



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

**Towards a blood stage malaria vaccine, dealing with allelic polymorphism in the vaccine candidate apical membrane antihen 1**  
Kusi, K.A.

**Citation**

Kusi, K. A. (2012, January 18). *Towards a blood stage malaria vaccine, dealing with allelic polymorphism in the vaccine candidate apical membrane antihen 1*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18387>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/18387>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

**Summary**

**&**

**Nederlandse samenvatting**

## SUMMARY

A vaccine against the blood stages of malaria caused by *Plasmodium falciparum* would be an important addition to the currently available arsenal for disease control. A handful of immunologically relevant parasite antigens are at various stages of pre-clinical and clinical development. Amongst these is *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (*PfAMA1*), an essential antigen initially expressed in micronemes of asexual blood stage parasites and believed to play a critical role in the parasite's invasion of red blood cells. A similar role for this antigen has been described in sporozoites, and this makes *PfAMA1* an important multi-stage vaccine candidate. The immune response to *PfAMA1* is mediated mainly by antibodies that prevent invasion of host cells by parasites. *PfAMA1* however shows extensive polymorphism, with anti-*PfAMA1* antibody responses exhibiting strain-specificity. One proposed strategy for dealing with strain-specificity to *PfAMA1* responses has been the formulation of vaccines with a number of *PfAMA1* alleles as components, and this is the focus of the current thesis.

In **chapter 2** of this thesis the mechanism underlying broadening of anti-*PfAMA1* vaccine responses through immunisation with multi-allele formulations was investigated by comparing responses induced in rabbits with vaccines containing one and three *PfAMA1* alleles (from FVO, HB3 and 3D7 parasite strains). A harmonized competition ELISA, together with an *in vitro* growth inhibition assay, was used to show that the three-allele vaccine induces a greater proportion of functional cross-strain antibodies compared to single allele vaccines. Cross-strain antibodies were induced against epitopes that are shared between the vaccine alleles. These would include epitopes that are conserved in all *PfAMA1* alleles as well as epitopes that are common only to the vaccine alleles. Only a single *PfAMA1* conserved epitope has thus far been described and the findings here suggest there may be a couple more of such conserved epitopes. The findings here also suggest that increasing the number of alleles included in a vaccine should in theory result in an increased proportion of the induced cross-strain antibodies, and this raises the question of how many alleles are required to yield the best vaccine response against a diversity of strains.

This question was addressed in **chapter 3** by comparing responses induced in rabbits with vaccines incorporating three (Diversity Covering antigens or DiCos, designed *in silico* based on sequences of naturally occurring *PfAMA1* alleles) and seven (the three DiCo antigens, alleles from strains FVO, HB3, 3D7 and CAMP) *PfAMA1* alleles. Specificity assays showed that the proportions of induced cross-strain antibodies were comparable between the two vaccines, both formulated with CoVaccine HT™ as adjuvant. Functional assays with protein G-purified antibodies confirmed this finding, suggesting that optimal broadening of the antibody response is achieved with three alleles, as there is a response plateau beyond this number. The effect of adjuvant choice on antibody specificity was

also investigated in this chapter. Responses against DiCo mix formulated with three different adjuvants (CoVaccine HT™, Montanide ISA 51 and Montanide IMS) showed only marginal differences in the proportions of induced cross-strain antibodies. Functional assays however showed no adjuvant effect on antibody inhibitory capacity but rather an effect of the quantity of induced antibodies. Antibody responses against DiCo mix in Montanide IMS were 2 – 3 fold lower compared to formulations with the other two adjuvants and this resulted in corresponding low growth inhibition capacities.

In **chapter 4**, sequential immunisation as a possible strategy for further increasing the proportion of induced cross-strain anti-*Pf*AMA1 antibodies was investigated. Groups of rabbits were immunised three times with three *Pf*AMA1 alleles in different orders and their responses compared to those of rabbits immunised three times with the same alleles as a mixture. It was established that immunisation with three *Pf*AMA1 alleles in sequence resulted in similar proportions of cross-strain antibodies as three immunisations with the allele mixture. The findings here were also suggestive of the accumulation of a cross-strain antibody repertoire with increasing exposure to variant parasites in the field.

