

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710126985.2

[51] Int. Cl.

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/005 (2006.01)

A01N 43/04 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 11 月 28 日

[11] 公开号 CN 101077416A

[22] 申请日 2003.10.22

[21] 申请号 200710126985.2

分案原申请号 200380103878.8

[30] 优先权

[32] 2002.10.23 [33] US [31] 60/420,265

[32] 2003. 2. 13 [33] US [31] 60/447,026

[71] 申请人 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司

地址 比利时里克森萨特

共同申请人 由海军部长代表的美利坚合众国

[72] 发明人 S·L·霍夫曼 R·王

J·E·爱泼斯坦 J·D·科恩

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 3 页 说明书 76 页 附图 6 页

[54] 发明名称

抗疟疾的疫苗接种方法

[57] 摘要

本发明涉及通过疫苗接种抗疟疾感染的方法。本发明方法涉及利用基于 DNA 的疫苗引发抗疟疾免疫应答和用基于蛋白质的疫苗加强该应答。本发明方法也涉及通过用基于蛋白质的疫苗进行加强来拓宽所产生的免疫应答。

1. 如下疫苗在制备免疫人以抵抗导致疟疾的病原体的药物中的用途，所述疫苗包括：

a) 含有编码选自 CS 蛋白质或其片段的至少一种第一疟疾抗原的至少一种多核苷酸的引发疫苗；和

b) 含有至少一种多肽的加强疫苗，其中所述多肽包含选自 CS 蛋白质或其片段的至少一种第二疟疾抗原，所述至少一种第二疟疾抗原与所述至少一种第一疟疾抗原共有至少一种表位，

其中引发疫苗的施用引发了 CD8+ T 细胞，而加强疫苗的随后施用引起对引发的 CD8+ T 细胞的回忆，拓宽引发的 CD8+ T 细胞应答，并导致抗疟疾 CD8+ T 细胞、抗疟疾 CD4+ T 细胞和抗疟疾抗体的产生。

2. 权利要求 1 的用途，其中第二疟疾抗原含有 CS 蛋白质的羧基端部分。

3. 权利要求 1 或 2 的用途，其中第二疟疾抗原排除 CS 蛋白质羧基末端 12 个氨基酸。

4. 权利要求 1 的用途，其中引发疫苗和/或加强疫苗含有额外的疟疾抗原。

5. 权利要求 1 的用途，其中引发疫苗含有编码全长 CS 蛋白质的多核苷酸，该多核苷酸处于异源启动子控制下的 DNA 质粒中。

6. 权利要求 1 或 5 的用途，其中编码 CS 蛋白质或其片段的多核苷酸处于异源启动子 HCMV IE 控制下。

7. 权利要求 6 的用途，其中加强疫苗含有与 TH1 佐剂组合的 RTS,S。

8. 权利要求 6 的用途，其中加强疫苗含有 QS21 和 3D-MPL。

9. 权利要求 1 的用途，其中多核苷酸以病毒载体的形式施用。

10. 权利要求 9 的用途，其中病毒载体选自单纯疱疹病毒、慢病毒、腺病毒和腺相关病毒。

11. 权利要求 9 或 10 的用途，其中载体是复制缺陷型人或猿腺病毒。

12. 权利要求 1 的用途, 其中加强剂量施用 1 到 5 次。

13. 权利要求 1 的用途, 其中导致疟疾的病原体是恶性疟原虫。

14. 用于免疫人以抵抗导致疟疾的病原体的试剂盒, 其包含:

a) 含有编码选自 CS 蛋白质或其片段的至少一种第一疟疾抗原的至少一种多核苷酸的引发疫苗; 和

b) 含有至少一种进一步包含选自 CS 蛋白质或其片段的至少一种第二疟疾抗原的多肽的加强疫苗, 所述至少一种第二疟疾抗原与所述至少一种第一疟疾抗原共有至少一种表位,

其中引发疫苗的施用引发 CD8⁺ T 细胞, 而加强疫苗的随后施用引起对引发的 CD8⁺ T 细胞的回忆, 拓宽引发的 CD8⁺ T 细胞应答, 并导致抗疟疾 CD8⁺ T 细胞、抗疟疾 CD4⁺ T 细胞和抗疟疾抗体的产生。

15. 权利要求 14 的试剂盒, 其中第二疟疾抗原含有 CS 蛋白质的羧基端部分。

16. 权利要求 14 或 15 的试剂盒, 其中第二疟疾抗原排除 CS 蛋白质羧基末端 12 个氨基酸。

17. 权利要求 14 的试剂盒, 其中引发疫苗和/或加强疫苗含有额外的疟疾抗原。

18. 权利要求 14 的试剂盒, 其中引发疫苗含有编码全长 CS 蛋白质的多核苷酸, 该多核苷酸处于异源启动子控制下的 DNA 质粒中。

19. 权利要求 14 或 18 的试剂盒, 其中编码 CS 蛋白质或其片段的多核苷酸处于异源启动子 HCMV IE 控制下。

20. 权利要求 14 的试剂盒, 其中加强疫苗含有与 TH1 佐剂组合的 RTS,S。

21. 权利要求 14 或 20 的试剂盒, 其中加强疫苗含有 QS21 和 3D-MPL。

22. 权利要求 14 的试剂盒, 其中多核苷酸以病毒载体的形式施用。

23. 权利要求 22 的试剂盒, 其中病毒载体选自单纯疱疹病毒、慢病毒、腺病毒和腺相关病毒。

24. 权利要求 22 或 23 的试剂盒, 其中载体是复制缺陷型人或猿腺病

毒。

25. 权利要求 14 的试剂盒，其中加强剂量施用 1 到 5 次。

抗疟疾的疫苗接种方法

相关申请的交叉引用

本申请基于 2002 年 10 月 23 日提交的美国临时申请 S.N. 60/420,265 (Attorney Docket No. 4012.6001)和 2003 年 2 月 13 日提交的美国临时申请 S.N. 60/447,026 (Attorney Docket No. 4012.6002), 并要求其权利。本申请基于这些临时申请的整个公开内容, 并在此处将其并入为参考。

