

# CONFÉRENCES DU CENTENAIRE DE LA SPE

## Le développement de vaccins antipaludiques et la nécessité des essais cliniques conformes aux normes internationales en Afrique.

O.K. Doumbo, A.A. Djimdé & M.A. Théra

Malaria Research and Training Center, Département d'épidémiologie des affections parasitaires, Faculté de médecine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie du Mali, Université de Bamako, BP 1805, Bamako, Mali.

Manuscrit n° 3215 bo. "Conférences du centenaire de la SPE".

**Summary:** Development of anti-malarial vaccines and need for clinical trials in accordance with international standards in South Africa.

*In the 20<sup>th</sup> century, malaria remains a major problem of public health in sub-Saharan Africa. This haemosporidium discovered in Africa by Laveran in 1880, kills one child every 30 seconds which amounts to three "tsunami" flowing each year into the African continent.*

*The current international solidarity raises new hopes as regards the possibility to suppress the morbidity effects on the population's health condition. In order to be efficient, today's strategies (impregnated mosquito nets, intermittent preventive treatments, artemisinin based combination therapy) should reach at least 80% of the targeted population (pregnant women and children).*

*By 2025, the uncontrolled urbanization of the African population and the social disorders will make a new population a target for malaria.*

*The new data of functional genomics and proteomics open new avenues of research for new mechanisms, new therapeutics and vaccine targets and new tools of diagnosis and prognosis.*

*The current candidate vaccines of the first generation have allowed the development of African competences in clinical trials of international standard. Although they represent scientific advances they will not resolve the problem of public health. Research on candidate vaccines of 2nd and 3rd generation remains a challenge for the international scientific community. Africa should play a determining role in this process. Scientific information on the field remains essential for these generations of new anti-malarial vaccines. The ethical aspects regarding those clinical trials and actions of public health and research remain an universal necessity. Deontology and ethics are two complementary approaches for the good practice of medicine and research of a good practitioner. For the protection and advantages of the patient and/or volunteer of the research are the cornerstones of the ethical approach.*

*The scientific quality of a research protocol submitted to an independent research ethics committee and the volunteer's informed consent are universal ethical obligations. For the quality of ethics observance in a country reflects best the quality of the efficiency of its research system and its democracy.*

**Résumé :**

*Au XXI<sup>e</sup> siècle, le paludisme reste encore un problème majeur de santé publique en Afrique au sud du Sahara. Son agent, découvert en Algérie par Laveran en 1880, tue un enfant toutes les 30 secondes, soit autant que trois « tsunamis » parmi les plus meurtriers qui se déverseraient sur le continent africain chaque année.*

*La solidarité internationale donne actuellement un nouvel espoir quant à la possibilité d'éliminer, ou tout au moins de réduire dans de larges proportions, les effets morbides de cette infection sur les populations qui y sont exposées. Pour ce faire, les moyens mis en œuvre (moustiquaires imprégnées d'insecticides, traitement intermittent préventif, utilisation de combinaisons thérapeutiques à base de dérivés de l'artémisinine), doivent atteindre au moins 80 % de la population cible (femmes enceintes et enfants). Malgré cela, l'urbanisation non planifiée de l'Afrique et l'éclatement probable de nouveaux conflits politico-sociaux se conjugueront hélas certainement pour fabriquer, d'ici 2025, une nouvelle génération de victimes. La nécessité de trouver de nouvelles armes est donc une nécessité vitale pour ce continent. Les données de la génomique fonctionnelle et de la protéomique ouvrent certes de nouvelles pistes de recherche pour la découverte de nouveaux mécanismes, de nouvelles cibles thérapeutiques et vaccinales et de nouveaux outils diagnostics, mais ce ne sont là, encore, que des espoirs.*

*Les travaux sur les candidats-vaccins, dits de première génération, menés actuellement ont permis de développer des compétences africaines de niveau international en matière d'essais cliniques, ce qui est certainement une avancée importante, mais ne constituent pas une réponse directe au problème posé par le paludisme en termes de santé publique. Il y a donc encore beaucoup à faire. La recherche de candidats vaccins de 2e, 3e génération, capables de contrôler l'infection chez 80 % des enfants et des femmes enceintes, reste un défi pour la communauté scientifique internationale. L'Afrique devrait jouer un rôle déterminant dans cette recherche. Le travail de terrain sera en effet*

*clinical trials  
ethics  
research  
deontology  
good practices  
democracy  
Africa*

*essais cliniques  
éthique  
recherche  
déontologie  
bonnes pratiques  
démocratie  
Afrique*

déterminant pour la mise au point de ces nouvelles armes.

