01, targets the pre-erythrocytic circumsporozoite protein (CSP) of *P. falciparum*. CSP contains a central repeat region that elicits antibody responses (13), flanked on each side by nonrepetitive regions containing T cell epitopes (14). Antibodies directed against the central repeat region cause the protein coat to slough off and block invasion of hepatocytes, suggesting that vaccine-induced antibodies might prevent infection (15). RTS,S is composed of the central repeat region (R) and T cell epitopes (T) of CSP using the hepatitis B surface antigen (S) as a carrier matrix. It is coexpressed in *Saccharomyces cerevisiae* with additional S, hence “RTS,S.” The clinical development of RTS,S has included progressive improvements in adjuvant systems, resulting in improved efficacy both in challenge trials (16, 17) and in clinical trials in malaria-exposed adults (18) and children (12, 19). The current formulation includes the liposomal-based Adjuvant System AS01, which contains the immunostimulants monophosphoryl lipid A and QS21, a saponin derivative extracted from the bark of the South American soap bark tree *Quillaja saponaria*. The development of RTS,S supports the notion that strong adjuvants are necessary for an efficacious subunit vaccine for malaria.

RTS,S was the first malaria vaccine to demonstrate meaningful levels of clinical protection in field trials. Trials in children and infants who are naturally exposed to malaria have demonstrated efficacy in the range of 30%–56% against clinical disease and up to 66% against infection, and a good record of

safety and tolerability (12, 19). A phase II trial in 1,465 Mozambican children showed 26% efficacy against all malaria episodes over nearly four years, 32% against a first or only episode of clinical malaria, and 38% in preventing severe clinical episodes (20). After 45 months, the prevalence of parasitemia was significantly lower in vaccinees than in the control group (12% versus 19%). The magnitude of the protective effect after nearly four years was thus modest, but importantly, there was no evidence of a postimmunization “rebound” effect—a theoretical concern that the vaccine might interfere with the natural acquisition of protective immunity.

Based on these demonstrations of a level of efficacy that is well below levels of protection expected for vaccines against other common pathogens but rare good news for malaria vaccines, RTS,S/AS01 is currently being evaluated in a large phase III trial of 16,000 children and infants in seven African countries. Early results of the phase III trial suggest similar efficacy to that seen in phase II trials. The cost-effectiveness of licensing and deploying a malaria vaccine with efficacy in the range of 25%–50% is debated, but where the malaria burden remains high, as in much of sub-Saharan Africa, such a vaccine is likely to be sought and used. Strategies being investigated to improve the efficacy of RTS,S/AS01 include adding antigens tested with the same adjuvant system to create a multi-stage, multi-antigen RTS,S-based vaccine (21) and priming with an adenovirus expressing CSP before boosting with RTS,S/AS01 (22).

Several other pre-erythrocytic vaccine candidates have progressed through preclinical and early clinical development (23), including recombinant subunit-protein vaccines as well as DNA vaccines and viral-vectored vaccines (19). Even though some of these have generated seemingly good humoral and especially cellular immune responses when formulated with strong adjuvants (24), protective efficacy has not been achieved in clinical testing in humans. Prime–boost approaches using DNA vaccines or viral vectors have also resulted

in improved immunogenicity and sometimes measurable delays in time to infection in experimental sporozoite challenge trials (25). Although prime–boost vaccine strategies have failed to demonstrate meaningful protection in published clinical efficacy trials, recent unpublished reports are more promising, with ~25% sterile protection provided by DNA prime and viral-vector boost using both CSP and the blood-stage antigen AMA1 (T. Richie, personal communication). Efforts to improve these approaches to get more consistent cellular immune responses and higher levels of protection may be hampered by variability in host responses to vaccination. Other novel approaches, such as a self-assembling polypeptide nanoparticle CSP vaccine, are showing promise in preclinical testing (26). Mining of genomic and proteomic data has led to the identification of new pre-erythrocytic vaccine candidate proteins, some of which have shown promising results in animal models (27).

Blood-Stage Vaccines

Most blood-stage malaria vaccine candidates are based on antigens that coat the surface of the invasive merozoites and/or are involved in the process of erythrocyte invasion. The hope is that immunization with these antigens will generate antibodies that block invasion and curtail parasite replication in the blood, reducing the risk or severity of clinical illness. The merozoite surface protein 1, or MSP1, was the first and best characterized of many proteins on the merozoite surface that are being targeted for vaccine development. Naturally acquired antibodies to MSP1₁₉ inhibit erythrocyte invasion and are associated with protection from clinical malaria in field studies (28), supporting its potential as a vaccine candidate. An MSP1-based vaccine on the same adjuvant platform as RTS,S produced antibodies in Malian adults that recognized MSP1 from diverse strains of *P. falciparum* (29), but it had no protective efficacy against clinical malaria in Kenyan children (30). Comparison of the degree of homology with the vaccine strain of MSP1 sequences

in the infections experienced by children in the vaccine and control groups will clarify the extent to which the genetic diversity of MSP1 accounted for this lack of efficacy.

The apical membrane antigen 1, or AMA1, resides in the apical complex of the merozoite (31). AMA1 is thought to play a role in erythrocyte invasion (32), and it may play a similar role in hepatocyte invasion (33). Naturally acquired antibodies to AMA1 inhibit erythrocyte invasion in vitro (34) and are associated with protection in field studies (35). Studies in animal models show strain specificity in the inhibitory activity of anti-AMA1 antibodies (34), and these results have been corroborated by subsequent allelic exchange experiments (36, 37).

Sequencing of the gene encoding AMA1 in samples from a single Malian village identified >200 unique AMA1 variants in ~500 *P. falciparum* infections (11), raising the daunting prospect that a 200-valent AMA1 vaccine might be required to achieve broad protective efficacy. However, molecular epidemiological analyses showed that a group of just eight polymorphic amino acids lying adjacent to the presumed erythrocyte-binding site on AMA1 were responsible for strain-specific naturally acquired immunity, suggesting that a vaccine comprising as few as 10 “serotypes” of AMA1 might be sufficient to protect against 80% of unique variants.

Two AMA1 vaccines have reached the stage of efficacy trials in humans. A bivalent vaccine with two different forms of AMA1 adjuvanted with aluminum hydroxide failed to provide any protection against parasitemia or clinical malaria (38), and molecular analyses of pre- and postimmunization infections turned up no evidence of strain-specific efficacy or selection of nonvaccine variants (39). This disappointing result, following on the heels of the failure of MSP1-based and other blood-stage vaccines to protect against clinical malaria, contributed to a growing inclination to abandon subunit blood-stage vaccines altogether. However, a monovalent AMA1 vaccine formulated with the same adjuvant system as that used with RTS,S was more highly immunogenic (40)

in a similar population of African children. Although this vaccine did not prevent infection after experimental sporozoite challenge (41) and showed marginal overall efficacy against clinical malaria, it demonstrated strong strain-specific efficacy, reducing the risk of clinical malaria caused by parasites with AMA1 homologous to the vaccine strain by >60% (42). This encouraging result, along with a post hoc analysis of data from a phase Ib trial of a merozoite surface protein 3 blood-stage vaccine showing efficacy against clinical malaria (42a), reanimated the field of blood-stage malaria vaccines by suggesting that it may be possible to develop a more broadly efficacious multivalent or chimeric next-generation AMA1 vaccine. Efforts are now under way to do this (43, 44).

P. falciparum proteins that are expressed on the surface of infected erythrocytes, mediate cytoadherence and immune evasion, and contribute to pathogenesis would seem to be attractive candidates for antidiarrheal vaccines. These PfEMP1 proteins are encoded by a large family of diverse *var* genes (45) with up to 60 variants in each parasite genome. Designing a vaccine that would be broadly protective against such an extraordinarily polymorphic target is likely to be very difficult. One possible approach to overcome this difficulty may be the identification of conserved epitopes that are nevertheless immunogenic (46). Because a single PfEMP1 that is somewhat less polymorphic, VAR2CSA, mediates cytoadherence in placental malaria, prospects for a PfEMP1-based vaccine for placental malaria may be better, and research toward this goal is under way (47).

Multi-stage, multi-antigen vaccines that include blood-stage components are discussed in a subsequent section.

Transmission-Blocking Vaccines

Vaccines that are specifically intended to block transmission target molecules that are unique to gametocytes or to subsequent mosquito stages. Antibodies directed against such targets are capable of blocking the development of mosquito stages, thus interrupting trans-

mission (48). In a rare example of a vaccine designed to target multiple species, a vaccine based on mosquito-stage proteins in both *P. falciparum* and *P. vivax* was shown to produce dose-dependent antibody-mediated transmission-blocking activity (49). However, the vaccine, which was formulated with the powerful adjuvant Montanide ISA 51, was unacceptably reactogenic. With the recent renewed call for global malaria eradication (2), transmission-blocking vaccines will be increasingly emphasized. In one novel and promising approach, vaccines that target mosquito molecules are being contemplated in hopes of avoiding selection pressure within the host that favors “vaccine-resistant” parasites (50).

Although not traditionally thought of as transmission-blocking vaccines, highly efficacious pre-erythrocytic vaccines that provide sterile immunity would also interrupt transmission. In the context of malaria elimination, a highly efficacious pre-erythrocytic vaccine would thus be the product-development target for “vaccines that interrupt transmission” (5).

Multi-Stage, Multi-Antigen Vaccines

Compared to the viral and bacterial human pathogens for which effective vaccines exist, malaria parasites are big and complex and elicit equally complex and multifaceted immune responses. In retrospect, it may not be surprising that so many candidate vaccines that target a single variant of a single antigen have failed to demonstrate clinical efficacy, especially against heterologous natural challenge. Several attempts have been made to improve on the efficacy of single-antigen vaccines by developing multi-stage, multi-antigen vaccines. One of the earliest was SPf66, a synthetic vaccine consisting of peptides derived from the blood-stage antigen MSP1 linked by the central repeat of the pre-erythrocytic antigen CSP. Although reports of efficacy in initial trials in South America generated great excitement (51), subsequent studies in Africa and Asia showed no significant protective efficacy (52, 53). In another approach that yielded disappointing results, vaccinia

virus was used as a vector to express seven *P. falciparum* genes, but both immunogenicity and efficacy were limited (54). Attempts to develop DNA vaccines with *P. falciparum* genes (55), using up to 15 genes, were likewise unsuccessful.