背景技术

疟疾是热带和亚热带最严重的公共健康问题之一。在发展中世界, 每年有 300 到 500 百万人新感染疟原虫, 高达 2.7 百万人死于疟疾(110)。恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)是负责疟疾所致的大多数死亡的疟原虫物种。

恶性疟原虫的生命周期存在 4 个分离的阶段, 其中有 3 个存在于人体内。一般地见 115。在第一阶段, 在唾腺中携带传染性孢子的蚊子从人处获取血液, 并在吸血时将这些孢子传递到人的血流中。一旦进入肝脏实质细胞, 孢子便复制形成裂殖子。在第二阶段, 裂殖子穿行于血流, 感染红细胞(RBCs)。红细胞被裂殖子充满后就会破裂, 释放出感染新的红细胞的后代。贫血是这一阶段感染的常见症状。最后, 这些红细胞中的一些也将产生雄性和雌性配子体(第三阶段)。在最后的阶段, 未感染的蚊子以感染的人为食, 摄入配子体。在蚊子中, 雌性配子体的受精最终导致传染性孢子的产生, 从而完成周期。

当病原体如恶性疟原虫进入人体, 身体通过激活免疫系统而产生应答。首先产生一般性应答, 之后是病原体特异的应答。病原体特异的应答以侵入的病原体独特的抗原为目标。病原体特异的应答的两个主要的武器是细胞和体液应答。 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞参与细胞免疫应答。具体的是, $CD8^+$

T 细胞产生 γ 干扰素 (IFN- γ) 之类的细胞因子, γ 干扰素对免疫系统的其它组分 (如巨噬细胞) 具有多种刺激效果。一种特殊的 $CD8^+$ T 细胞——细胞毒性 T 淋巴细胞(CTLs)特异地杀死在其表面表达病原体抗原的感染细胞。相反, $CD4^+$ T 细胞或 T 辅助细胞促进细胞毒性 T 淋巴细胞的发育并诱导 B 细胞分裂并最终产生抗体。T 辅助细胞可以被分成两个亚类——TH1 和 TH2 $CD4^+$ T 细胞, 根据它们产生的细胞因子的类型而鉴别。病原体特异的免疫应答的第二个武器由体液应答组成, 其中 B 细胞复制、分化、并最终产生直接结合病原体的抗体。抗体对于包被没有与任何宿主细胞相联系的病原体特别有用。然后, 吞噬细胞 (如巨噬细胞) 吞没抗体包被的病原体。

就疟疾感染而言, 病原体特异性免疫应答的不同武器在恶性疟原虫生命周期的特定阶段最为有效。当传染性子孢子穿行到肝脏并进入肝细胞时, 该子孢子变为细胞内病原体, 在感染的细胞外只花费很少的时间。在这一阶段, $CD8^+$ T 细胞和 $CD4^+$ T 细胞特别重要, 因为这些 T 细胞和它们的细胞因子产物 (如 γ -IFN) 主要负责杀死感染的宿主细胞。来自 Naval Medical Research Center (NMRC) 疟疾项目和其它实验室的大量数据表明鼠疟疾中细胞内肝脏寄生虫的消除依赖于针对肝脏阶段寄生虫所表达的肽的 $CD8^+$ T 细胞应答(45)。 $CD8^+$ T 细胞的耗竭将废除抵御裂殖子攻击的保护作用(27,31, 90,93, 108)并且向首次用于实验的动物过继转移 $CD8^+$ T 细胞可以赋予保护作用(56,85, 87,109)。

DNA 疫苗诱导细胞介导的免疫应答, 包括抗原特异的 $CD8^+$ 细胞毒性 T 淋巴细胞(CTLs)和偏向 Th1 的 $CD4^+$ T 细胞应答, 它们是抵御细胞内病原体和肿瘤的主要保护机制(6,11, 45,63, 104,106)。然而, 迄今 DNA 疫苗被证明对于在人中诱导保护性免疫应答而言不是最佳的。

相反, 当疟疾感染达到第二阶段并感染红细胞后, 感染性裂殖子不仅在红细胞内复制, 而且在血流中自由循环。由于两个原因, 抗体应付感染的这一阶段最为有效。首先, CTLs 需要感染的宿主细胞在称为 MHC-I 的特殊蛋白质上呈递抗原。红细胞不表达 MHC-I, 因此降低了 CTLs 的效

力。其次,如上所讨论的,抗体介导没有与宿主细胞发生关系的病原体的吞噬。因此,在感染的第二阶段,B细胞和刺激B细胞的 $CD4^+$ T细胞对于抗击感染而言都是重要的。

针对恶性疟原虫的人免疫应答的复杂性,以及具有阶段特异的蛋白质表达的多阶段寄生虫生命周期,导致开发针对恶性疟原虫的疫苗的困难。但是,仍然需要疟疾疫苗。

恶性疟原虫的子孢子阶段已经被鉴定为疟疾疫苗的潜在目标。子孢子主要的表面蛋白质被称作环子孢子蛋白(CS蛋白)。已克隆、表达并测序了来自7G8株的蛋白质(21)。其特征在于具有中心免疫显性的重复区,该重复区包含重复37次的4肽Asn-Ala-Asn-Pro,但是被4个次要的重复Asn-Val-Asp-Pro所点缀。在其它株中,主要和次要重复区的数量以及它们的相对位置有所变化。此中心部分的两侧是由非重复性氨基酸序列所组成的N和C端部分,非重复性氨基酸序列被称为CS蛋白质的非重复部分。

Vical, Inc. San Diego, CA 和 Naval Medical Research Center 开发了一种含有表达恶性疟原虫环子孢子蛋白(PfCSP)基因的质粒的基于DNA的疫苗(47)。该疫苗由以每毫升2500 μ g的浓度含于磷酸缓冲盐溶液(PBS)的裸DNA组成。所述质粒含有编码完整PfCSP基因的全长基因,具有由CMV IE基因的增强子和启动子控制的表达、并具有CMV IE基因的5'非翻译区和牛生长激素基因的转录终止子(64)。为了增强抗原在哺乳动物细胞中的表达和分泌,将编码人组织纤维酶原激活物蛋白(hTPA)前导肽的序列加到编码序列的5'端。含于PfCSP质粒的两个开放阅读框编码卡那霉素抗性蛋白和hTPA前导区/PfCSP融合蛋白质(40)。PfCSP质粒不含有已知的病毒或致癌蛋白质编码序列。该质粒含有6261个核苷酸碱基对并具有 4.07×10^6 gmu的分子量(假定DNA的平均碱基对为650 gmu)。