Quant à la prise en compte de la dimension éthique dans la pratique des essais cliniques, dans la recherche et dans les actions de santé publique, c'est une nécessité universelle dont l'Afrique ne peut faire l'économie. La déontologie et l'éthique doivent y être, comme partout, deux comportements complémentaires dans la bonne pratique de tous les chercheurs et de tous les médecins dont le souci prioritaire doit rester la protection et le bénéfice du malade et/ou du volontaire.

La qualité scientifique d'un protocole de recherche, le passage devant un comité d'éthique indépendant et le consentement éclairé du volontaire, sont des obligations auquel les pays en voie de développement ne doivent pas se soustraire, sous prétexte qu'ils sont loin d'avoir les mêmes moyens que les pays du Nord, car la qualité de l'éthique médicale et sa mise en pratique dans un pays, quel qu'il soit, est le meilleur reflet de la qualité du fonctionnement et du dynamisme de sa recherche scientifique et de sa démocratie.

## Introduction

Le paludisme reste encore au XXI<sup>e</sup> siècle un fléau pour la population des pays endémiques d'Afrique au sud du Sahara. Avec un décès toutes les 30 secondes, il tue autant d'enfants africains chaque année que trois tsunamis.

Depuis la découverte du parasite par LAYERAN en Algérie, en 1880, et celle de la transmission des plasmodiums par les moustiques par ROSS en 1898, en Inde, les progrès scientifiques dans la biologie de cette hémospore ont été lents jusqu'à la réalisation des premières cultures continues de *Plasmodium falciparum* par TRAGER et JENSEN (1976), puis plus rapide ces 20 dernières années, notamment dans le domaine des relations hôte-parasite. Depuis 2002 et le décryptage des génomes d'*Homo sapiens*, de *Plasmodium falciparum* et d'*Anopheles gambiae*, nous assistons à un nouveau regain d'intérêt pour la biologie de ce parasite, et pour les mécanismes de l'immunité innée et acquise qu'il suscite.

Quatre espèces plasmodiales sont inféodées à l'homme, mais *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus dangereuse, car c'est elle qui est responsable des « tsunamis » en Afrique. *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium ovale* n'ont pas le même niveau de morbidité et ont une faible mortalité. *Plasmodium knowlesi*, récemment décrit chez l'homme, ne joue aucun rôle en santé publique (6, 13).

Des moyens de lutte efficaces existent actuellement : moustiquaires imprégnées d'insecticides, traitements intermittents préventifs et utilisation de combinaisons thérapeutiques à base de dérivés de l'artémisinine. Leur financement est assuré par la solidarité internationale. Pour avoir un impact significatif en santé publique, celle-ci doit redoubler ses efforts et modifier sa vision à long terme. Les pays endémiques doivent eux aussi se mobiliser pour améliorer leur système de soins et leur organisation en matière de santé publique afin d'atteindre un degré de couverture d'au moins 80 % des enfants et des femmes enceintes. Compte tenu de l'état actuel des choses en la matière au sud du Sahara, une révolution des esprits s'impose, avec des engagements politiques et internationaux forts et soutenus car, si l'éradication du paludisme reste le but ultime, il est possible, dans les deux prochaines décennies, de le contrôler assez étroitement pour peu qu'on y mette les moyens non seulement financiers, mais aussi humains et politiques. Il y va de la crédibilité de l'éthique qui prétend sous-tendre la solidarité internationale, ainsi que de celle des grands organismes censés ancrer cette dernière dans la réalité. Il y va aussi de la crédibilité de l'Afrique.

Les vaccins sont des armes majeures pour le contrôle et l'élimination des maladies infectieuses, comme la variole ou la poliomyélite. C'est la raison pour laquelle, depuis les années 1970, la possibilité d'un vaccin contre le paludisme a été envisagée et documentée (5, 16). Les progrès ont été lents et chaotiques et se sont faits, à de rares exceptions près, dans l'indifférence générale. Plusieurs échecs retentissants, enfin,

après des campagnes médiatiques d'envergure saluant de soit-disant succès, ont fini par décourager les bailleurs de fonds déjà réservés. Depuis les années 2000, plus de modestie chez les chercheurs, des tentatives de mobilisation de l'opinion publique de plus en plus efficaces, aboutissant à une réelle prise de conscience, et des résultats encourageants d'essais cliniques sur le terrain, ont relancé plusieurs programmes de développement de vaccins contre le paludisme. Une quarantaine de candidats ont été ou sont testés chez l'homme en phase I et II. Un seul est actuellement en phase IIb, avec une efficacité attendue de 50 % (1).