In **chapter 5**, the safety and immunogenicity of DiCo mix vaccines formulated with two different adjuvants (CoVaccine HT™ and Montanide ISA 51) were assessed in rhesus monkeys. Safety and immunogenicity data in non-human primates may give a better indication of the vaccines' effects in humans compared to data generated in rabbits. Different groups of rhesus macaques were immunised three times with the two DiCo formulations and an AMA1-MSP1 (AM) fusion protein candidate formulated in Montanide ISA 51. Vaccine safety was assessed by physical and behavioural observation of animals as well as by measurement of chemical and haematological parameters as indices for organ and systemic functions. All vaccines were well tolerated with no vaccine-related adverse events, and DiCo mix in CoVaccine HT™ yielded the best immunogenicity data as assessed by indirect ELISA and *in vitro* growth inhibition assays. This data further demonstrates the specificity broadening effects of multi-allele formulations, and plans are underway to secure the proprietary adjuvant CoVaccine HT™ for testing DiCo mix in a phase I trial in a non-endemic population. Data from the AM fusion protein was however difficult to interpret as four of the six immunised animals were non-responsive for unknown reasons.

**Chapter 6** of this thesis examined the effect of *Pf*AMA1 allele polymorphism on measurement of anti-*Pf*AMA1 titres in field studies. Antibody titres in a naturally exposed cohort of children between the ages of 3 and 15 years, living in an endemic area of southern Ghana, were measured against four *Pf*AMA1 alleles (from strains FVO, HB3, 3D7 and CAMP) as well as three antigen mixtures (DiCo mix, a mixture of the four natural alleles as well as a mixture of all seven alleles). The best allele for titre measurement in this population was deduced from comparisons of titres against single alleles with those against allele mixtures.

## Summary

The mixtures are expected to have a wide repertoire of epitopes that would be recognised by antibodies of diverse specificities present in the polyclonal pool of naturally exposed individuals. Apart from that, the three DiCo antigens were designed specifically to cover naturally occurring polymorphism when used as an equimolar mixture. The FVO and 3D7 alleles were found to be best for use as capture antigens when measuring anti-*PfAMA1* titres in this population. Analysis of *PfAMA1* protein sequence data retrieved from GenBank however showed that the 3D7 and CAMP alleles were most prevalent of the four alleles in the Africa region. Findings here also suggest that the proportion of cross-strain antibodies most likely increases with age/exposure to different parasite strains and humans, especially infants and young children with limited parasite exposure, might discriminate between *PfAMA1* alleles. Anti-*PfAMA1* titres measured against single *PfAMA1* alleles may therefore need to be cautiously interpreted as they may be underestimated in such individuals.

**Chapter 7** finally presents a general discussion of the findings in this thesis along with the current status of malaria vaccine development.

The data presented in this thesis shows that multi-allele formulations are an important strategy for *PfAMA1* vaccine design, and that *PfAMA1* must at least be a component of an effective universal multi-antigen subunit vaccine. There are currently a number of vaccine design strategies that aim to combine several proven candidates either as the recombinant DNA, as antigen mixtures or as fusion proteins in order to cover polymorphism as well as target different stages of the parasite's lifecycle. Other challenges such as availability of potent adjuvants, vaccine delivery systems and delivery routes will also need further investigation.

## SAMENVATTING

Een vaccin zou een belangrijke bijdrage kunnen leveren aan de bestrijding van malaria tropica, veroorzaakt door *Plasmodium falciparum*, verantwoordelijk voor 95% van de mortaliteit van malaria. Momenteel zijn er maar een klein aantal immunologisch relevante parasietantigenen in ontwikkeling tegen de bloedstadia van deze belangrijke infectieziekte. Een van deze antigenen is *Plasmodium falciparum* apicaal membraan antigeen 1 (*PfAMA1*), wat beschouwd wordt als één van de meest prominente bloedstadium-vaccinkandidaten. *PfAMA1* is een essentieel eiwit dat waarschijnlijk een belangrijke rol speelt in de invasie van rode bloedcellen. Het komt initieel tot expressie in de micronemen van de asexuele bloedstadia van de parasiet. Het eiwit is ook aangetoond in sporozoïten en het vermoeden bestaat dat *PfAMA1* ook betrokken is bij de invasie van levercellen. Dit maakt *PfAMA1* mogelijk een multi-stadium vaccinkandidaat.