使用克隆的DNA的片段构建PfCSP DNA质粒,克隆的DNA的片段使用标准分子遗传技术从纯化的质粒获得。所述质粒产生于用卡那霉素选择培养基培养的细菌(大肠杆菌(*E. coli*))细胞。发酵细菌细胞后纯化质粒DNA。

在临床试验开始之前,在 NMRC 进行了 PfCSP DNA 疫苗的临床前免疫原性研究。具体地,在通过免疫印迹分析评估抗原表达之后,将 PfCSP 质粒瞬时转染进培养的哺乳动物细胞。还在小鼠和非人灵长类中测试了质粒诱导抗原特异的抗体和 CTL 应答的能力(40, 105)。在小鼠模型中的研究证明了在用质粒 DNA 免疫之后抗原特异的 CTL 和抗体应答的诱导(30)。如其它系统中报导的,研究进一步确立了免疫的肌肉(IM)路径对于 $CD8^+$ Th1 免疫应答的诱导是最佳的(30)。此外,随后的研究表明,经由 IM 路径以单独的 PfCSP 质粒或与另外四种编码其它红细胞前肝脏阶段恶性疟原虫蛋白质的质粒组合的 PfCSP 质粒免疫的所有六只恒河猴(Rhesus monkey)都具有可检测的抗原特异的 CTL 和/或抗体应答(106)。

在用于临床试验之前,进行了广泛的临床前安全性研究。这些研究包括 1)经由静脉(IV)路径或 IM 路径施用的质粒 DNA 的小鼠组织分布研究; 2)在小鼠和兔中的反复剂量安全性研究; 和 3)小鼠中的质粒 DNA 整合研究(67, 75)。这些研究被概括如下。

质粒分布研究: Parker 等人评估了小鼠不同组织中的质粒分布(75)。小鼠经由 IV 或 IM 接受一次剂量的 PfCSP 质粒,该剂量是推荐给人的最高 mg/kg 剂量的 25 倍。在以下时间点收获组织并使用 PCR 评估质粒 DNA 的存在: IV 施用后的 1 小时、两天和 4 周,以及 IM 施用后的 2 天、4 周和 8 周。IM 施用后的 1 小时发现质粒 DNA 分布于所有组织。到 IM 施用后的两天,只在骨髓、血液和注射位点发现质粒,在注射位点具有最高水平。到 IM 施用后的 1 周,只在注射位点检测到质粒 DNA。IV 施用后,发现 PfCSP DNA 质粒以低水平分布于除性腺和脑外的所有组织。IV 施用后 4 周,只在一个动物的肺中检测到 DNA 质粒。

反复剂量安全性研究: Parker 等人也致力于在小鼠和兔中给予反复剂量的该疫苗的安全性(75)。在小鼠的反复剂量安全性研究中,在 28 天的时期内,动物接受 8 次反复的 IM 注射 PfCSP DNA 质粒,剂量为 $1.0\mu\text{g}$ 、 $10\mu\text{g}$ 和 $100\mu\text{g}$ (累积剂量基于 mg/kg 相当于建议的人剂量的 5-500 倍)。没有异常的血液学或血清化学、异常的组织病理学、或诱导针对 dsDNA 的抗体

或抗核抗体的迹象。在兔子的反复剂量安全性研究中，动物接受6次每周一次的IM质粒注射，剂量为150 μ g和450 μ g。如在鼠中的研究，再次没有异常的血液学或血清化学、异常的组织病理学、或针对dsDNA的抗体或抗核抗体的诱导的迹象。因此，Parker的研究表明PfCSP质粒的分布遍布于宿主组织，该质粒在这些组织中的一些保留长久的时期，并且该质粒用于人是安全的，因为当将其施用于志愿者后没有出现副反应。

整合研究：Martin等人评估了是否PfCSP质粒整合进宿主染色体DNA(67)。向各小鼠注射单次剂量的质粒DNA，在注射后的第30和60天，以灵敏度为每微克DNA 1-10拷贝的PCR分析来分析组织。总体而言，没有提供质粒整合的证据，并暗示如果存在质粒DNA向基因组DNA的整合，其水平是极低的，比预期的自发突变水平低几千倍。

研究人员证实了PfCSP疫苗的安全性之后，NMRC开展了两个一期临床试验。在第一个试验中，健康的、从未感染过疟疾的成年志愿者于1997与1998年之间接受了PfCSP DNA疫苗(33、62、105、106)。总共入选了20名志愿者，在20 μ g、100 μ g、500 μ g和2500 μ g的4个剂量组中每组分配5名志愿者，以一月的间隔给以3次剂量。如Le等人所描述的，所有这些剂量都具有良好的耐受性，没有出现剧烈或严重的不良事件(62)。出现了4个中度的不良事件；所有这些不良事件都被认为不可能与疫苗的施用有关。最普遍的抱怨是注射位点的疼痛和触痛。这是温和的，持续不超过48小时，并且不需要药物治疗。没有志愿者具有任何显著的血清生物化学异常。

20个被试者都没有出现对于抗dsDNA抗体的诱导或ANA(抗核抗体)效价从基线的增加。Wang等人通过针对风干孢子的间接荧光抗体测试(IFAT)和针对重组和合成肽的酶联免疫吸附测定(ELISA)进行评估，证明没有志愿者发展出了抗PfCSP抗体。但是，20个志愿者中有11位具有抗原特异的、遗传限制的CTL活性。具体而言，CTL反应是CD8⁺ T细胞依赖的、肽特异的和遗传性HLA-限制的，因为没有或几乎没有与对照肽一起孵育的自体靶的识别或与特异肽一起孵育的I型HLA-错配靶的识别。

此外,DNA-诱导的 CTLs 被多种 HLA 等位基因遗传性限制(105,107)。CTL 阳性是剂量相关的。在其余 9 个自愿者中,在每次免疫之后进行的任何试验中均没有检测到 CTLs。