Les équipes africaines commencent à être de plus en plus impliquées et engagées dans les programmes d'essais cliniques concernant ces candidats-vaccins. Cet engagement représente pour elles de véritables possibilités de développement au plan local, accompagné d'un transfert de technologie.

La recherche dans le domaine de la génomique, des transcriptomes et de la protéomique, jusque-là enfermée dans une technologie de pointe, éloignée des réalités du terrain et dépendantes de ses robots et de ses machines, commencent à formuler de plus en plus des questions d'un réel intérêt scientifique et d'hypothèses qui peuvent être éprouvées, faisant naître, dans le domaine de la paludologie, un nouvel espoir qui ne devrait pas être déçu.

Le but de ces quelques pages est d'apporter une réflexion de chercheurs africains engagés dans des essais cliniques de vaccins et de médicaments sur le paludisme dans leur pays, le Mali.

## État actuel du développement des vaccins antipaludiques.

La démonstration, vers les années 1970, de l'efficacité de l'injection de sporozoïtes irradiés pour empêcher le développement d'infections expérimentales successives a ouvert la voie menant à la découverte et au développement de candidats vaccins antipaludiques (5, 16). Une quarantaine d'antigènes provenant de différents stades de développement du parasite ont été testés chez l'homme. Seule une dizaine reste dans la course et un seul, le RTSS est en phase IIb (1). L'efficacité attendue de cette première génération de vaccins ne dépassera probablement guère 50 %, ce qui ne manquera pas de poser, dans les calculs statistiques, au plan de l'intervalle de confiance, un problème concernant l'extrapolation des résultats d'une zone endémique à une autre et d'une population à une autre. L'utilisation d'un tel vaccin sur une large échelle entraînera obligatoirement un changement de « paradigmes » en santé publique, car aucun vaccin n'a été utilisé jusqu'ici avec une efficacité de 50 %. On peut espérer que l'ensemble des informations générées par ces premiers candidats vaccins, alliées à l'épidémiologie de terrain, à la génomique structurale et fonctionnelle, au transcriptome et à la protéomique, permettront de sélectionner au mieux les candidats-vaccins

de seconde et troisième génération dont l'efficacité devrait être supérieure à 80 %.

Une feuille de route concernant le développement des vaccins antipaludiques a été tracée en 2005 par la communauté scientifique et les partenaires financiers. D'ici 2015, il est plausible que nous disposions d'un vaccin antipaludique de première génération utilisable en santé publique avec une efficacité de 50 % et qui pourrait être intégré dans l'ancien PEV (IVE), ainsi que dans les stratégies de lutte antipaludique existantes. 2025 devrait voir l'arrivée des vaccins de II<sup>e</sup> et III<sup>e</sup> génération, avec une efficacité d'au moins 80 %. Il est donc nécessaire de réfléchir en profondeur sur les « paradigmes » actuels qui sous-tendent le développement du vaccin, et surtout essayer d'en identifier de nouveaux.

La base scientifique du développement des candidats vaccins actuels peut se résumer à 3 « paradigmes » biologiques majeurs :

#### **Antibody-Dependant Cellular Inhibition (ADCI)**

Ce mécanisme de protection est celui que cherche à induire le candidat-vaccin développé par l'équipe de l'Institut Pasteur de Paris, à partir des antigènes de la famille de la MSP3 (8, 9). Les anticorps cytophiles sont le support d'un tel mécanisme avec une coopération cellulaire (monocyte). Ce candidat passe actuellement en phase II dans la population cible en zone d'endémie.

#### **Invasion/Inhibition et Growth inhibition**

L'inhibition de l'invasion du globule rouge par les mérozoïtes est le principe de base des candidats vaccins de type AMA1 et MSP1. Ils sont actuellement testés en phase II dans la population cible en zone d'endémie (7, 17).

#### **Cyto-adhérence**

La cyto-adhérence étant un des mécanismes rendant compte de la localisation des formes matures du *Plasmodium falciparum* dans les organes nobles (cerveau, placenta), Son inhibition pourrait réduire la survenue des formes graves et compliquées. C'est la voie qu'a choisie l'équipe de Patrick DUFFY (10), après la découverte d'une protection anticorps contre les phénotypes parasitaires CSA+ du placenta. Ce vaccin entrera bien tôt en phase I.