Based on the modest efficacy of RTS,S against clinical malaria and evidence that a blood-stage vaccine using a similar adjuvant system can produce strain-specific efficacy, it is reasonable to attempt to construct a multi-stage, multi-antigen recombinant protein that improves on the efficacy of RTS,S (21).

Whole-Organism Vaccines

Even though live attenuated vaccines were the earliest and remain some of the best vaccines against other pathogens, and even though birds and monkeys had been protected by live attenuated malaria parasites in the earliest vaccine studies (56), the protection seen with irradiated sporozoites in the early 1970s (57) was interpreted not as a direct path to a malaria vaccine but as proof that a vaccine was possible, and as justification for the ensuing decades of research aimed at identifying the “right” vaccine antigen or heterologous expression system. The limited success of these Sisyphean research efforts led to reevaluation of the dogma that it would be impossible to manufacture an attenuated sporozoite vaccine in mosquitoes (58). A radiation-attenuated, metabolically active, nonreplicating sporozoite vaccine has been manufactured in and purified from aseptically raised mosquitoes and was recently evaluated for safety and efficacy in an experimental sporozoite challenge trial in humans (59). The goal was to administer by needle essentially the same immunogen—albeit aseptic, purified, and cryopreserved—that had previously demonstrated 90% protective efficacy in the form of sterilizing immunity when delivered by the bites of at least 1,000 irradiated infected mosquitoes. When administered by intradermal or subcutaneous routes, the sporozoite vaccine did not have significant protective efficacy (60). However, the vaccine sporozoites are highly immunogenic

in monkeys when administered intravenously but not subcutaneously (60). The likeliest explanation for this result is therefore thought to be that sporozoites delivered into the skin by needle injection in a comparatively large volume of fluid were unable to reach the liver with efficiency approaching that of sporozoites injected either by a mosquito probing for small blood vessels or intravenously.

The potential for this approach to yield a highly efficacious pre-erythrocytic whole-organism vaccine remains high. Efforts are under way to improve delivery methods to more closely approximate the probing mosquito’s efficient delivery of attenuated sporozoites into the circulation, starting with the intravenous route that is clearly superior in animal models. Strong adjuvants have been key to developing partially efficacious subunit malaria vaccines, and whole-parasite vaccine experiments in the 1940s likewise showed that adjuvants could boost protection; this will likely be tried with the sporozoite vaccine. Genetic attenuation of sporozoites as an alternative to radiation is also being explored (61), although insufficient attenuation and consequent breakthrough infection in an early trial have somewhat dampened enthusiasm for this approach. In a similar “back to the future” paradigm shift, attenuated whole-parasite blood-stage vaccines are now also back on the table (62) more than 60 years after this approach was shown to work in monkeys.

One side benefit to advances in the development of whole-organism vaccines is the availability of aseptically produced Good Manufacturing Practices–grade frozen sporozoites that can be used for experimental infections in challenge trials. In initial tests at the University of Maryland’s Center for Vaccine Development, intradermal injections of such sporozoites have been successfully used to infect humans (63), and injection of precise numbers of thawed sporozoites offers an attractive alternative to challenge by the bite of infectious mosquitoes, which can infect reliably but deliver unknown and variable numbers of sporozoites. With this enabling tool, experimental challenge trials for vaccines

Whole-organism vaccine: a vaccine based on an attenuated or killed whole parasite

as well as drugs may become routine not just at a few specialized centers with established insectaries, but at any malaria clinical trial facility, including those in malaria-endemic countries.

FUTURE DIRECTIONS

Malaria is transmitted in more than 100 countries. Even as about 30 of these are actively trying to eliminate malaria, it is generally agreed that global eradication is not possible without global economic development to the levels that permitted malaria elimination in the United States, Europe, and the former Soviet Union, and/or new tools such as a highly efficacious malaria vaccine that interrupts transmission (5). A powerfully adjuvanted pre-erythrocytic single-antigen recombinant protein vaccine, RTS,S/AS01, significantly reduces the clinical burden of malaria in African children (12, 19), but it does not prevent infection and, somewhat surprisingly, its effect on transmission (if any) has not been reported. The results of a field trial of a similarly adjuvanted blood-stage vaccine (42), as well as a combination of RTS,S with a viral vector in a prime–boost regimen (22), provide a strong rationale for pursuing improvements on RTS,S and similar vaccines, but the dire public health need for a highly efficacious malaria vaccine

calls for more than incremental improvements. Whole-parasite vaccines may be the radically different new (and yet very old) approach that is needed. Challenges remain in the production and delivery of such a vaccine, but none are insurmountable.

Many past and recent studies point to the importance of strong adjuvants for subunit vaccines as well as for whole-organism vaccines, and wide access to immunogenic and safe adjuvants will be important for accelerating malaria vaccine development. Researchers are focusing now on the elusive goal of achieving a high degree of efficacy, but the ideal vaccine would be not only safe and efficacious but also thermostable and protective for a long period of time after a single immunization. These characteristics will not be easy to achieve but might be possible through pharmaceutical technologies such as controlled-release formulations.

All predictions of when a malaria vaccine will be available have been overly optimistic, but barring unforeseen setbacks, a moderately efficacious vaccine that substantially reduces the malaria burden should be licensed within just a few years. This magnificent accomplishment will mark not the end of the road for malaria vaccine development but a critical milestone on the path toward the malaria vaccine that the world needs.

DISCLOSURE STATEMENT

The authors are not aware of any affiliations, memberships, funding, or financial holdings that might be perceived as affecting the objectivity of this review.

ACKNOWLEDGMENTS

C.V.P. is supported by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases of the U.S. National Institutes of Health, by the Doris Duke Charitable Foundation, and by the Howard Hughes Medical Institute. M.A.T. is supported by cooperative agreement U01AI065683 from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases and by grant D43TW001589 from the Fogarty International Center of the U.S. National Institutes of Health. The authors thank Kirsten Lyke, Matthew Laurens, Drissa Coulibaly, and Mark Travassos for critical reading of the manuscript. The authors acknowledge the U.S. Agency for International Development, the Walter Reed Army Institute of Research, GlaxoSmithKline Biologicals, Sanaria Inc., the U.S. Military Malaria Vaccine Program–Naval Medical Research Center, and the Malaria Research and Training Center of the University of Bamako, Mali, for collaboration on malaria vaccine trials.

LITERATURE CITED

1. World Health Organization, Roll Back Malaria Partnership. 2008. The global malaria action plan for a malaria free world. Available at <http://www.rbm.who.int/gmap/>. Accessed Aug. 17, 2011
2. Tanner M, de Savigny D. 2008. Malaria eradication back on the table. *Bull. World Health Organ.* 86:82
3. Plowe CV, Alonso P, Hoffman SL. 2009. The potential role of vaccines in the elimination of falciparum malaria and the eventual eradication of malaria. *J. Infect. Dis.* 200:1646–49
4. Henderson DA. 1999. Lessons from the eradication campaigns. *Vaccine* 17(Suppl. 3):S53–S55
5. malERA Consultative Group on Vaccines. 2011. A research agenda for malaria eradication: vaccines. *PLoS Med.* 8:e1000398
6. Su X, Heatwole VM, Wertheimer SP, et al. 1995. The large diverse gene family *var* encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* 82:89–100
7. Duffy PE. 2007. Plasmodium in the placenta: parasites, parity, protection, prevention and possibly preeclampsia. *Parasitology* 134:1877–81
8. Gardner MJ, Hall N, Fung E, et al. 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419:498–511
9. Takala SL, Plowe CV. 2009. Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming ‘vaccine resistant malaria’. *Parasite Immunol.* 31:560–73
10. Takala SL, Coulibaly D, Thera MA, et al. 2007. Dynamics of polymorphism in a malaria vaccine antigen at a vaccine-testing site in Mali. *PLoS Med.* 4:e93
11. Takala SL, Coulibaly D, Thera MA, et al. 2009. Extreme polymorphism in a vaccine antigen and risk of clinical malaria: implications for vaccine development. *Sci. Transl. Med.* 1:2ra5
12. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, et al. 2004. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* 364:1411–20
13. Ballou WR, Rothbard J, Wirtz RA, et al. 1985. Immunogenicity of synthetic peptides from circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Science* 228:996–99
14. Dame JB, Williams JL, McCutchan TF, et al. 1984. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 225:593–99
15. Hollingdale MR, Nardin EH, Tharavanij S, et al. 1984. Inhibition of entry of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies. *J. Immunol.* 132:909–13
16. Gordon DM, McGovern TW, Krzych U, et al. 1995. Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine. *J. Infect. Dis.* 171:1576–85
17. Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG, 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.* 336:86–91
18. Bojang KA, Milligan PJ, Pinder M, 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. *Lancet* 358:1927–34
19. Bejon P, Lusingu J, Olotu A, et al. 2008. Efficacy of RTS,S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age. *N. Engl. J. Med.* 359:2521–32
20. Sacarlal J, Aide P, Aponte JJ et al. 2009. Long-term safety and efficacy of the RTS,S/AS02A malaria vaccine in Mozambican children. *J. Infect. Dis.* 200:329–36
21. Heppner DG Jr., Kester KE, Ockenhouse CF, et al. 2005. Towards an RTS,S-based, multi-stage, multi-antigen vaccine against falciparum malaria: progress at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine* 23:2243–50
22. Stewart VA, McGrath SM, Dubois PM, et al. 2007. Priming with an adenovirus 35-circumsporozoite protein (CS) vaccine followed by RTS,S/AS01B boosting significantly improves immunogenicity to *Plasmodium falciparum* CS compared to that with either malaria vaccine alone. *Infect. Immun.* 75:2283–90
23. World Health Organization. 2010. Initiative for vaccine research: malaria vaccines. Available at http://www.who.int/vaccine_research/links/Rainbow/en/index.html. Accessed Aug. 17, 2011