在开始于 1999 年 4 月的第二个临床试验中,通过三种路径,在 0、4 和 8 周用 P/CSP DNA 疫苗免疫 14 名健康成年自愿者,三种路径分别为:常规针头 IM (肌肉)、Biojector® IM 和 Biojector® IM (剂量的 70%) 加 ID (皮内) (剂量的 30%)。Biojector® 是一种无针头的喷射注射装置。考虑到研究的规模小,自愿者的 HLA 多样性被限制在这一群体中最普通的 I 型 HLA 亚型——HLA A2,以允许遗传性限制的 CTL 反应的组间比较。参与这一研究的自愿者中的 10 位随后参与了使用本发明方法的其它实验。这一实验和它的结果被进一步描述于以下“实施例”部分。

总体而言,该疫苗是安全和良好耐受的。自愿者没有经历任何与疫苗有关的剧烈或严重的不良事件(AEs)。没有自愿者经历了与通过所测试的 3 种路径中任何一种施用 P/CSP 疫苗有关的显著实验室异常(33)。

就针对疫苗的免疫反应而言,通过针对风干孢子的 IFAT 和针对重组和合成肽的 ELISA 评估,没有自愿者发展出了抗 P/CSP 抗体(107)。P/CSP 特异的抗体的缺乏在某种程度上是令人吃惊的,因为 Biojector 喷射注射装置和 ID 路径免疫都与动物模型中改善的抗体产生有关(1, 37, 62)。通过 IFN- γ 在 ELISPOT 试验中测量 T 细胞应答。为了完成这些试验,使用了包括 P/CSP 质粒编码的 CSP 蛋白质的 T 细胞表位的肽。

注射针 IM 组的所有 4 名自愿者在 17.6% (26/148)的试验中响应 7/9 的肽。Biojector IM 组的所有 5 名自愿者在 26.5% (49/185)的试验中响应 9/9 的肽。Biojector IM/ID 组 5 名自愿者中的 4 人在 17.3% (32/185)的试验中响应 7/9 的肽。14 名自愿者中有 8 人具有可检测到的 CTL 应答。在这 8 人中,有两人在注射针 IM 组 (在总共的 5/126 试验中响应 4/7 的肽), 3 人在 Biojector IM 组 (在总共的 11/168 试验中响应 6/8 的肽), 3 人在 Biojector IM/ID 组 (在总共的 14/162 试验中响应 6/6 的肽) (107)。总体而言,这些试验确定了 Biojector IM 路径接种对于诱导抗原特异的 IFN- γ 应

答而言是最有效的, Biojector IM 或 IM/ID 路径对于诱导抗原特异的 CTL 应答而言是最有效的。

总之, 通过对肽-特异的、遗传性限制的、CD8+ T 细胞依赖的 CTL 活性的测量和通过对 IFN- γ 产生的测量(105, 107), 这两个临床试验证明 PfCSP 多核苷酸疫苗能够引起抗原特异的、遗传性限制的 CD8+ T 细胞应答。当在施用最后一次 PfCSP 多核苷酸疫苗之后一年测试时, 来自第二个临床实验的自愿者在上述测量中没有表现出任何 CD8+ 抗原特异的 T 细胞应答。

如以上所讨论的, 除了 CD8+ T 细胞应答外, 针对 PfCSP 蛋白质的任何肽的抗体在控制疟疾感染中也扮演着重要的角色(1, 78, 99)。虽然许多 PfCSP DNA 疫苗的受者发展出了 CD8+ 抗原特异的 T 细胞应答, 但是没有人发展出了任何抗-CSP 的特异性抗体。相反, 研究人员已经证明 RTS, S 能够引起对 CSP 的强抗体应答(53, 99, 100)。RTS, S 也是有效的 TH-1 型细胞和体液免疫的诱导物, 其中 RTS, S-特异的 CD4+ T 细胞应答主要集中在 Th2R 免疫显性多态区 (61)。

施用两次或 3 次 RTS, S 剂量, 对于在最后一次免疫后的两到 3 周用恶性疟原虫攻击的自愿者, 有超过 60 名志愿者(平均 44%)受到保护 (8, 54, 99), 并且在最后一次免疫后为 70% 的半免疫冈比亚人提供了持续两个月的保护(8)。然而, 这一保护的持续时间短(8, 100)。用 RTS, S 免疫诱导抗 PfCSP 抗体和 CD4+ T 细胞依赖的 IFN- γ 应答, 但是没有检测到 CD8+ T 细胞依赖的 CTL 或 IFN- γ 应答(61)。

本发明

本发明提供新的疫苗方法, 所述方法使用含有编码至少一种第一疟疾抗原的多核苷酸的引发疫苗(priming vaccine)引发(prime)免疫应答, 然后使用含有至少一种包含至少一种第二疟疾抗原的多肽的加强疫苗(boosting vaccine)来加强(boost)引发的应答, 其中所述第二疟疾抗原与引发疫苗的至少一种第一疟疾抗原具有至少一种共同的表位。这一组合为目

前的抗疟疾接种策略提供了3点重要的改进。

首先,两种异源疫苗的组合激活免疫系统的两种武器——CD8+ T细胞、CD4+ T细胞和抗体。具体而言,基于使用 PfCSP 疫苗或 RTS,S 疫苗的临床试验结果,任一种疫苗都不能单独建立可持续的激起 CD8+ T细胞、CD4+ T细胞和针对 CSP 的抗体的免疫应答。本发明通过组合该两种疫苗而改善这一结果,由此引起所有3种类型的应答。具体而言, PfCSP 疫苗引发 CD8+ T细胞应答, RTS,S 疫苗加强此 T细胞应答。因为 RTS,S 疫苗也引起抗 CSP 抗体和 CD4+ T细胞,所以产生的针对 CSP 的免疫应答包括 CD8+和 CD4+ T细胞应答和抗体应答。我们称这一总体的接种策略——用一种疫苗引发,然后用与引发疫苗共享至少一种共同表位的不同疫苗来加强——称为“引发/加强”策略。

本发明对现有接种策略的第二个重要改进在于使用蛋白质疫苗在人中刺激 CD8+ T细胞应答的事实。本发明的方法通过使用基于蛋白质的疫苗来加强 T细胞应答,基于蛋白质的疫苗迄今被认为对于刺激 CD8+ T细胞应答是无效的(61)。