La communauté scientifique peine encore à mettre en évidence une corrélation significative entre la protection chez l'homme, les échecs ou succès des « bioassays » et la mise en évidence *in vitro* de tel ou tel mécanisme, ce qui constitue, bien entendu, une des grandes faiblesses de la recherche dans ce domaine de la paludologie.

### **Espoir de nouvelles données venant de la génomique, du transcriptome, de la protéomique et des plateaux technologiques.**

Il est permis de douter de la capacité des vaccins en cours d'essais à venir à bout du paludisme de façon significative, pérenne et dans différentes zones où il est endémique (2, 14). Puisque les modèles expérimentaux animaux ont montré leurs limites, il est également permis d'affirmer qu'en matière de paludisme, le meilleur modèle animal reste l'Homme lui-même (4, 19). La formation et l'évaluation de structures et de protocoles capables de tester de nouveaux vaccins sur le terrain sont donc d'un intérêt primordial en matière de vaccin antipaludique. Le séquençage des génomes de l'homme, du plasmodium et de l'anophèle sont des avancées dont on attend

beaucoup, mais qui n'ont pas, jusqu'à présent, donné de résultats très concrets (11, 12). Le développement des techniques de séquençage, de criblage génétique, d'analyses fonctionnelles, d'imagerie et de microscopie permet malgré tout un certain optimisme quant à la découverte de nouvelles classes de molécules, point de départ de nouvelles stratégies vaccinales (3, 15, 18). Les analyses protéomiques du parasite et de la réaction de son hôte permettront sans nul doute d'identifier de nouveaux candidats vaccins. C'est à nous qu'il reviendra d'utiliser à bon escient toutes ces nouvelles techniques pour découvrir le ou les talons d'Achille du parasite.

En matière de vaccin antipaludique, la modestie est plus que jamais nécessaire. Nous devons retourner à la case départ pour réexaminer la biologie du plasmodium avec les outils d'aujourd'hui. Une compréhension plus fine et plus précise du parasite et de ses interactions avec son hôte et son vecteur est nécessaire. Il est également indispensable de retourner sur le terrain pour mieux comprendre la maladie dans son contexte naturel, c'est-à-dire dans les communautés qui en souffrent, en tenant compte des phénomènes de co-morbidité, des conditions socio-économiques souvent difficiles, ainsi que du contexte politique et environnemental.

L'atteinte de ces objectifs ne se fera pas sans un engagement continu et soutenu de la communauté scientifique internationale et des bailleurs de fonds. Elle nécessitera une plus grande « démocratisation » des nouveaux outils technologiques, c'est-à-dire un réel effort de formation, de transfert de technologie et de développement d'infrastructures de recherche dans les pays du Sud qui sont les plus touchés par la maladie. Les pays d'endémie palustre et les chercheurs de ces pays devront aller au-delà de leur rôle actuel de site d'essais cliniques, de collecteurs de données et produits biologiques et de « trialistes », pour devenir de vrais partenaires de la recherche scientifique internationale. L'instauration de vrais dialogues laboratoire-terrain, Nord-Sud, Sud-Sud et Nord-Nord devrait permettre de sortir des sentiers battus et de faire des avancées scientifiques significatives dans un environnement mondial globalisé et plus volontaire.

### **Nécessité d'un partenariat fécond Nord-Sud – Éthique et bonnes pratiques des essais cliniques**

La constitution d'un réseau international de partenaires est un élément clef de la réussite du projet visant à contrôler étroitement le paludisme à l'échelle mondiale. Cela signifie, entre autres, mettre ensemble des groupes ayant des objectifs, des structures et des modalités de fonctionnement complètement différents, mais qui partagent la même vision sur un problème dont les tentatives de solutionnement peuvent être l'occasion d'échanges fructueux pour tous. Le mode de partenariat le plus simple consiste à associer un organisme ou une équipe de recherche d'un pays développé, un organisme ou une équipe de recherche d'un pays en développement et un ou plusieurs organismes de financement. Chaque membre doit pouvoir tirer de cette association un bénéfice au moins égal à son investissement, soit en termes de matériel, soit en termes d'échanges, d'expertise et d'expérience.