24. Cummings JF, Spring MD, Schwenk RJ, et al. 2010. Recombinant liver stage antigen-1 (LSA-1) formulated with AS01 or AS02 is safe, elicits high titer antibody and induces IFN- γ /IL-2 CD4+ T cells but does not protect against experimental *Plasmodium falciparum* infection. *Vaccine* 28:5135–44
25. Hill AV, Reyes-Sandoval A, O'Hara G, et al. 2010. Prime-boost vectored malaria vaccines: progress and prospects. *Hum. Vaccin.* 6:78–83
26. Kaba SA, Brando C, Guo Q, et al. 2009. A nonadjuvanted polypeptide nanoparticle vaccine confers long-lasting protection against rodent malaria. *J. Immunol.* 183:7268–77
27. Bergmann-Leitner ES, Mease RM, De La Vega P, et al. 2010. Immunization with pre-erythrocytic antigen CelTOS from *Plasmodium falciparum* elicits cross-species protection against heterologous challenge with *Plasmodium berghei*. *PLoS ONE* 5:e12294
28. Riley EM, Allen SJ, Wheeler JG, et al. 1992. Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol.* 14:321–37
29. Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, et al. 2006. Safety and allele-specific immunogenicity of a malaria vaccine in Malian adults: results of a phase I randomized trial. *PLoS Clin. Trials* 1:e34
30. Ogutu BR, Apollo OJ, McKinney D, et al. 2009. Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in Western Kenya. *PLoS ONE* 4:e4708
31. Peterson MG, Marshall VM, Smythe JA, et al. 1989. Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Cell Biol.* 9:3151–54
32. Mitchell GH, Thomas AW, Margos G, et al. 2004. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect. Immun.* 72:154–58
33. Florens L, Washburn MP, Raine JD, et al. 2002. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* 419:520–26
34. Hodder AN, Crewther PE, Anders RF. 2001. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. *Infect. Immun.* 69:3286–94
35. Polley SD, Mwangi T, Kocken CH, et al. 2004. Human antibodies to recombinant protein constructs of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. *Vaccine* 23:718–28
36. Dutta S, Lee SY, Batchelor AH, et al. 2007. Structural basis of antigenic escape of a malaria vaccine candidate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:12488–93
37. Healer J, Murphy V, Hodder AN, et al. 2004. Allelic polymorphisms in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* 52:159–68
38. Sagara I, Dicko A, Ellis RD, et al. 2009. A randomized controlled phase 2 trial of the blood stage AMA1-C1/Alhydrogel malaria vaccine in children in Mali. *Vaccine* 27:3090–98
39. Ouattara A, Mu J, Takala-Harrison S, et al. 2010. Lack of allele-specific efficacy of a bivalent AMA1 malaria vaccine. *Malar. J.* 9:175
40. Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, et al. 2010. Safety and immunogenicity of an AMA1 malaria vaccine in Malian children: results of a phase 1 randomized controlled trial. *PLoS ONE* 5:e9041
41. Spring MD, Cummings JF, Ockenhouse CF, et al. 2009. Phase 1/2a study of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen-1 (AMA-1) administered in adjuvant system AS01B or AS02A. *PLoS ONE* 4:e5254
42. Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, et al. 2011. A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. *N. Engl. J. Med.* 365:1004–13
- 42a. Sirima SB, Cousens S, Druilhe P. 2011. Protection against malaria by MSP3 candidate vaccine. *N. Engl. J. Med.* 365:1062–64
43. Remarque EJ, Faber BW, Kocken CH, et al. 2008. A diversity-covering approach to immunization with *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 induces broader allelic recognition and growth inhibition responses in rabbits. *Infect. Immun.* 76:2660–70
44. Dutta S, Długosz LS, Clayton JW, et al. 2010. Alanine mutagenesis of the primary antigenic escape residue cluster, c1, of apical membrane antigen 1. *Infect. Immun.* 78:661–71

45. Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, et al. 1995. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* 82:101–10
46. Klein MM, Gittis AG, Su HP et al. 2008. The cysteine-rich interdomain region from the highly variable *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 exhibits a conserved structure. *PLoS Pathog.* 4:e1000147
47. Avril M, Cartwright MM, Hathaway MJ, et al. 2010. Immunization with VAR2CSA-DBL5 recombinant protein elicits broadly cross-reactive antibodies to placental *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Infect. Immun.* 78:2248–56
48. Barr PJ, Green KM, Gibson HL, et al. 1991. Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in experimental animals. *J. Exp. Med.* 174:1203–8
49. Wu Y, Ellis RD, Shaffer D, et al. 2008. Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. *PLoS ONE* 3:e2636
50. Dinglasan RR, Valenzuela JG, Azad AF. 2005. Sugar epitopes as potential universal disease transmission blocking targets. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35:1–10
51. Valero MV, Amador LR, Galindo C, et al. 1993. Vaccination with SPf66, a chemically synthesised vaccine, against *Plasmodium falciparum* malaria in Colombia. *Lancet* 341:705–10
52. D'Alessandro U, Leach A, Drakeley CJ, et al. 1995. Efficacy trial of malaria vaccine SPf66 in Gambian infants. *Lancet* 346:462–67
53. Alonso PL, Smith T, Schellenberg JR, et al. 1994. Randomised trial of efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Lancet* 344:1175–81
54. Ockenhouse CF, Sun PF, Lanar DE, et al. 1998. Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.* 177:1664–73
55. Kumar S, Epstein JE, Richie TL, et al. 2002. A multilateral effort to develop DNA vaccines against falciparum malaria. *Trends Parasitol.* 18:129–35
56. Freund J, Thomson KJ, Sommer HE, et al. 1945. Immunization of rhesus monkeys against malarial infection (*P. knowlesi*) with killed parasites and adjuvants. *Science* 102:202–4
57. Clyde DF, Most H, McCarthy VC, et al. 1973. Immunization of man against sporozite-induced falciparum malaria. *Am. J. Med. Sci.* 266:169–77
58. Luke TC, Hoffman SL. 2003. Rationale and plans for developing a non-replicating, metabolically active, radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *J. Exp. Biol.* 206:3803–8
59. Hoffman SL, Billingsley PF, James E, et al. 2010. Development of a metabolically active, non-replicating sporozoite vaccine to prevent *Plasmodium falciparum* malaria. *Hum. Vaccin.* 6:97–106
60. Epstein JE, Tweari K, Lyke KE, et al. 2011. Live attenuated malaria vaccine designed to protect through hepatic D8+ T cell immunity. *Science* 334:475–80
61. VanBuskirk KM, O'Neill MT, De La Vega P, et al. 2009. Preerythrocytic, live-attenuated *Plasmodium falciparum* vaccine candidates by design. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 106:13004–9
62. McCarthy JS, Good MF. 2010. Whole parasite blood stage malaria vaccines: a convergence of evidence. *Hum. Vaccin.* 6:114–23
63. Lyke KE, Laurens M, Adams M, et al. 2010. *Plasmodium falciparum* malaria challenge by the bite of aseptic *Anopheles stephensi* mosquitoes: results of a randomized infectivity trial. *PLoS ONE.* 5:e13490

5 Discussion des Résultats, Perspectives et Analyse du développement des vaccins antipaludiques

Le paludisme est encore endémique dans plus de 100 pays. Dans une trentaine de ces pays, des efforts en vue de l'élimination et /ou de l'éradication sont activement mis en œuvre. Toutefois, à l'échelle globale, l'éradication du paludisme exigera des outils meilleurs que ceux qui existent aujourd'hui. Un vrai développement économique des pays d'endémie sera aussi nécessaire. Le développement économique a favorisé l'élimination du paludisme dans les pays où l'environnement était moins propice à la biologie du vecteur, par exemple aux États-Unis d'Amérique et en Europe. Aujourd'hui l'essentiel de la charge de morbidité liée au paludisme se rencontre en Afrique, en Amérique du Sud, en Asie, dans les pays en développement mais surtout dans les pays où l'environnement éco géographique est particulièrement propice à la biologie du vecteur. Plus qu'ailleurs, dans ces pays, l'éradication du paludisme exigera de meilleurs et de nouveaux outils. Il sera nécessaire d'acquérir une connaissance plus approfondie des interactions hôtes-vecteurs. Les chercheurs des pays endémiques devront apporter une contribution importante. L'outil vaccinal est donc attendu.

Les promesses d'un seul antigène associé à un adjuvant puissant ont ouvert la voie à une recherche vaccinale active et quasi planétaire. Il faut cependant garder l'esprit critique et reconnaître avec l'OMS que le candidat vaccin antipaludique RTS,S/AS01 représente une étape vers un vaccin antipaludique efficace et conforme à la feuille de route technologique (http://www.who.int/immunization/topics/malaria/vaccine_roadmap/en/). Une étape certes d'importance capitale, mais une étape au-delà de laquelle nous devons apprendre à rester mobilisés, et éviter les erreurs du passé.

Si RTS,S devient le premier vaccin antipaludique disponible sur le marché, il est probable qu'il deviendra le comparateur recommandé dans les futures évaluations de vaccins antipaludiques de certaines phases. En plus, dans les zones où ce vaccin aura été déployé, un essai vaccinal contre placebo deviendra peu défendable du point de vue éthique. Cela pourrait entraîner la nécessité d'augmenter les tailles d'échantillons au cours de ces essais vaccinaux futurs. Il pourrait en résulter, une plus grande complexité dans le design de ces études et aussi un coût de réalisation plus élevé.

Les progrès remarquables de l'approche du sporozoïte ouvrent non seulement la voie à un candidat vaccin prometteur, mais aussi par le biais du CHMI à un outil d'évaluation

formidable. Il est probable que l'évaluation de la preuve du concept d'efficacité en CHMI deviendra une étape critique du développement clinique des futurs candidats vaccins antipaludiques, avant les essais sur le terrain en pays endémique. Le potentiel des organismes entiers de stade sanguin reste encore inexploité. Cette voie garde un potentiel extraordinaire, car elle pourrait générer un vaccin parfait pour interrompre la transmission.

Nous avons montré que le candidat vaccin FMP2.1/AS02A a induit une efficacité protectrice spécifique d'allèle. Nous avons analysé les allèles d'AMA1 qui ont contribué à la protection observée. Parmi les séquences des 8 aminoacides au niveau de c1L et définies par Dutta *et al.*, 2007 (100), et dont Takala *et al.*, 2009, a montré l'association avec la survenue de paludisme maladie (36), nous avons trouvé que celles qui sont similaires à 3D7 étaient associées à la protection. L'acide aminé en position 197 suffisait seul à identifier la similarité avec c1L 3D7 et apparaissait dans nos données comme la position clef à introduire dans un antigène vaccinal conférant la protection contre plusieurs allèles (213).