De immuunrespons tegen *PfAMA1* is hoofdzakelijk antilichaam gemedieerd. Deze antilichamen binden aan *PfAMA1* en blokkeren zo de invasie van gastheercellen. *PfAMA1* is een polymorf eiwit (allelische variatie) en antilichaamresponsen tegen *PfAMA1* zijn grotendeels allel-specifiek. Een mogelijke oplossing om allel-specificiteit van antilichaam responsen te verbreden is vaccinatie met een mengsel van verschillende allelen. Dit laatste is het onderwerp van dit proefschrift.

In **hoofdstuk 2** worden mechanismen verantwoordelijk voor de verbreding van de immuunrespons na vaccinatie met meerdere allelen onderzocht door de antilichaamresponsen van konijnen gevaccineerd met slechts één *PfAMA1* allel te vergelijken met responsen van konijnen gevaccineerd met een mengsel van drie *PfAMA1* allelen (van de FVO, HB3 en 3D7 *P. Falciparum* parasietstammen). Met behulp van een geharmoniseerde competitie-ELISA en een *in vitro* groei inhibitie assay (GIA) werd aangetoond dat vaccinatie met een mengsel van drie *PfAMA1* allelen meer functionele antilichamen opwekt die met meerdere *PfAMA1* allelen reageren (cross-strain) dan vaccinatie met een enkel allel. Het merendeel van de antilichamen opgewekt door gelijktijdige vaccinatie met drie *PfAMA1* allelen reageerde met epitopen die op ieder van deze drie vaccinallelen voorkomen. Dit soort cross-strain epitopen kunnen ook voorkomen op *PfAMA1* allelen die niet tot de drie vaccinallelen behoren. Tot nu toe is slechts één geconserveerde epitoot beschreven voor *PfAMA1* en de bevindingen uit hoofdstuk 2 suggereren dat er mogelijk meer geconserveerde epitopen kunnen zijn. De bevindingen in hoofdstuk 2 suggereren ook dat de antilichaamrespons verbreed kan worden door het aantal allelen in een vaccin te vergroten. Dit resulteert in de onderzoeksvraag hoeveel en welke allelen in een *PfAMA1* vaccin dienen te worden opgenomen.

Deze vraag wordt behandeld in **hoofdstuk 3**. Hier worden antilichaamresponsen in konijnen geïmmuniseerd met drie synthetische allelen (Diversity Covering *PfAMA1* Antigenen of DiCo, specifiek ontworpen om een zo breed mogelijke *PfAMA1* herkenning te geven) vergeleken met responsen in konijnen

geïmmuniseerd met zeven *PfAMA1* allelen (3 DiCo *PfAMA1*'s aangevuld met 4 natuurlijke allelen; FVO, HB3, 3D7 en CAMP). Uit specificiteitsbepalingen bleek dat de proporties cross-strain antilichamen vrijwel gelijk waren voor beide vaccins. Dit werd bevestigd door functionele assays met proteïne G gezuiverde antilichamen. Deze waarnemingen suggereren dat een brede antilichaamrespons opgewekt kan worden met een mengsel van drie allelen en dat hierna een plateau bereikt wordt. De invloed van het adjuvant, werd ook in hoofdstuk 3 onderzocht. Antilichaamresponsen tegen DiCo mix werden vergeleken met drie verschillende adjuvantia (CoVaccine HT™, Montanide ISA 51 en Montanide IMS). Het adjuvant had slechts een marginale invloed op de breedte van de geïnduceerde respons, maar wel een duidelijke invloed op de antilichaamhoeveelheden. Met behulp van functionele assays (GIAs) werden ook geen verschillen in de breedte van de respons waargenomen. Wederom resulteerde lagere antilichaamresponses in lagere GIA titers.

In **hoofdstuk 4** wordt onderzocht of sequentiële immunisatie de proportie cross-strain antilichamen kan verhogen. Om dit te onderzoeken werden groepen konijnen drie maal geïmmuniseerd met verschillende *PfAMA1* allelen in verschillende volgordes en vergeleken met konijnen geïmmuniseerd met een mengsel van de drie allelen. De resultaten wezen uit dat simultane en sequentiële immunisatie vergelijkbare hoeveelheden cross-strain antilichamen opleveren. De resultaten suggereren ook dat de hoeveelheid cross-strain antilichamen toeneemt na blootstelling aan variant allelen in het veld.