最后,本发明提供的对现有抗疟疾接种策略的第三个重要的改进是它在两个方面拓宽了免疫应答。首先,通过 DNA 引发/RTS,S 加强诱导了组成更宽的产生 IFN- γ 的 T细胞群体(Tcl 和 Th1),因为使用 DNA 引发引起了 CD4+ T细胞依赖的 CD8+ 1型(Tcl)和 CD4+ 1型(Th1) IFN- γ 应答,而单独的 RTS,S 只诱导 CD4+ T细胞依赖的 Th1 IFN- γ 应答。第二,当单独施用时, PfCSP 疫苗引发一确定的 CD8+ T细胞群体。同样, RTS,S 疫苗仅引发一确定的 CD4+T细胞群体和制造一套确定的抗体的 B细胞。然而,当组合后,产生的 CD8+ T细胞应答不仅覆盖最初由 PfCSP 疫苗引发的表位,该应答还覆盖在此 PfCSP 引发接种后最初未鉴定到的其它表位。根据本领域对蛋白质疫苗已有的了解,蛋白质疫苗会加强并拓宽已建立的 CD8+ T细胞应答的概念是出乎意料的。

发明简述

本发明涉及通过免疫人来抵御疟疾的方法，包括步骤：a)通过施用含有编码至少一种疟疾抗原的多核苷酸的引发疫苗引发免疫应答；和 b)通过随后施用含有至少一种多肽的加强疫苗来加强引发的免疫应答，其中所述多肽包含至少一种与引发疫苗的一种或多种疟疾抗原共有至少一种相同表位的疟疾抗原，从而激起针对疟疾的细胞免疫应答和体液免疫应答。

在本发明的一个实施方案中，引发疫苗编码存在于加强疫苗中的同样多肽。在其它实施方案中，引发疫苗编码存在于加强疫苗中的疟疾抗原的一部分，或者存在于加强疫苗中的多肽是引发疫苗编码的疟疾抗原的一部分。在另一个实施方案中，所述疫苗共享至少一种疟疾 T 细胞表位。而在另一个实施方案中，所述疫苗共享至少一种疟疾 CD8+ T 细胞表位。在一个替代的实施方案中，两种疫苗共享几种疟疾表位。

任何导致疟疾的病原体均可以被用于本发明的方法。在一个实施方案中，病原体是恶性疟原虫。在其它实施方案中，病原体可以是间日疟原虫 (*P. vivax*)、卵形疟原虫 (*P. ovale*) 或三日疟原虫 (*P. malariae*)。同样，本发明的方法可以使用在病原体生命周期的任何阶段表达的任何疟疾抗原。在一个实施方案中，引发疫苗编码并且加强疫苗含有一种或多种在病原体的前红细胞阶段（包括肝脏阶段）表达的抗原。而在另一个实施方案中，引发疫苗的多核苷酸编码在感染的肝脏阶段表达的环子孢子蛋白的至少一部分并且加强疫苗含有环子孢子蛋白的至少一部分。还在另一个实施方案中，引发疫苗的多核苷酸编码基本上全部的环子孢子蛋白并且加强疫苗含有一部分的环子孢子蛋白。CS 蛋白的最小部分是含有至少一个表位或几个表位的免疫原性部分。在一个特定的实施方案中，引发疫苗含有 PfCSP 并且加强疫苗含有 RTS, S。在另一实施方案中，引发疫苗是 PfCSP 疫苗并且加强疫苗是 RTS, S 疫苗。

本发明还提供含有如这里所描述的引发和加强疫苗的药物试剂盒。

本发明还提供如这里所描述的引发和加强疫苗在制备用于预防或减轻疟疾严重性的疫苗中的用途。

因此，本发明提供编码至少一种疟疾抗原，特别是 CS 蛋白或它的片

段的多核苷酸——作为引发疫苗——以及含有至少一种疟疾抗原，特别是 CS 蛋白或它的片段的多肽——作为加强疫苗——在制造用于疟疾的引发-加强疫苗中的用途。在一个特定的实施方案中，多核苷酸为 DNA 质粒的形式，优选表达全长的 CS 蛋白或它的片段。编码 CS 蛋白或片段的多核苷酸可以处于本领域已知的异源启动子的控制之下。在一个实施方案中，启动子为 HCMV IE 启动子，任选地包括外显子 1。在一个特定的实施方案中，加强疫苗的多肽是含有 CS 蛋白羧基端部分的杂合蛋白质，所述部分为例如羧基端部分的至少 160 个氨基酸，任选地排除羧基末端 12 个氨基酸。引发和加强组合物中的任一种或两者都可以含有额外的疟疾抗原或其它抗原。

在根据本发明的这一方面的一个实施方案中，引发疫苗包含编码全长 CS 蛋白的多核苷酸，该多核苷酸存在于异源启动子控制下处于 DNA 质粒中，并且加强疫苗含有与 Th1 诱导佐剂（特别是含有 QS21、3D-MPL 和水包油乳剂的佐剂）组合的 RTS,S。可以以药物试剂盒形式提供引发和加强疫苗。

本发明对之前没有暴露过导致疟疾的病原体或已经有所暴露但是没有完全保护的人提供部分的、增强的或完全的保护。本发明也可以被用于降低发生疟疾感染的机会、降低人感染后患病的机会、降低人感染后疾病（如发烧）的严重性、降低感染者中的寄生虫浓度，或在人暴露于疟疾寄生虫时降低疟疾的死亡率。在疟疾成为地方流行病的区域，即使部分的保护也是有利的。例如，导致约 30% 的人口被保护的疫苗治疗策略可能对一个社区具有重要的影响。

附图简述

图 1 显示仅在 DNA 引发之后(Fig.1a)、仅在用 RTS,S 加强之前(Fig.1b)和在 RTS,S 加强之后 (Fig.1c)，每个阳性被试者和每种阳性肽的 CTL 应答。黑带表示含有测试肽和正确的 MHC 呈递的样品。点带 (stippled bar) 表示含有对照肽和正确的 MHC 呈递的样品。条纹带 (striped bar) 表示