D'autres approches permettant de couvrir la diversité allélique d'AMA1 ont été proposées. Une face d'AMA1 est conservée. Elle est probablement accolée à la surface du mérozoïte et reste protégée de l'interaction avec le système immunitaire. La découverte d'un épitope conservé à ce niveau mais capable de réagir avec un anticorps monoclonal et d'induire une inhibition forte est une voie d'investigation intéressante (104). Une autre approche consiste à couvrir plutôt l'éventail de la variabilité d'AMA1, en utilisant le lien entre les sites polymorphiques et en fabriquant une protéine chimérique à partir de gène synthétique (101). Le produit proposé a commencé son cycle de développement clinique récemment. Une meilleure compréhension de la biologie de l'invasion de l'érythrocyte a permis d'identifier la possibilité de bloquer spécifiquement l'interaction AMA1-RON2 (103;214), donnant une autre piste prometteuse de recherche vaccinale.

Plus récemment l'identification de la basigine, ligand érythrocytaire, d'une protéine d'adhésion la PfRH5 parasite, ouvre davantage le champ des espoirs d'un vaccin de stade sanguin donnant une protection croisée. PfRH5 est un antigène essentiel au parasite et les anticorps monoclonaux qui le ciblent peuvent inhiber *in vitro* la croissance des plasmodies homologues et hétérologues. L'identification de la basigine a été possible grâce à l'utilisation de bibliothèques informatiques de séquences de protéines exprimées au niveau de l'érythrocyte et illustre une des façons par laquelle les sciences "Omiques" influenceront la recherche du vaccin antipaludique. La compréhension plus intime de la biologie du parasite et de ses

interactions au niveau moléculaire avec l'érythrocyte peut apporter encore beaucoup d'informations et contribuer à la mise au point des vaccins antipaludiques de 2^{ème} et de 3^{ème} génération.

La question de comprendre la protection immunitaire naturellement acquise (INA) et d'essayer de la reproduire ou d'essayer d'abord de mettre en action des mécanismes immunitaires que *P. falciparum* ne déclenche pas de façon naturelle, ne doit plus se poser. La compréhension des mécanismes de l'INA permet justement de comprendre les interactions hôtes-parasites et de proposer des vaccins auxquels le parasite ne pourra pas échapper. En ce sens le travail des immunologistes africains qui s'efforcent de comprendre en quoi les individus dans différents pays d'Afrique diffèrent dans leurs réponses immunitaires au paludisme constitue une grande opportunité. Le travail effectué au Kenya, contribue à remettre en selle certains antigènes de stades sanguins et en à définir de nouveaux (130). L'approche des vecteurs viraux adoptée par certains groupes porte le potentiel d'induire des réponses cellulaires fortes qui peuvent bloquer l'infection déjà au stade hépatique. Mais compte tenu de la complexité génétique et biologique des plasmodies, il est plus prudent de multiplier les approches et les directions de recherche d'un vaccin antipaludique. Il est possible que le vaccin antipaludique efficace soit finalement un cocktail multi stades, multi allèles et multi antigènes.

6 Autres articles de l'impétrant en relation avec le thème

1: Laurens MB, Thera MA, Coulibaly D, Ouattara A, Kone AK, Guindo AB, Traore K, Traore I, Kouriba B, Diallo DA, Diarra I, Daou M, Dolo A, Tolo Y, Sissoko MS, Niangaly A, Sissoko M, Takala-Harrison S, Lyke KE, Wu Y, Blackwelder WC, Godeaux O, Vekemans J, Dubois MC, Ballou WR, Cohen J, Dube T, Soisson L, Diggs CL, House B, Bennett JW, Lanar DE, Dutta S, Heppner DG, Plowe CV, Doumbo OK. Extended safety, immunogenicity and efficacy of a blood-stage malaria vaccine in malian children: 24-month follow-up of a randomized, double-blinded phase 2 trial. *PLoS One*. 2013 Nov 18;8(11):e79323. PubMed PMID: 24260195; PubMed Central PMCID: PMC3832522.

2: Ouattara A, Takala-Harrison S, Thera MA, Coulibaly D, Niangaly A, Saye R, Tolo Y, Dutta S, Heppner DG, Soisson L, Diggs CL, Vekemans J, Cohen J, Blackwelder WC, Dube T, Laurens MB, Doumbo OK, Plowe CV. Molecular basis of allele-specific efficacy of a blood-stage malaria vaccine: vaccine development implications. *J Infect Dis*. 2013 Feb 1;207(3):511-9. doi: 10.1093/infdis/jis709. Epub 2012 Nov 29. PubMed PMID: 23204168; PubMed Central PMCID: PMC3537449.

3: Nyika A, Chilengi R, Ishengoma D, Mtenga S, Thera MA, Sissoko MS, Lusingu J, Tiono AB, Doumbo O, Sirima SB, Lemnge M, Kilama WL. Engaging diverse communities participating in clinical trials: case examples from across Africa. *Malar J*. 2010 Mar 26;9:86. PubMed PMID: 20346126; PubMed Central PMCID: PMC2907873.

4: Takala SL, Coulibaly D, Thera MA, Batchelor AH, Cummings MP, Escalante AA, Ouattara A, Traoré K, Niangaly A, Djimdé AA, Doumbo OK, Plowe CV. Extreme polymorphism in a vaccine antigen and risk of clinical malaria: implications for vaccine development. *Sci Transl Med*. 2009 Oct 14;1(2):2ra5. PubMed PMID: 20165550; PubMed Central PMCID: PMC2822345.

5: Doumbo OK, Djimde AA, Thera MA. [Development of anti-malarial vaccines and need for clinical trials in accordance with international standards in Africa South of Sahara]. *Bull Soc Pathol Exot*. 2008 Jun;101(3):249-53. French. PubMed PMID: 18681219.

7 Conclusion

Le présent travail s'inscrit dans le contexte du développement clinique d'un vaccin de stade sanguin contre le paludisme. Les résultats des différentes études montrent que le candidat vaccin FMP2.1/AS02_A était bien toléré. Les EIs observés, temporaires en général, disparaissaient 7 jours après la vaccination. Le candidat vaccin a en outre induit une forte réponse immunitaire humorale. Enfin le candidat vaccin a montré une protection spécifique d'allèle contre l'épisode clinique de paludisme. Cette efficacité spécifique d'allèle, limite sa portée comme vaccin antipaludique. Les données collectées pendant l'essai de phase 2b ont alimenté une réflexion scientifique féconde sous la forme d'échanges entre les investigateurs du Mali et ceux du Maryland. Pendant longtemps encore ces données contribueront à faire avancer le champ de la recherche du vaccin antipaludique. Le développement clinique de FMP2.1/AS02_A illustre une contribution capitale du terrain : la prise en compte de l'épidémiologie moléculaire dans le design et la fabrication des antigènes vaccinaux. La circulation de l'information ne vient pas seulement des laboratoires américains vers le terrain à Bandiagara. Mais un mouvement inverse tout aussi fécond s'effectue du terrain vers les laboratoires américains. Dans notre cas cela a permis de fabriquer une nouvelle génération de candidat vaccins de stade sanguins.

Les progrès réalisés en biologie, en génétique et en sciences "Omiques", devraient contribuer à la mise au point d'un vaccin antipaludique efficace même si la voie pour y parvenir demeure encore longue.

8 Références

- (1) WHO. World Malaria Report 2011. Geneva: 2011.
- (2) Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D et al. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2012 February 4;379(9814):413-31.
- (3) Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J et al. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* 2004 October 16;364(9443):1411-20.
- (4) A research agenda for malaria eradication: health systems and operational research. *PLoS Med* 2011;8(1):e1000397.
- (5) A research agenda for malaria eradication: vector control. *PLoS Med* 2011;8(1):e1000401.
- (6) A research agenda for malaria eradication: vaccines. *PLoS Med* 2011;8(1):e1000398.
- (7) A research agenda for malaria eradication: basic science and enabling technologies. *PLoS Med* 2011;8(1):e1000399.
- (8) A research agenda for malaria eradication: diagnoses and diagnostics. *PLoS Med* 2011;8(1):e1000396.
- (9) A research agenda for malaria eradication: monitoring, evaluation, and surveillance. *PLoS Med* 2011;8(1):e1000400.
- (10) A research agenda for malaria eradication: drugs. *PLoS Med* 2011;8(1):e1000402.
- (11) A research agenda for malaria eradication: modeling. *PLoS Med* 2011;8(1):e1000403.
- (12) A research agenda for malaria eradication: cross-cutting issues for eradication. *PLoS Med* 2011;8(1):e1000404.
- (13) Nussenzweig RS, Vanderberg J, Most H, Orton C. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature* 1967 October 14;216(5111):160-2.
- (14) Clyde DF. Immunization of man against falciparum and vivax malaria by use of attenuated sporozoites. *Am J Trop Med Hyg* 1975 May;24(3):397-401.
- (15) Rieckmann KH. Human immunization with attenuated sporozoites. *Bull World Health Organ* 1990;68 Suppl:13-6.

- (16) Herrington DA, Clyde DF, Losonsky G, Cortesia M, Murphy JR, Davis J et al. Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Nature* 1987 July 16;328(6127):257-9.
- (17) Patarroyo ME, Romero P, Torres ML, Clavijo P, Moreno A, Martinez A et al. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature* 1987 August 13;328(6131):629-32.
- (18) Patarroyo ME, Amador R, Clavijo P, Moreno A, Guzman F, Romero P et al. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 1988 March 10;332(6160):158-61.
- (19) Graves P, Gelband H. Vaccines for preventing malaria (SPf66). *Cochrane Database Syst Rev* 2006;(2):CD005966.
- (20) Nosten F, Luxemburger C, Kyle DE, Ballou WR, Wittes J, Wah E et al. Randomised double-blind placebo-controlled trial of SPf66 malaria vaccine in children in northwestern Thailand. Shoklo SPf66 Malaria Vaccine Trial Group. *Lancet* 1996 September 14;348(9029):701-7.
- (21) Alonzo PL, Smith T, Schellenberg JR, Masanja H, Mwankusye S, Urassa H et al. Randomised trial of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Med Trop (Mars)* 1995;55(4 Suppl):41-6.
- (22) D'Alessandro U, Leach A, Drakeley CJ, Bennett S, Olaleye BO, Fegan GW et al. Efficacy trial of malaria vaccine SPf66 in Gambian infants. *Lancet* 1995 August 19;346(8973):462-7.
- (23) Wilby KJ, Lau TT, Gilchrist SE, Ensom MH. Mosquirix (RTS,S): A Novel Vaccine for the Prevention of *Plasmodium falciparum* Malaria (March). *Ann Pharmacother* 2012 March 6.
- (24) Agnandji ST, Lell B, Soulanoudjingar SS, Fernandes JF, Abossolo BP, Conzelmann C et al. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med* 2011 November 17;365(20):1863-75.
- (25) Agnandji ST, Lell B, Fernandes JF, Abossolo BP, Methogo BG, Kabwende AL et al. A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N Engl J Med* 2012 December 13;367(24):2284-95.
- (26) Bejon P, Lusingu J, Olotu A, Leach A, Lievens M, Vekemans J et al. Efficacy of RTS,S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age. *N Engl J Med* 2008 December 11;359(24):2521-32.
- (27) Gardner MJ, Shallom SJ, Carlton JM, Salzberg SL, Nene V, Shoaibi A et al. Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 2, 10, 11 and 14. *Nature* 2002 October 3;419(6906):531-4.
- (28) Peterson MG, Marshall VM, Smythe JA, Crewther PE, Lew A, Silva A et al. Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol* 1989 July;9(7):3151-4.