In **hoofdstuk 5** wordt de veiligheid en immunogeniciteit van DiCo mix antigenen, geformuleerd met twee verschillende adjuvantia (CoVaccine HT™ en Montanide ISA 51), onderzocht in resus makaken. Veiligheids- en immuniteitsgegevens in niet-humane primaten geven mogelijk meer informatie dan gegevens uit studies met konijnen. Groepen resus makaken werden drie keer geïmmuniseerd met twee verschillende *PfAMA1* DiCo formuleringen (in CoVaccine HT™ en Montanide ISA51) of met een *PfAMA1*-MSP1-19 fusie-eiwit, geformuleerd in Montanide ISA51. Vaccinveiligheid wordt bepaald middels gedragsobservatie, inspectie van de injectieplaatsen en bepaling van klinisch chemische en hematologische parameters als indices voor orgaanfunctie. Alle vaccinformuleringen werden goed verdragen zonder dat er vaccingerelateerde bijwerkingen werden waargenomen. Een mengsel van drie DiCo *PfAMA1* eiwitten in het adjuvant CoVaccine HT™ gaf de beste immunogeniciteit, bepaald met ELISA en met *in vitro* groei inhibitie bepalingen. Uit de gegevens van de immunisaties met het *PfAMA1*-MSP1-19 fusie-eiwit konden geen harde conclusies worden getrokken omdat vier van de zes geïmmuniseerde dieren onverklaarbaar lage responsen te zien gaven. De gegevens verkregen met non-humane primaten bevestigen dat vaccinatie met multi-allel formuleringen de specificiteit van de respons verbreedt. Momenteel worden plannen gemaakt om DiCo Mix met CoVaccine HT™ in een fase Ia studie in niet aan malaria blootgestelde volwassenen te testen.

In **hoofdstuk 6** wordt het effect van *PfAMA1* polymorfismen op antilichaambepalingen in malaria-endemische gebieden nagegaan. Hiervoor werden antilichaamtiters in een cohort van aan malaria blootgestelde Ghanese kinderen tussen 3 en 15 jaar bepaald met verschillende antigenen of combinaties daarvan. Voor dit onderzoek werden platen gecoat met een van de natuurlijke *PfAMA1* varianten FVO, HB3, 3D7 of CAMP, of met een mengsel van antigenen (een mengsel van DiCo *PfAMA1* eiwitten, 4 natuurlijke allelen of een mengsel van alle zeven *PfAMA1* eiwitten). Het beste coating antigeen werd bepaald door titers tegen enkele allelen te vergelijken met titers tegen allelmengsels. Van de mengsels verwacht men dat deze een breed repertoire van potentiële epitopen bevatten, die door polyclonale antilichamen van aan malaria blootgestelde personen herkend kunnen worden. Ook werd een equimolair mengsel van de drie DiCo *PfAMA1*'s getest. *PfAMA1* van de FVO en 3D7 allelen bleken een goed beeld te geven van de anti *PfAMA1* antilichamen in de onderzochte populatie. Analyses van *PfAMA1* eiwitsequenties uit Genbank echter wijzen erop dat de 3D7 en CAMP allelvormen het meest prevalent zouden kunnen zijn in Afrika. De gegevens laten verder zien dat de hoeveelheid cross-strain antilichamen toeneemt met leeftijd en/of blootstelling aan verschillende varianten. Peuters en jonge kinderen lijken meer onderscheid te maken tussen verschillende *PfAMA1* allelen dan oudere kinderen. Het verdient daarom aanbeveling om *PfAMA1* titers bepaald tegen slechts één variant voorzichtig te interpreteren omdat deze mogelijk de hoeveelheden antilichamen in jongere leeftijdsgroepen onderschatten.

**Hoofdstuk 7** stelt definitief een algemene bespreking van de bevindingen in deze thesis samen met het huidige statuut van de ontwikkeling van het malariavaccin.

De gegevens in dit proefschrift maken duidelijk dat multi-allel formuleringen een belangrijke strategie zijn voor *PfAMA1* vaccins en dat *PfAMA1* een component van een effectief universeel multi-antigeen vaccin tegen malaria zou moeten zijn. Er zijn momenteel een aantal vaccinstrategieën gericht op het combineren van meerdere gevalideerde kandidaat antigenen zowel als DNA vaccin, antigeenmengsels als fusie-eiwitten om zo polymorfismen en verschillende levensstadia van de parasiet te bestrijden. Andere uitdagingen zoals de beschikbaarheid van potente adjuvantia, vaccin-delivery systemen en toedieningsroutes behoeven nog verder onderzoek.