含有测试肽但未有正确的 MHC 呈递的样品。用表达 PfCSP 的 ALVAC 对取自 DNA 引发之后(a)、加强之前(b), 或第一剂(志愿者号 6 = V6) 或第二剂(V2、3、8 和 9) RTS, S 后第二周(c)的新鲜 PBMCs 体外刺激 7 天, 并且在 5 小时的铬释放分析中, 针对与实验的 8-10 氨基酸的 PfCSP 衍生肽或对照肽(HLA-A*0201 限制的 HIV gag)(MHC+对照)一起孵育的 I 型 HLA-匹配的靶(MHC+肽)或错配的靶(非 MHC+肽)进行分析。只有当以实验和对照肽脉冲的靶细胞的裂解百分数差异 $\geq 10\%$ (其时, 效应细胞与靶细胞的比例(E:T)至少为 2) 时, 才认为应答是阳性的。以单一的 E:T 比例(20:1 或 40:1)提供各种肽与其同时评估的对照的裂解百分数。

图 2 表征分别在诱导和效应期涉及体外 IFN- γ 应答的 T 细胞。使用来自以 3 剂单独的 PfCSP DNA (V1 和 V5) 或两剂单独的 RTS, S (V19、V21 和 V22) 免疫的志愿者的冻结 PBMCs 进行 ELISPOT 试验, 该 PBMC 或者用对照 Dynabeads 处理, 或者临在用肽(a) Flu M A2、(b) TT-DR、(c) PfCSP DR.363 或(d)PfCSP DR. 316 培养之前耗竭 CD4⁺或 CD8⁺T 细胞。平行地, 在紧接用测试于 ELISPOT 试验的相同肽组培养 36 小时后的同一研究时间点, 通过实时 PCR 测量来自相同志愿者的选择性富集的 T 细胞群体(CD4⁺/CD45RA⁺、CD4⁺/CD45RA⁻、CD8⁺/CD45RA⁺和 CD8⁺/CD45RA⁻) 的 IFN- γ mRNA 表达水平(e)。

图 3 显示通过实时 PCR IFN- γ 测量的 T 细胞亚群中的 IFN- γ mRNA 表达水平。研究了从两名经 3 剂 PfCSP DNA (单独的 DNA) 引发及两剂 RTS, S 疫苗(DNA/RTS, S)加强后的志愿者(V1 和 V5)中获得的冰冻细胞。细胞与 PfCSP DR. 363 肽一起孵育 36 小时, 并被选择性富集和评估 IFN- γ mRNA 表达。DNA 免疫之后, 在志愿者 V1 的 CD45RA-亚群和志愿者 V5 的 CD45RA+亚群的 CD4⁺ T 细胞中, 而不是在 CD8⁺ T 细胞中 IFN- γ mRNA 表达适度(5-10 倍)上调。RTS, S 加强与两名志愿者的上调 CD4⁺ T 亚群中(而不是 CD8⁺ T 细胞中) IFN- γ mRNA 表达水平的显著(80-100 倍)增加相关。

图 4 显示对肽 DR. 316 的 IFN- γ 应答由第一剂 RTS, S 后的 DNA 诱导

模式(仅有 $CD8^+$ Tcl)向再次施用 RTS, S 疫苗后的两种模式的混合($CD8^+$ Tcl 和 $CD4^+$ Th1)转变。在用来自志愿者 V2 的细胞进行的离体 ELISPOT 中, 第一剂 RTS, S 后通过在培养之前耗竭 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞, 显著降低 IFN- γ 应答(DNA 诱导的 IFN- γ 应答的特征)。在第二剂的 RTS, S 疫苗之后, 只有 $CD4^+$ T 细胞耗竭才显著降低活性。平行地, 在效应期通过实时 PCR 测得(b) 第一剂 RTS, S 后 IFN- γ mRNA 表达水平在 $CD8^+$ 而不是 $CD4^+$ T 细胞中上调, 第二剂 RTS, S 后在 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞中都上调。

“2wkpl”指第一剂后两周, “2wkp2”指第二剂后两周。

图 5 显示 DNA 引发的/RTS, S 加强的志愿者中的抗体 IFAT 效价。在第一次 RTS, S 剂量之前, DNA 引发(+)和未引发(-)的、具有(+)和不具有(-)抗 HbsAg 抗体的志愿者中, 抗体效价以几何平均值 $\pm$ SE (95%的置信区间)表示。在用 RTS, S 第一次和第二次免疫之后进行了抗体分析。除了在第一次剂量后的第二周, DNA-/HBsAg+志愿者比 DNA+/HBsAg+具有显著更高的效价($P < 0.02$)外, 在任何组之间效价没有显著的差异。

发明详述

如这里所阐释的, 通过用含有编码至少一种疟疾抗原的多核苷酸的引发疫苗免疫人受者可以引发抗疟病感染的多手段免疫应答, 然后通过用含有至少一种多肽的加强疫苗免疫可以对此应答进行加强, 其中所述多肽包含至少一种与引发疫苗的一种或多种疟疾抗原具有至少一种相同表位的疟疾抗原。令人吃惊的是, 使用多肽疫苗, 本免疫方法加强和拓宽了引发的应答。

“疫苗”是含有施用于被试者时能诱导免疫应答的分子的物质的组合。疫苗可以含有多核苷酸分子、多肽分子和碳水化合物分子, 以及其衍生物和组合, 如糖蛋白、脂蛋白、碳水化合物-蛋白质缀合物、两种或多种多肽或多核苷酸的融合物等等。如本领域人员能够容易的理解的, 疫苗可以进一步含有稀释剂、佐剂、载体或它们的组合(83)。

可以单独或组合使用任何接种的方法或路径来向人受者传递多核苷酸

疫苗或蛋白质疫苗。施用的路径包括静脉内、肌内、皮下、皮内或粘膜。传递的方式可以变化,例如,可以经由 IV、IM、皮下或 ID 路径给人注射。可以经由粘膜路径给人受者接种。可另选的是,可以经由无针头的手段进行传递,如使用无针头的“基因枪”,如 Biojector®,或其它喷射注射装置,或经由生物轰击法传递。多核苷酸可以以含有 PfCSP 疫苗的 DNA 的细菌,或含有 PfCSP 疫苗的 DNA 的病毒传递。