- (29) Kennedy MC, Wang J, Zhang Y, Miles AP, Chitsaz F, Saul A et al. In vitro studies with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1): production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response. *Infect Immun* 2002 December;70(12):6948-60.
- (30) Deans JA, Knight AM, Jean WC, Waters AP, Cohen S, Mitchell GH. Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. *Parasite Immunol* 1988 September;10(5):535-52.
- (31) Anders RF, Crewther PE, Edwards S, Margetts M, Matthew ML, Pollock B et al. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. *Vaccine* 1998 January;16(2-3):240-7.
- (32) Cortes A, Mellombo M, Masciantonio R, Murphy VJ, Reeder JC, Anders RF. Allele specificity of naturally acquired antibody responses against *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infect Immun* 2005 January;73(1):422-30.
- (33) Thomas AW, Trape JF, Rogier C, Goncalves A, Rosario VE, Narum DL. High prevalence of natural antibodies against *Plasmodium falciparum* 83-kilodalton apical membrane antigen (PF83/AMA-1) as detected by capture-enzyme-linked immunosorbent assay using full-length baculovirus recombinant PF83/AMA-1. *Am J Trop Med Hyg* 1994 December;51(6):730-40.
- (34) Volkman SK, Barry AE, Lyons EJ, Nielsen KM, Thomas SM, Choi M et al. Recent origin of *Plasmodium falciparum* from a single progenitor. *Science* 2001 July 20;293(5529):482-4.
- (35) Freitas-Junior LH, Hernandez-Rivas R, Ralph SA, Montiel-Condado D, Ruvalcaba-Salazar OK, Rojas-Meza AP et al. Telomeric heterochromatin propagation and histone acetylation control mutually exclusive expression of antigenic variation genes in malaria parasites. *Cell* 2005 April 8;121(1):25-36.
- (36) Takala SL, Coulibaly D, Thera MA, Batchelor AH, Cummings MP, Escalante AA et al. Extreme polymorphism in a vaccine antigen and risk of clinical malaria: implications for vaccine development. *Sci Transl Med* 2009 October 14;1(2):2ra5.
- (37) Singh B, Kim SL, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 2004 March 27;363(9414):1017-24.
- (38) Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Malar J* 2014;13:68.
- (39) Obonyo CO, Vulule J, Akhwale WS, et al. In-Hospital Morbidity and Mortality Due to Severe Malarial Anemia in Western Kenya. In: Breman JG AMWN, editor. *Defining and Defeating the Intolerable Burden of Malaria III: Progress and Perspectives: Supplement to Volume 77(6) of American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene ed. Northbrook (IL): 2007.
- (40) Walker PG, Ter Kuile FO, Garske T, Menendez C, Ghani AC. Estimated risk of placental infection and low birthweight attributable to *Plasmodium falciparum*

malaria in Africa in 2010: a modelling study. *Lancet Glob Health* 2014 August;2(8):e460-e467.

- (41) Ngoungou EB, Poudiougou B, Dulac O, Dicko A, Boncoeur MP, Traore AM et al. [Persistent neurological sequelae due to cerebral malaria in a cohort of children from Mali]. *Rev Neurol (Paris)* 2007 May;163(5):583-8.
- (42) Thuilliez J, Sissoko MS, Toure OB, Kamate P, Berthelemy JC, Doumbo OK. Malaria and primary education in Mali: a longitudinal study in the village of Doneguebougou. *Soc Sci Med* 2010 July;71(2):324-34.
- (43) Sicuri E, Vieta A, Lindner L, Constenla D, Sauboin C. The economic costs of malaria in children in three sub-Saharan countries: Ghana, Tanzania and Kenya. *Malar J* 2013;12:307.
- (44) Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P. Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol* 2007 May;9(5):1215-22.
- (45) Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS et al. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science* 2001 January 5;291(5501):141-4.
- (46) Mota MM, Giordano S, Rodriguez A. Targeting Plasmodium host cells: survival within hepatocytes. *Trends Mol Med* 2004 October;10(10):487-92.
- (47) Tavares J, Formaglio P, Thiberge S, Mordelet E, Van RN, Medvinsky A et al. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *J Exp Med* 2013 May 6;210(5):905-15.
- (48) Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Fontenille D, Ravaonjanahary C, Richard A. et al. Typologie du paludisme en Afrique. *Cahiers Santé* 1993;3:220-38.
- (49) Carnevale P., Robert V., Molez -F., Baudon D. Faciès épidémiologique des paludismes en Afrique sub-saharienne. *Etudes Médicales* 1984;3:123-33.
- (50) Baudon D, Louis FJ, Martet G. [In Africa, urban malaria is the malaria of tomorrow]. *Med Trop (Mars)* 1996;56(4):323-5.
- (51) Evans AG, Wellems TE. Coevolutionary genetics of Plasmodium malaria parasites and their human hosts. *Integr Comp Biol* 2002 April;42(2):401-7.
- (52) Rogier C, Tall A, Diagne N, Fontenille D, Spiegel A, Trape JF. *Plasmodium falciparum* clinical malaria: lessons from longitudinal studies in Senegal. *Parassitologia* 1999 September;41(1-3):255-9.
- (53) Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K, Newbold C. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med* 1999 March;5(3):340-3.
- (54) Polley SD, Tetteh KK, Lloyd JM, Akpogheneta OJ, Greenwood BM, Bojang KA et al. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 is a target of allele-specific

- immunity and alleles are maintained by natural selection. *J Infect Dis* 2007 January 15;195(2):279-87.
- (55) Roussilhon C, Oeuvray C, Muller-Graf C, Tall A, Rogier C, Trape JF et al. Long-term clinical protection from falciparum malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3. *PLoS Med* 2007 November 13;4(11):e320.
- (56) Cohen S, McGregor IA, Carrington S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 1961 November 25;192:733-7.
- (57) Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1991 September;45(3):297-308.
- (58) Mitchell GH, Butcher GA, Cohen S. Merozoite vaccination against *Plasmodium knowlesi* malaria. *Immunology* 1975 August;29(2):397-407.
- (59) Russell PF, Mohan BN. The immunization of fowls against mosquito-borne *Plasmodium gallinaceum* by injections of serum and of inactivated homologous sporozoites. *J Exp Med* 1942 November 1;76(5):477-95.
- (60) Clyde DF, Most H, McCarthy VC, Vanderberg JP. Immunization of man against sporozoite-induced falciparum malaria. *Am J Med Sci* 1973 September;266(3):169-77.
- (61) Egan JE, Hoffman SL, Haynes JD, Sadoff JC, Schneider I, Grau GE et al. Humoral immune responses in volunteers immunized with irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Am J Trop Med Hyg* 1993 August;49(2):166-73.
- (62) Hoffman SL, Goh LM, Luke TC, Schneider I, Le TP, Doolan DL et al. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis* 2002 April 15;185(8):1155-64.
- (63) Freund J, Sommer HE, Walter AW. Immunization against malaria: vaccination of ducks with killed parasites incorporated with adjuvants. *Science* 1945 August 24;102(2643):200-2.
- (64) Freund J, Thomson KJ, Sommer HE, Walter AW, Schenkein EL. Immunization of Rhesus monkeys against malarial infection (*P. knowlesi*) with killed parasites and adjuvants. *Science* 1945 August 24;102(2643):202-4.
- (65) Vincke IH, Lips M. [Un nouveau plasmodium d'un rongeur sauvage du Congo: *Plasmodium berghei*.]. *Ann Soc Belg Med Trop* (1920) 1948 March;28(1):97-104.
- (66) Vanderberg JP, Yoeli M. Effects of temperature on sporogonic development of *Plasmodium berghei*. *J Parasitol* 1966 June;52(3):559-64.
- (67) Nussenzweig RS, Vanderberg J, Spitalny GL, Rivera CI, Orton C, Most H. Sporozoite-induced immunity in mammalian malaria. A review. *Am J Trop Med Hyg* 1972 September;21(5):722-8.

- (68) Epstein JE, Rao S, Williams F, Freilich D, Luke T, Sedegah M et al. Safety and clinical outcome of experimental challenge of human volunteers with *Plasmodium falciparum*-infected mosquitoes: an update. *J Infect Dis* 2007 July 1;196(1):145-54.
- (69) Church LW, Le TP, Bryan JP, Gordon DM, Edelman R, Fries L et al. Clinical manifestations of *Plasmodium falciparum* malaria experimentally induced by mosquito challenge. *J Infect Dis* 1997 April;175(4):915-20.
- (70) Bejon P, Andrews L, Andersen RF, Dunachie S, Webster D, Walther M et al. Calculation of liver-to-blood inocula, parasite growth rates, and preerythrocytic vaccine efficacy, from serial quantitative polymerase chain reaction studies of volunteers challenged with malaria sporozoites. *J Infect Dis* 2005 February 15;191(4):619-26.
- (71) Hermsen CC, de Vlas SJ, van Gemert GJ, Telgt DS, Verhage DF, Sauerwein RW. Testing vaccines in human experimental malaria: statistical analysis of parasitemia measured by a quantitative real-time polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 2004 August;71(2):196-201.
- (72) Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976 August 20;193(4254):673-5.
- (73) Berg P, Mertz JE. Personal reflections on the origins and emergence of recombinant DNA technology. *Genetics* 2010 January;184(1):9-17.
- (74) Human genomes, public and private. *Nature* 2001 February 15;409(6822):745.
- (75) Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002 October 3;419(6906):498-511.
- (76) Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR et al. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 2002 October 4;298(5591):129-49.
- (77) Martin LB, Sauerwein RW, Bousema T, Lanar D, Richie T. Malaria Vaccines in Clinical Development: Introduction and Recombinant/Subunit Approaches. In: Myron M Levine, Gordon Dougan, Michael F Good, Margaret A Liu, Gary J Nabel, James P Nataro et al., editors. *New Generation Vaccines*. Informa Healthcare USA Inc ed. New York: 2010. p. 746-73.
- (78) Good MF, Miller LH, Kumar S, Quakyi IA, Keister D, Adams JH et al. Limited immunological recognition of critical malaria vaccine candidate antigens. *Science* 1988 October 28;242(4878):574-7.
- (79) Coler RN, Carter D, Friede M, Reed SG. Adjuvants for malaria vaccines. *Parasite Immunol* 2009 September;31(9):520-8.
- (80) Wang R, Doolan DL, Le TP, Hedstrom RC, Coonan KM, Charoenvit Y et al. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* 1998 October 16;282(5388):476-80.