Un tel partenariat, cependant, ne doit pas fonctionner en vase clos, mais s'ouvrir à d'autres partenariats pour former des réseaux en vue d'un partage encore plus large des compétences, éventuellement des moyens techniques, et des informations, si possible en temps réel. Des initiatives de ce type foisonnent dans le domaine de la recherche sur le paludisme : MIM

(*Multilateral Initiative on Malaria*), le MMV (*Malaria Medicines Venture*), le MVI (*Malaria Vaccine Initiative*), le RBM (*Roll Back Malaria*), l'EDCTP (*European and Developing Countries Clinical Trial Partnership*), AMANET (*African Malaria Vaccine Network Testing*), Fondation Bill et Melinda Gates. Tous participent à des forums où les idées s'échangent et génèrent de nouvelles idées propices à faire avancer les connaissances sur les moyens de combattre la malaria.

Les chercheurs africains ont souvent été associés à certaines de ces initiatives encouragées ou supportées par des organisations internationales comme l'OMS (programme TDR) ou la Banque mondiale ou par des organismes gouvernementaux tel le NIH (Instituts nationaux de la santé) des États-Unis, ainsi que par des sources privées telles que la Fondation de Bill et Melinda Gates qui est devenue, à travers le MVI, PATH, une source majeure de financement de la recherche sur le vaccin contre le paludisme. Les coopérations bilatérales, européennes et américaines, jouent également un rôle déterminant dans cette dynamique mondiale.

L'adhésion à un partenariat offre l'opportunité à une équipe de recherche appartenant à un pays en voie de développement de renforcer ses capacités dans les domaines des techniques de pointe. Elle a aussi le mérite de la contraindre à accepter et à respecter les normes internationales, comme par exemple le GCPs (système de normes des bonnes pratiques cliniques). L'adhésion à un standard international éthique et scientifique conforte la validité des résultats obtenus et leur acceptation par la communauté scientifique. Les réseaux permettent enfin l'obtention des ressources financières et matérielles, en facilitant l'accès à l'information concernant les appels d'offres lancés par les organismes de financement.

La notion de partenaire d'un réseau doit être étendue aux communautés impliquées dans les activités des sites d'essais cliniques. Cette qualité de partenaire sera d'autant plus facilement reconnue que l'on apportera davantage de soins à n'utiliser les services de ces communautés que dans le respect des règles de l'éthique biomédicale. Des modalités originales de mise en œuvre des principes éthiques pourront même souvent découler des demandes ou des suggestions des membres de ces communautés.

Pour l'établissement d'un partenariat avec les communautés impliquées dans un programme de recherches, il est indispensable, bien entendu, de respecter leurs structures. Les personnes particulièrement influentes, identifiées au préalable et contactées, devront être convaincues du bien fondé des demandes émanant des chercheurs et des bénéficiaires que la population retirera de sa coopération. Lors de l'essai clinique d'un médicament ou d'un vaccin, la coopération de ces personnes est fondamentale pour le bon déroulement des opérations. Ce sont elles, en effet, qui contrôlent habituellement l'entrée des étrangers dans la communauté et qui sont les mieux à même de donner un sens à l'intervention des chercheurs et à encourager la population à s'impliquer dans l'essai comme un partenaire à part entière, ce qui facilite d'autant l'application des principes éthiques les plus élémentaires, comme l'obtention d'un consentement éclairé qu'il soit écrit, oral devant témoins, individuel ou collectif.

## Suggestions et perspectives

Le développement d'une capacité de recherche en Afrique est un investissement rentable à long terme. Sur ce continent, les équipes d'essais cliniques doivent répondre obligatoirement aux critères définis par la Conférence internationale d'harmonisation (ICH) et les plateaux techniques doivent

permettre le déroulement d'essais de phases I, II et III ainsi qu'une réelle capacité de gestion des données. C'est seulement à ces conditions qu'ils pourront prétendre pouvoir s'inscrire dans un nouveau type de partenariat Nord-Sud de conduite des essais cliniques, dans un climat de confiance impliquant un véritable partage de toutes les informations et de tous les résultats.

Un effort doit être également fait dans le domaine de l'éthique, tant par les chercheurs que par les comités chargés d'en définir et d'en faire appliquer les règles.

Les essais cliniques, en Afrique, sur les candidats vaccins antipaludiques, doivent être systématiquement accompagnés d'hypothèses secondaires fondamentales : mémoire immunologique, gènes exprimés par le parasite et l'homme, mécanismes de la pathogénie, etc. afin d'identifier de nouveaux candidats-vaccins et de nouveaux « paradigmes » scientifiques.