适当的病毒载体的实例包括单纯疱疹病毒载体、痘苗病毒或甲病毒载体和逆转录病毒,包括慢病毒、腺病毒和腺相关病毒。在一个实施方案中,这些载体是复制缺陷型病毒载体。本领域技术人员了解使用这些病毒的基因转移技术。例如,可以使用逆转录病毒载体来将本发明多核苷酸稳定整合进宿主基因组,虽然可能并不建议这类重组。相比,复制缺陷型腺病毒载体保持为游离型并因此允许瞬时表达。

在一个特定的实施方案中,用作肝脏载体的腺病毒是复制缺陷型人或猿腺病毒。通常这些病毒含有 E1 缺失,可以生长于转化了 E1 基因的细胞系。适当的猿腺病毒是例如从黑猩猩分离的病毒。适合用于本发明的病毒实例包括 C68 (也被称为 Pan 9) (美国专利 No 6083 716, 在此引入为参考) 和 Pan 5、6 和 Pan 7 (WO 03/046124, 在此引入为参考)。因此,可以对这些载体进行操作以插入本发明的异源基因,以便能够表达基因产物。这类重组腺病毒载体的使用制剂和制作详细公开于引入为参考的 WO 03/046142。

疫苗可以由分开的组分组成。如这里所使用的,“分开的组分”指的是这样一种情形,其中所述疫苗实际上含有两种分开施用给被试者的分离的疫苗。就此意义而言,由分开组分组成的疫苗可以被视为含有分开的疫苗组分的试剂盒或包装。例如,在本发明的上下文中,包装可以含有多核苷酸疫苗组分和多肽疫苗组分。

当存在于疫苗中的一种或多种抗原导致被接种的受试者对该一种或多种抗原产生免疫应答时,疫苗“诱导”了免疫应答。如通过免疫系统的激活所证实的,被接种的受试者将产生免疫应答,所述免疫系统的激活包括

疫苗抗原特异的 T 细胞、疫苗抗原特异的 B 细胞、疫苗抗原特异的抗体和细胞因子的生成。可以通过若干方法测量产生的免疫应答，这些方法包括 ELISPOT、ELISA、铬释放试验、细胞内细胞因子染色、FACS 分析和 MHC 四聚体染色（以鉴定肽特异的细胞）。技术人员也可以使用这些方法来测量初次免疫应答和二次免疫应答。

“抗原”是能够在暴露于抗原的被试者体内引起免疫应答的物质。抗原通常是多肽并且是宿主免疫应答的焦点。“表位”或“抗原决定簇”是 T 细胞和抗体特异性结合的抗原部位。抗原可以含有多个表位。

本发明方法中使用的引发疫苗含有编码以下讨论的疟疾抗原的多核苷酸。引发疫苗可以是单独的 DNA 或者是处于细菌或病毒内的外源启动子控制下的 DNA。引发疫苗的多核苷酸存在于适当的递送载体，如质粒或其它载体，如细菌或病毒载体中。多核苷酸可以处于适当的启动子（如来自 HCMV IE 基因的启动子）的控制之下。以有效引发针对疟疾抗原的免疫应答的量施用引发疫苗。如这里所使用的，当抗原被呈递给 T 细胞或 B 细胞时，发生了免疫应答的“引发”。作为结果，在随后的再一次的免疫应答中，引发的细胞作为记忆细胞可以再次应答同样的抗原。因此，引发造成初次免疫应答并建立免疫记忆。本领域技术人员将意识到初次免疫应答是最初暴露于处于特殊背景中（如病原体或疫苗中）的抗原时的适应性免疫应答。然而，本领域技术人员也会意识到本发明并不限于在免疫学幼稚个体中使用引发疫苗。相反，也可以在已经暴露过抗原但没有接受过引发疫苗的个体中产生引发。

“有效的”引发剂量可以在 0.01 μg 至 50 mg 的 DNA 之间变化。可另选的是，剂量可以介于 1 μg 至 10 mg DNA 或 2.5 mg 至 5 mg DNA 之间。在使用多肽加强疫苗之前可以施用一次多核苷酸疫苗。在另一实施方案中，可以施用几次引发疫苗。接种的“有效”次数可以介于 1 到 5 次剂量。可另选的是，在施用加强疫苗之前，剂量的次数可以介于 1 到 3 剂或 1 到 2 剂。

“多核苷酸”通常指任何多聚核糖核苷酸(RNA)或多聚脱氧核糖核苷

酸(DNA),它们可以是未修饰的或修饰的 RNA 或 DNA。多核苷酸包括(并不限于)单链和双链 DNA、单链和双链区混合的 DNA、单链和双链 RNA、及单链和双链区混合的 RNA。多核苷酸也包括含有 DNA 和 RNA 的杂合分子,该分子可以是单链,或更常见的双链或单链和双链区的混合物。此外,“多核苷酸”涉及含有 RNA 或 DNA 或 RNA 和 DNA 二者的 3 链区。多核苷酸也包括为了稳定性或其它原因而含有一个或多个修饰碱基的 DNA 或 RNA,和具有修饰骨架的 DNA 或 RNA。“修饰”的碱基包括如三苯甲基化碱基和稀有碱基,如次黄嘌呤核苷。可以对 DNA 和 RNA 进行各种修饰;因此,“多核苷酸”包括通常在自然界中发现的化学、酶或代谢修饰的多核苷酸形式,以及病毒和细胞特征性的 DNA 和 RNA 的化学形式。寡核苷酸是相对短的多核苷酸。

多核苷酸序列的“片段”是指比参照序列短,但是保留被认为与参照多核苷酸序列相同的生物功能或活性的序列。片段编码参照多核苷酸序列编码的参照多肽的至少一个表位。如这里所使用的,当用于描述多核苷酸或多肽时,“基本上全部的”指若非较小的核苷酸碱基或氨基酸残基缺失,编码或代表完全的全长多核苷酸或多肽的分子。