- (81) Smith GL, Godson GN, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Barnwell J, Moss B. *Plasmodium knowlesi* sporozoite antigen: expression by infectious recombinant vaccinia virus. *Science* 1984 April 27;224(4647):397-9.
- (82) McConkey SJ, Reece WH, Moorthy VS, Webster D, Dunachie S, Butcher G et al. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. *Nat Med* 2003 June;9(6):729-35.
- (83) Schofield L, Villaquiran J, Ferreira A, Schellekens H, Nussenzweig R, Nussenzweig V. Gamma interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* 1987 December 17;330(6149):664-6.
- (84) Romero P, Maryanski JL, Corradin G, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Zavala F. Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. *Nature* 1989 September 28;341(6240):323-6.
- (85) Doumbo OK, Krogstad DJ. Doctoral training of African scientists. *Am J Trop Med Hyg* 1998 February;58(2):127-32.
- (86) Zicker F. Strengthening capability for malaria research in Africa. *Emerg Infect Dis* 2001;7(3 Suppl):529-30.
- (87) Kilama WL. The malaria burden and the need for research and capacity strengthening in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2001 January;64(1-2 Suppl):iii.
- (88) Trape JF. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2001 January;64(1-2 Suppl):12-7.
- (89) Munier A, Diallo A, Marra A, Cot M, Arduin P, Ndiaye O et al. Evolution of malaria mortality and morbidity after the emergence of chloroquine resistance in Niakhar, Senegal. *Malar J* 2009;8:270.
- (90) Greenwood B, Bhasin A, Targett G. The Gates Malaria Partnership: a consortium approach to malaria research and capacity development. *Trop Med Int Health* 2012 May;17(5):558-63.
- (91) Public/Private partnership for research training: a new kind of TDR trainee. *TDRnews* 64, 5. 2-2-2001. UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR).
Ref Type: Magazine Article
- (92) Okiro EA, Alegana VA, Noor AM, Mutheu JJ, Juma E, Snow RW. Malaria paediatric hospitalization between 1999 and 2008 across Kenya. *BMC Med* 2009;7:75.
- (93) Okiro EA, Kazembe LN, Kabaria CW, Ligomeka J, Noor AM, Ali D et al. Childhood malaria admission rates to four hospitals in Malawi between 2000 and 2010. *PLoS ONE* 2013;8(4):e62214.
- (94) Good MF. A whole parasite vaccine to control the blood stages of Plasmodium: the case for lateral thinking. *Trends Parasitol* 2011 August;27(8):335-40.

- (95) Hviid L. Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in Africa. *Acta Trop* 2005 September;95(3):270-5.
- (96) Hill AV. Gene-based Malaria Vaccines. In: Myron M Levine, Gordon Dougan, Michael F Good, Margaret A Liu, Gary J Nabel, James P Nataro et al., editors. *New Generation Vaccines*. Informa Healthcare USA Inc ed. New York: 2010. p. 774-82.
- (97) Hutchings CL, Gilbert SC, Hill AV, Moore AC. Novel protein and poxvirus-based vaccine combinations for simultaneous induction of humoral and cell-mediated immunity. *J Immunol* 2005 July 1;175(1):599-606.
- (98) O'Hara GA, Duncan CJ, Ewer KJ, Collins KA, Elias SC, Halstead FD et al. Clinical assessment of a recombinant simian adenovirus ChAd63: a potent new vaccine vector. *J Infect Dis* 2012 March 1;205(5):772-81.
- (99) Crosnier C, Bustamante LY, Bartholdson SJ, Bei AK, Theron M, Uchikawa M et al. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2011 December 22;480(7378):534-7.
- (100) Dutta S, Lee SY, Batchelor AH, Lanar DE. Structural basis of antigenic escape of a malaria vaccine candidate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 July 24;104(30):12488-93.
- (101) Remarque EJ, Faber BW, Kocken CH, Thomas AW. A diversity-covering approach to immunization with *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 induces broader allelic recognition and growth inhibition responses in rabbits. *Infect Immun* 2008 June;76(6):2660-70.
- (102) Takala SL, Plowe CV. Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming 'vaccine resistant malaria'. *Parasite Immunol* 2009 September;31(9):560-73.
- (103) Srinivasan P, Ekanem E, Diouf A, Tonkin ML, Miura K, Boulanger MJ et al. Immunization with a functional protein complex required for erythrocyte invasion protects against lethal malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014 July 15;111(28):10311-6.
- (104) Dutta S, Dlugosz LS, Drew DR, Ge X, Ababacar D, Rovira YI et al. Overcoming antigenic diversity by enhancing the immunogenicity of conserved epitopes on the malaria vaccine candidate apical membrane antigen-1. *PLoS Pathog* 2013;9(12):e1003840.
- (105) Heppner DG, Jr., Kester KE, Ockenhouse CF, Tornieporth N, Ofori O, Lyon JA et al. Towards an RTS,S-based, multi-stage, multi-antigen vaccine against falciparum malaria: progress at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine* 2005 March 18;23(17-18):2243-50.
- (106) Dame JB, Williams JL, McCutchan TF, Weber JL, Wirtz RA, Hockmeyer WT et al. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 1984 August 10;225(4662):593-9.

- (107) Nardin EH, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Collins WE, Harinasuta KT, Tapchaisri P et al. Circumsporozoite proteins of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *J Exp Med* 1982 July 1;156(1):20-30.
- (108) Nardin EH, Nussenzweig RS, McGregor IA, Bryan JH. Antibodies to sporozoites: their frequent occurrence in individuals living in an area of hyperendemic malaria. *Science* 1979 November 2;206(4418):597-9.
- (109) Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Antisporozoite vaccine for malaria: experimental basis and current status. *Rev Infect Dis* 1989 May;11 Suppl 3:S579-S585.
- (110) Coppi A, Natarajan R, Pradel G, Bennett BL, James ER, Roggero MA et al. The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *J Exp Med* 2011 February 14;208(2):341-56.
- (111) Schwartz L, Brown GV, Genton B, Moorthy VS. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. *Malar J* 2012;11:11.
- (112) Wizen B, Houghten RA, Parker KC, Coligan JE, Church P, Gordon DM et al. Irradiated sporozoite vaccine induces HLA-B8-restricted cytotoxic T lymphocyte responses against two overlapping epitopes of the *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2. *J Exp Med* 1995 November 1;182(5):1435-45.
- (113) Wizen B, Houghten R, Church P, Tine JA, Lanar DE, Gordon DM et al. HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2 epitopes in sporozoite-immunized volunteers. *J Immunol* 1995 July 15;155(2):766-75.
- (114) Charoenvit Y, Fallarme V, Rogers WO, Sacci JB, Jr., Kaur M, Aguiar JC et al. Development of two monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2 and mapping of B-cell epitopes. *Infect Immun* 1997 August;65(8):3430-7.
- (115) Gilbert SC, Schneider J, Plebanski M, Hannan CM, Blanchard TJ, Smith GL et al. Ty virus-like particles, DNA vaccines and Modified Vaccinia Virus Ankara; comparisons and combinations. *Biol Chem* 1999 March;380(3):299-303.
- (116) Moorthy VS, Imoukhuede EB, Keating S, Pinder M, Webster D, Skinner MA et al. Phase 1 evaluation of 3 highly immunogenic prime-boost regimens, including a 12-month reboosting vaccination, for malaria vaccination in Gambian men. *J Infect Dis* 2004 June 15;189(12):2213-9.
- (117) Ogowang C, Afolabi M, Kimani D, Jagne YJ, Sheehy SH, Bliss CM et al. Safety and immunogenicity of heterologous prime-boost immunisation with *Plasmodium falciparum* malaria candidate vaccines, ChAd63 ME-TRAP and MVA ME-TRAP, in healthy Gambian and Kenyan adults. *PLoS ONE* 2013;8(3):e57726.
- (118) Ewer KJ, O'Hara GA, Duncan CJ, Collins KA, Sheehy SH, Reyes-Sandoval A et al. Protective CD8+ T-cell immunity to human malaria induced by chimpanzee adenovirus-MVA immunisation. *Nat Commun* 2013;4:2836.