Les chercheurs africains doivent enfin apporter une contribution scientifique réelle et conséquente et éviter les comportements de « collecteurs de données et d'échantillons ». Pour cela, il est absolument indispensable de développer une culture de la recherche en Afrique.

## Conclusion

Le paludisme reste encore un problème majeur de santé publique en Afrique au sud du Sahara. Les outils actuels de lutte ne pourront pas à eux seuls éliminer ce fléau. Les vaccins antipaludiques seront les bienvenus dans un proche avenir. Ils permettront de nous rapprocher de l'objectif ultime de toute lutte contre une maladie transmissible : son éradication.

## Références bibliographiques

- ALONSO PL, SACARLAL J, APONTE JJ, LEACH A, MACETE E, AIDE P *et al.* – Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet*, 2005, **366**, 2012-2018.
- BALLOU WR, AREVALO-HERRERA M, CARUCCI D, RICHIE TL, CORRADIN G *et al.* – Update on the clinical development of candidate malaria vaccines. *Am J Trop Med Hyg*, 2004, **71**, 239-247.
- BENNETT S – Solexa Ltd. *Pharmacogenomics*, 2004, **5**, 433-438.
- CHATTERJEE S, PERIGNON JL, VAN MARCK E & DRUILHE P – How reliable are models for malaria vaccine development? Lessons from irradiated sporozoite immunizations. *J Postgrad Med*, 2006, **52**, 321-324.
- CLYDE D, MOST H, MCCARTHY VC & VANDERBERG JP – Immunization of man against sporozoite-induced falciparum malaria. *Am J Med Sci*, 1973, **266**, 169-177.
- COX-SINGH J, DAVIS TM, LEE KS, SHAMSUL SS, MATUSOP A *et al.* – *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis*, 2008, **46**, 165-167.
- DICKO A, DIEMERT DJ, SAGARA I, SOGOBA M, NIAMBELE MB *et al.* – Impact of a *Plasmodium falciparum* AMA1 vaccine on antibody responses in adult Malians. *PLoS One*, 2007, **17**, 1045.
- DRUILHE P & BOUHAROUN-TAYOUN – Antibody-dependent inhibition assay. In: *Methods in molecular medicine*, Vol. 72: Malaria methods and protocols. Ed: DOOLAN DL, Humana Press, Totowa, NJ, 529-534 (2002).

9. DRUILHE P, SPERTINI F, SOESOE D, CORRADIN G, MEJIA P *et al.* – A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill *Plasmodium falciparum*. *PLoS Med*, 2005, **2**, e344.
10. DUFFY PE, KRZYCH U, FRANCIS S & FRIED M – Malaria vaccines: using models of immunity and functional genomics tools to accelerate the development of vaccines against *Plasmodium falciparum*. *Vaccines*, 2005, **23**, 2235-2242.
11. GARDNER MJ, HALL N, FUNG E, WHITE O, BERRIMAN M *et al.* – Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 2002, **419**, 498-511.
12. HOLT RA, SUBRAMANIAN GM, HALPERN A, SUTTON GG, CHARLAB R *et al.* – The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, 2002, **298**, 129-149.
13. JONGWUTIWES S, PUTAPORNTIP C, IWASAKI T, SATA T, KANBARA H – Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. *Emerg Infect Dis*, 2004, **10**, 2211-2213.
14. MATUSCHEWSKI K & MUELLER AK – Vaccines against malaria - an update. *FEBS J*, 2007, **274**, 4680-4687.
15. MU J, AWADALLA P, DUAN J, MCGEE KM, KEEBLER J *et al.* – Genome-wide variation and identification of vaccine targets in the *Plasmodium falciparum* genome. *Nat Genet*, 2007, **39**, 126-130.
16. NUSSENZWEIG RS, VANDERBERG, MOST H, & ORTON C – Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature*, 1967, **216**, 160-162.
17. THERA MA, DOUMBO OK, COULIBALY D, DIALLO DA, SAGARA I *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, **24**, e34.
18. VOLKMAN SK, SABETI PC, DECAPRIO D, NEAFSEY DE, SCHAFFNER SF *et al.* – A genome-wide map of diversity in *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet*, 2007, **39**, 113-119.
19. YOELI M – Chadwick lecture. Cerebral malaria--the quest for suitable experimental models in parasitic diseases of man. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1976, **70**, 24-35.