- (119) Bakshi S, Imoukhuede EB. Malaria Vectored Vaccines Consortium (MVVC). Hum Vaccin 2010 June;6(6):433-4.
- (120) Laurens MB, Billingsley P, Richman A, Eappen AG, Adams M, Li T et al. Successful human infection with *P. falciparum* using three aseptic *Anopheles stephensi* mosquitoes: a new model for controlled human malaria infection. PLoS ONE 2013;8(7):e68969.
- (121) Sheehy SH, Spencer AJ, Douglas AD, Sim BK, Longley RJ, Edwards NJ et al. Optimising Controlled Human Malaria Infection Studies Using Cryopreserved Parasites Administered by Needle and Syringe. PLoS ONE 2013;8(6):e65960.
- (122) Seder RA, Chang LJ, Enama ME, Zephir KL, Sarwar UN, Gordon IJ et al. Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. Science 2013 September 20;341(6152):1359-65.
- (123) Mikolajczak SA, Lakshmanan V, Fishbaugher M, Camargo N, Harupa A, Kaushansky A et al. A next generation genetically attenuated *Plasmodium falciparum* parasite created by triple gene deletion. Mol Ther 2014 May 14.
- (124) Nagel A, Prado M, Heitmann A, Tartz S, Jacobs T, Deschermeier C et al. A new approach to generate a safe double-attenuated Plasmodium liver stage vaccine. Int J Parasitol 2013 May;43(6):503-14.
- (125) Trimnell A, Takagi A, Gupta M, Richie TL, Kappe SH, Wang R. Genetically attenuated parasite vaccines induce contact-dependent CD8+ T cell killing of *Plasmodium yoelii* liver stage-infected hepatocytes. J Immunol 2009 November 1;183(9):5870-8.
- (126) Spring M, Murphy J, Nielsen R, Dowler M, Bennett JW, Zarling S et al. First-in-human evaluation of genetically attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites administered by bite of *Anopheles* mosquitoes to adult volunteers. Vaccine 2013 October 9;31(43):4975-83.
- (127) Audran R, Lurati-Ruiz F, Genton B, Blythman HE, Ofori-Anyinam O, Reymond C et al. The synthetic *Plasmodium falciparum* circumsporozoite peptide PfCS102 as a malaria vaccine candidate: a randomized controlled phase I trial. PLoS ONE 2009;4(10):e7304.
- (128) Genton B, D'Acromont V, Lurati-Ruiz F, Verhage D, Audran R, Hermsen C et al. Randomized double-blind controlled Phase I/IIa trial to assess the efficacy of malaria vaccine PfCS102 to protect against challenge with *P. falciparum*. Vaccine 2010 September 14;28(40):6573-80.
- (129) Gray JC, Corran PH, Mangia E, Gaunt MW, Li Q, Tetteh KK et al. Profiling the antibody immune response against blood stage malaria vaccine candidates. Clin Chem 2007 July;53(7):1244-53.
- (130) Osier FH, Fegan G, Polley SD, Murungi L, Verra F, Tetteh KK et al. Breadth and magnitude of antibody responses to multiple *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria. Infect Immun 2008 May;76(5):2240-8.

- (131) Anders RF, Adda CG, Foley M, Norton RS. Recombinant protein vaccines against the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*. Hum Vaccin 2010 January;6(1):39-53.
- (132) Holder AA, Freeman RR. Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. J Exp Med 1982 November 1;156(5):1528-38.
- (133) McBride JS, Heidrich HG. Fragments of the polymorphic Mr 185,000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoites form an antigenic complex. Mol Biochem Parasitol 1987 February;23(1):71-84.
- (134) Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. J Exp Med 1990 July 1;172(1):379-82.
- (135) Blackman MJ, Holder AA. Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1) by a calcium-dependent membrane-bound serine protease: shedding of MSP133 as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSP1. Mol Biochem Parasitol 1992 February;50(2):307-15.
- (136) Blackman MJ, Scott-Finnigan TJ, Shai S, Holder AA. Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein. J Exp Med 1994 July 1;180(1):389-93.
- (137) Child MA, Epp C, Bujard H, Blackman MJ. Regulated maturation of malaria merozoite surface protein-1 is essential for parasite growth. Mol Microbiol 2010 October;78(1):187-202.
- (138) Peterson MG, Coppel RL, McIntyre P, Langford CJ, Woodrow G, Brown GV et al. Variation in the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 1988 January 15;27(2-3):291-301.
- (139) Simpalian P, Pattaradilokrat S, Siripoon N, Seugorn A, Kaewthamasorn M, Butcher RD et al. Diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* in Thailand based on the spatial and temporal haplotype patterns of the C-terminal 19-kDa domain of merozoite surface protein-1. Malar J 2014;13(1):54.
- (140) Takala SL, Escalante AA, Branch OH, Kariuki S, Biswas S, Chaiyaroj SC et al. Genetic diversity in the Block 2 region of the merozoite surface protein 1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*: additional complexity and selection and convergence in fragment size polymorphism. Infect Genet Evol 2006 September;6(5):417-24.
- (141) Takala SL, Coulibaly D, Thera MA, Dicko A, Smith DL, Guindo AB et al. Dynamics of polymorphism in a malaria vaccine antigen at a vaccine-testing site in Mali. PLoS Med 2007 March;4(3):e93.
- (142) Dent AE, Moormann AM, Yohn CT, Kimmel RJ, Sumba PO, Vulule J et al. Broadly reactive antibodies specific for *Plasmodium falciparum* MSP-1(19) are associated with the protection of naturally exposed children against infection. Malar J 2012;11:287.

- (143) Conway DJ, Cavanagh DR, Tanabe K, Roper C, Mikes ZS, Sakihama N et al. A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. *Nat Med* 2000 June;6(6):689-92.
- (144) Nwuba RI, Sodeinde O, Anumudu CI, Omosun YO, Odaibo AB, Holder AA et al. The human immune response to *Plasmodium falciparum* includes both antibodies that inhibit merozoite surface protein 1 secondary processing and blocking antibodies. *Infect Immun* 2002 September;70(9):5328-31.
- (145) Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Diallo DA, Sagara I, Dicko A et al. Safety and allele-specific immunogenicity of a malaria vaccine in Malian adults: results of a phase I randomized trial. *PLoS Clin Trials* 2006;1(7):e34.
- (146) Withers MR, McKinney D, Ogutu BR, Waitumbi JN, Milman JB, Apollo OJ et al. Safety and reactogenicity of an MSP-1 malaria vaccine candidate: a randomized phase Ib dose-escalation trial in Kenyan children. *PLoS Clin Trials* 2006;1(7):e32.
- (147) Ogutu BR, Apollo OJ, McKinney D, Okoth W, Siangla J, Dubovsky F et al. Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in Western Kenya. *PLoS ONE* 2009;4(3):e4708.
- (148) Kauth CW, Woehlbier U, Kern M, Mekonnen Z, Lutz R, Mucke N et al. Interactions between merozoite surface proteins 1, 6, and 7 of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 2006 October 20;281(42):31517-27.
- (149) Woehlbier U, Epp C, Kauth CW, Lutz R, Long CA, Coulibaly B et al. Analysis of antibodies directed against merozoite surface protein 1 of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 2006 February;74(2):1313-22.
- (150) Cavanagh DR, Kocken CH, White JH, Cowan GJ, Samuel K, Dubbeld MA et al. Antibody responses to a novel *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein vaccine correlate with protection against experimental malaria infection in Aotus monkeys. *PLoS ONE* 2014;9(1):e83704.
- (151) Cowan GJ, Bockau U, Eleni-Muus J, Aldag I, Samuel K, Creasey AM et al. A novel malaria vaccine candidate antigen expressed in *Tetrahymena thermophila*. *PLoS ONE* 2014;9(1):e87198.
- (152) Low A, Chandrashekar IR, Adda CG, Yao S, Sabo JK, Zhang X et al. Merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum*: expression, structure, dynamics, and fibril formation of the conserved N-terminal domain. *Biopolymers* 2007 September;87(1):12-22.
- (153) Gerold P, Schofield L, Blackman MJ, Holder AA, Schwarz RT. Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1996 January;75(2):131-43.
- (154) Smythe JA, Coppel RL, Brown GV, Ramasamy R, Kemp DJ, Anders RF. Identification of two integral membrane proteins of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 July;85(14):5195-9.

- (155) Smythe JA, Coppel RL, Day KP, Martin RK, Oduola AM, Kemp DJ et al. Structural diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2. Proc Natl Acad Sci U S A 1991 March 1;88(5):1751-5.
- (156) Fenton B, Clark JT, Khan CM, Robinson JV, Walliker D, Ridley R et al. Structural and antigenic polymorphism of the 35- to 48-kilodalton merozoite surface antigen (MSA-2) of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Mol Cell Biol 1991 February;11(2):963-71.
- (157) Metzger WG, Okenu DM, Cavanagh DR, Robinson JV, Bojang KA, Weiss HA et al. Serum IgG3 to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. Parasite Immunol 2003 June;25(6):307-12.
- (158) Taylor RR, Allen SJ, Greenwood BM, Riley EM. IgG3 antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 (MSP2): increasing prevalence with age and association with clinical immunity to malaria. Am J Trop Med Hyg 1998 April;58(4):406-13.
- (159) Genton B, Betuela I, Felger I, Al-Yaman F, Anders RF, Saul A et al. A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea. J Infect Dis 2002 March 15;185(6):820-7.
- (160) McCarthy JS, Marjason J, Elliott S, Fahey P, Bang G, Malkin E et al. A phase 1 trial of MSP2-C1, a blood-stage malaria vaccine containing 2 isoforms of MSP2 formulated with Montanide(R) ISA 720. PLoS ONE 2011;6(9):e24413.
- (161) Druilhe P, Spertini F, Soesoe D, Corradin G, Mejia P, Singh S et al. A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill *Plasmodium falciparum*. PLoS Med 2005 November;2(11):e344.
- (162) Fowkes FJ, Richards JS, Simpson JA, Beeson JG. The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: A systematic review and meta-analysis. PLoS Med 2010 January;7(1):e1000218.
- (163) Audran R, Cachat M, Lurati F, Soe S, Leroy O, Corradin G et al. Phase I malaria vaccine trial with a long synthetic peptide derived from the merozoite surface protein 3 antigen. Infect Immun 2005 December;73(12):8017-26.
- (164) Sirima SB, Cousens S, Druilhe P. Protection against malaria by MSP3 candidate vaccine. N Engl J Med 2011 September 15;365(11):1062-4.
- (165) Palacpac NM, Ntege E, Yeka A, Balikagala B, Suzuki N, Shirai H et al. Phase 1b randomized trial and follow-up study in Uganda of the blood-stage malaria vaccine candidate BK-SE36. PLoS ONE 2013;8(5):e64073.
- (166) Marchesi VT, Tillack TW, Jackson RL, Segrest JP, Scott RE. Chemical characterization and surface orientation of the major glycoprotein of the human erythrocyte membrane. Proc Natl Acad Sci U S A 1972 June;69(6):1445-9.

- (167) Sim BK, Chitnis CE, Wasniowska K, Hadley TJ, Miller LH. Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science* 1994 June 24;264(5167):1941-4.
- (168) Tolia NH, Enemark EJ, Sim BK, Joshua-Tor L. Structural basis for the EBA-175 erythrocyte invasion pathway of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell* 2005 July 29;122(2):183-93.
- (169) Richards JS, Stanisic DI, Fowkes FJ, Tavul L, Dabod E, Thompson JK et al. Association between naturally acquired antibodies to erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* and protection from malaria and high-density parasitemia. *Clin Infect Dis* 2010 October 15;51(8):e50-e60.
- (170) Travassos MA, Niangaly A, Bailey JA, Ouattara A, Coulibaly D, Laurens MB et al. Seroreactivity to *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 intracellular domain in malaria-exposed children and adults. *J Infect Dis* 2013 November 1;208(9):1514-9.
- (171) Osier FH, Mackinnon MJ, Crosnier C, Fegan G, Kamuyu G, Wanaguru M et al. New antigens for a multicomponent blood-stage malaria vaccine. *Sci Transl Med* 2014 July 30;6(247):247ra102.
- (172) Hu J, Chen Z, Gu J, Wan M, Shen Q, Kieny MP et al. Safety and immunogenicity of a malaria vaccine, *Plasmodium falciparum* AMA-1/MSP-1 chimeric protein formulated in montanide ISA 720 in healthy adults. *PLoS ONE* 2008;3(4):e1952.
- (173) Esen M, Kremsner PG, Schleucher R, Gassler M, Imoukhuede EB, Imbault N et al. Safety and immunogenicity of G. *Vaccine* 2009 November 16;27(49):6862-8.
- (174) Mordmuller B, Szywon K, Greutelaers B, Esen M, Mewono L, Treut C et al. Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate GMZ2 in malaria-exposed, adult individuals from Lambarene, Gabon. *Vaccine* 2010 September 24;28(41):6698-703.
- (175) Belard S, Issifou S, Hounkpatin AB, Schaumburg F, Ngoa UA, Esen M et al. A randomized controlled phase Ib trial of the malaria vaccine candidate GMZ2 in African children. *PLoS ONE* 2011;6(7):e22525.
- (176) Rodriguez M, Lustigman S, Montero E, Oksov Y, Lobo CA. PfrH5: a novel reticulocyte-binding family homolog of *Plasmodium falciparum* that binds to the erythrocyte, and an investigation of its receptor. *PLoS ONE* 2008;3(10):e3300.
- (177) Douglas AD, Williams AR, Illingworth JJ, Kamuyu G, Biswas S, Goodman AL et al. The blood-stage malaria antigen PfrH5 is susceptible to vaccine-inducible cross-strain neutralizing antibody. *Nat Commun* 2011;2:601.
- (178) Tran TM, Ongoiba A, Coursen J, Crosnier C, Diouf A, Huang CY et al. Naturally acquired antibodies specific for *Plasmodium falciparum* reticulocyte-binding protein homologue 5 inhibit parasite growth and predict protection from malaria. *J Infect Dis* 2014 March 1;209(5):789-98.

- (179) Chiu CY, Healer J, Thompson JK, Chen L, Kaul A, Savergave L et al. Association of antibodies to *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding protein homolog 5 with protection from clinical malaria. *Front Microbiol* 2014;5:314.
- (180) Pombo DJ, Lawrence G, Hirunpetcharat C, Rzepczyk C, Bryden M, Cloonan N et al. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Lancet* 2002 August 24;360(9333):610-7.
- (181) Diallo M, Toure AM, Traore SF, Niare O, Kassambara L, Konare A et al. Evaluation and optimization of membrane feeding compared to direct feeding as an assay for infectivity. *Malar J* 2008;7:248.
- (182) Toure YT, Doumbo O, Toure A, Bagayoko M, Diallo M, Dolo A et al. Gametocyte infectivity by direct mosquito feeds in an area of seasonal malaria transmission: implications for Bancoumana, Mali as a transmission-blocking vaccine site. *Am J Trop Med Hyg* 1998 September;59(3):481-6.
- (183) Miura K, Deng B, Tullo G, Diouf A, Moretz SE, Locke E et al. Qualification of standard membrane-feeding assay with *Plasmodium falciparum* malaria and potential improvements for future assays. *PLoS ONE* 2013;8(3):e57909.
- (184) Bousema T, Drakeley C, Gesase S, Hashim R, Magesa S, Mosha F et al. Identification of hot spots of malaria transmission for targeted malaria control. *J Infect Dis* 2010 June 1;201(11):1764-74.
- (185) Anders RF. The case for a subunit vaccine against malaria. *Trends Parasitol* 2011 August;27(8):330-4.
- (186) Deans JA, Alderson T, Thomas AW, Mitchell GH, Lennox ES, Cohen S. Rat monoclonal antibodies which inhibit the in vitro multiplication of *Plasmodium knowlesi*. *Clin Exp Immunol* 1982 August;49(2):297-309.
- (187) Thomas AW, Waters AP, Carr D. Analysis of variation in PF83, an erythrocytic merozoite vaccine candidate antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1990 September;42(2):285-7.
- (188) Waters AP, Thomas AW, Deans JA, Mitchell GH, Hudson DE, Miller LH et al. A merozoite receptor protein from *Plasmodium knowlesi* is highly conserved and distributed throughout *Plasmodium*. *J Biol Chem* 1990 October 15;265(29):17974-9.
- (189) Triglia T, Healer J, Caruana SR, Hodder AN, Anders RF, Crabb BS et al. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Mol Microbiol* 2000 November;38(4):706-18.
- (190) Bannister LH, Hopkins JM, Dluzewski AR, Margos G, Williams IT, Blackman MJ et al. *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. *J Cell Sci* 2003 September 15;116(Pt 18):3825-34.
- (191) Nair M, Hinds MG, Coley AM, Hodder AN, Foley M, Anders RF et al. Structure of domain III of the blood-stage malaria vaccine candidate, *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1). *J Mol Biol* 2002 September 27;322(4):741-53.

- (192) Pizarro JC, Vulliez-Le NB, Chesne-Seck ML, Collins CR, Withers-Martinez C, Hackett F et al. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *Science* 2005 April 15;308(5720):408-11.
- (193) Bai T, Becker M, Gupta A, Strike P, Murphy VJ, Anders RF et al. Structure of AMA1 from *Plasmodium falciparum* reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 September 6;102(36):12736-41.
- (194) Silvie O, Franetich JF, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M et al. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Biol Chem* 2004 March 5;279(10):9490-6.
- (195) Cowman AF, Berry D, Baum J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol* 2012 September 17;198(6):961-71.
- (196) Richard D, Macrauld CA, Riglar DT, Chan JA, Foley M, Baum J et al. Interaction between *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. *J Biol Chem* 2010 May 7;285(19):14815-22.
- (197) Riglar DT, Richard D, Wilson DW, Boyle MJ, Dekiwadia C, Turnbull L et al. Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host Microbe* 2011 January 20;9(1):9-20.
- (198) Collins CR, Withers-Martinez C, Bentley GA, Batchelor AH, Thomas AW, Blackman MJ. Fine mapping of an epitope recognized by an invasion-inhibitory monoclonal antibody on the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *J Biol Chem* 2007 March 9;282(10):7431-41.
- (199) Miller LH, Roberts T, Shahabuddin M, McCutchan TF. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol Biochem Parasitol* 1993 May;59(1):1-14.
- (200) Crewther PE, Matthew ML, Flegg RH, Anders RF. Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. *Infect Immun* 1996 August;64(8):3310-7.
- (201) Hodder AN, Crewther PE, Anders RF. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. *Infect Immun* 2001 May;69(5):3286-94.
- (202) Cortes A, Mellombo M, Mueller I, Benet A, Reeder JC, Anders RF. Geographical structure of diversity and differences between symptomatic and asymptomatic infections for *Plasmodium falciparum* vaccine candidate AMA1. *Infect Immun* 2003 March;71(3):1416-26.
- (203) Kwiatkowski D, Marsh K. Development of a malaria vaccine. *Lancet* 1997 December 6;350(9092):1696-701.
- (204) Heppner DG, Cummings JF, Ockenhouse C, Kester KE, Lyon JA, Gordon DM. New World monkey efficacy trials for malaria vaccine development: critical path or detour? *Trends Parasitol* 2001 September;17(9):419-25.

- (205) Stowers AW, Miller LH. Are trials in New World monkeys on the critical path for blood-stage malaria vaccine development? Trends Parasitol 2001 September;17(9):415-9.
- (206) Goldenthal KL, Falk LA, Ball L, Geber A. Prelicensure evaluation of combination vaccines. Clin Infect Dis 2001 December 15;33 Suppl 4:S267-S273.
- (207) Emanuel EJ, Wendler D, Grady C. What makes clinical research ethical? JAMA 2000 May 24;283(20):2701-11.
- (208) Doumbo OK, Djimde AA, Thera MA. [Development of anti-malarial vaccines and need for clinical trials in accordance with international standards in South Africa]. Bull Soc Pathol Exot 2008 June;101(3):249-53.
- (209) Dicko A, Mantel C, Kouriba B, Sagara I, Thera MA, Doumbia S et al. Season, fever prevalence and pyrogenic threshold for malaria disease definition in an endemic area of Mali. Trop Med Int Health 2005 June;10(6):550-6.
- (210) Coulibaly D, Travassos MA, Kone AK, Tolo Y, Laurens MB, Traore K et al. Stable malaria incidence despite scaling up control strategies in a malaria vaccine-testing site in Mali. Malar J 2014;13:374.
- (211) Polhemus ME, Magill AJ, Cummings JF, Kester KE, Ockenhouse CF, Lanar DE et al. Phase I dose escalation safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* apical membrane protein (AMA-1) FMP2.1, adjuvanted with AS02A, in malaria-naive adults at the Walter Reed Army Institute of Research. Vaccine 2007 May 22;25(21):4203-12.
- (212) Spring MD, Cummings JF, Ockenhouse CF, Dutta S, Reidler R, Angov E et al. Phase 1/2a study of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen-1 (AMA-1) administered in adjuvant system AS01B or AS02A. PLoS ONE 2009;4(4):e5254.
- (213) Ouattara A, Takala-Harrison S, Thera MA, Coulibaly D, Niangaly A, Saye R et al. Molecular basis of allele-specific efficacy of a blood-stage malaria vaccine: vaccine development implications. J Infect Dis 2013 February 1;207(3):511-9.
- (214) Srinivasan P, Beatty WL, Diouf A, Herrera R, Ambroggio X, Moch JK et al. Binding of Plasmodium merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. Proc Natl Acad Sci U S A 2011 August 9;108(32):13275-80.