本发明方法所使用的加强疫苗可以包含含有至少一种以下讨论的疟疾抗原多肽的融合蛋白质。在此疫苗中使用的多肽可以分离自天然来源,以重组蛋白产生于外源生物(如细菌),或经由化学手段合成。加强疫苗可以进一步含有额外的非疟疾多肽,以增强疟疾多肽的免疫原性。例如,可以使用部分或全部的乙肝病毒表面抗原。引发疫苗和加强疫苗共享至少一种共同的疟疾表位。

根据本发明,用于加强疫苗的合适的融合蛋白可以包含含有基本上全部的 CS 蛋白 C 端部分、4 个或更多个串联重复的免疫显性区、乙肝病毒表面抗原(HbsAg)的杂合蛋白。所述杂合蛋白包含含有与 CS 蛋白 C 端部分基本同源的至少 160 个氨基酸的序列。在一个实施方案中,CS 蛋白可以从 C 端缺少最后的 12 个氨基酸。适宜的杂合蛋白包括基本相应于恶性疟原虫 7G8 的 210-398 氨基酸的恶性疟原虫 CS 蛋白部分,该蛋白部分在

框架内经由线性接头与 HbsAg 的 N 端融合。接头可以包含来自 HbsAg 的 preS2 的一部分。

另一个实施方案是命名为 RTS, S 的杂合颗粒, 该颗粒描述于这里引入为参考的美国专利 5,928, 902 和国际专利申请 WO 93/10152。此杂合物的组成为: 1.) 由核苷酸 1059 至 1061 编码的来自酿酒酵母 TDH3 基因序列的甲硫氨酸残基(71); 2.) 来自通过用于构建杂合基因的克隆方法创造的核苷酸序列 (1062 至 1070) 的 3 个氨基酸——Met Ala Pro; 3.) 由核苷酸 1071 至 1637 编码的、代表恶性疟原虫 7G8 株环孢子蛋白(CSP) 210 至 398 氨基酸的一段 189 个氨基酸的链 (21); 4.) 由通过用于构建杂合基因的克隆方法创造的核苷酸 1638 至 1640 编码的氨基酸(Arg); 5.) 由核苷酸 1641 至 1652 编码的、代表乙肝病毒 (adw 血清型) pre S2 蛋白 4 个羧基端残基的 4 个氨基酸——Pro Val Thr Asn (103); 和 6.) 由核苷酸 1653 至 2330 编码的、规定乙肝病毒 (adw 血清型) S 蛋白的一段 226 个氨基酸的链。

以有效“加强”针对疟疾抗原的引发免疫应答的量施用加强疫苗。如这里所使用的, “加强”免疫应答指在通过最初暴露于抗原而已被引发(致敏)的(即已被暴露的)被试者中诱导二次免疫应答。二次免疫应答以激活和扩增特异的记忆 T 细胞和 B 细胞为特征。因此, 对特异免疫应答的加强可以通过诱导免疫细胞在随后暴露于该抗原后增殖和分化, 而提高引发的免疫应答。如下所讨论的, PfCSP 疫苗的全长 CS 蛋白含有 9 个 T 细胞表位, 而 RTS, S 含有 5 个 T 细胞表位(61)。其中有 4 个 RTS, S 表位存在于 PfCSP 疫苗中。例如, 当施用, 引发疫苗引发抗疟疾 CD8+ T 细胞。而加强疫苗可以实现一种或多种以下效果: 诱导 CD4+ T 细胞、诱导抗疟疾抗体、加强由引发疫苗引发的 CD8+ T 细胞的活性, 和诱导未在最初的引发免疫应答中原初鉴定的额外的 CD8+ T 细胞。加强疫苗还可以诱导 CD4+ T 细胞并诱导抗疟疾抗体。加强免疫应答在本领域也被称为“回忆”免疫应答。

“有效的”加强剂量可以介于 1 μg 到 100 μg 或介于 10 μg 到 75 μg 或介于 40 μg 到 60 μg 的范围。在另一个实施方案中, 加强剂量可以是 50 μg 。

而在另一个实施方案中，加强剂量可以是 25 μg 。加强疫苗可以被施用 1 次或多次。加强给药的“有效”次数可以介于 1 到 5 剂加强疫苗。可另选的是，向人受者的给药次数可以介于 1 到 3 剂或 1 到 2 剂。在另一实施方案中，DNA 疫苗和蛋白质疫苗都可以用于加强初次免疫应答。

“多肽”指任何含有两个或多个通过肽键或修饰的肽键（即肽等排物）彼此连接的氨基酸的多肽。“多肽”既指短链，通常称为肽、寡肽或寡聚物，也指长链，通常称为蛋白质。多肽可以含有正常由密码子编码的氨基酸之外的氨基酸。

多肽包括由天然方法（如转录后加工）或本领域众所周知的化学修饰技术修饰的氨基酸序列。这类修饰在基础教材中被充分描述，并且在专著和大量研究文献中描述得更为详细。修饰可发生于多肽的任何位置，包括肽骨架、氨基酸侧链和氨基或羧基端。这些修饰可以在给定多肽的若干位点以相同或不同的程度存在。而且，给定的多肽可以含有许多类型的修饰。多肽可以作为泛素化的结果而被分支，并且它们可以在分支或没有分支下环化。环化的、分支的和分支的环化多肽可以产生于转录后的天然加工或可以通过人工方法制造。修饰包括乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、生物素化、黄素的共价附着、血红素部分的共价附着、核苷酸或核苷酸衍生物的共价附着、脂或脂衍生物的共价附着、磷脂酰肌醇的共价附着、交联、环化、二硫键形成、脱甲基化、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、 γ -羧化、糖基化、GPI 锚的形成、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、蛋白水解过程、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、selenoylation、硫酸化、转运 RNA 介导的向蛋白质加入氨基酸（如精氨酸酰化）和泛素化（79、82、94、113）。

多肽序列的“片段”是指比参照序列短，但是保留被认为与参照多肽相同的生物功能或活性的多肽序列。这类活性可以包括如刺激免疫应答的能力。片段保留参照多肽的至少一个表位。多肽的“部分”指的是参照多肽的氨基酸序列的子集。可以通过其在多肽中的相对位置来描述一个部分，例如 C 端部分或 N 端部分。

本发明可以使用任何疟疾抗原，如显示于表 A 和表 B 的抗原。

表 A

前 RBC 抗原

抗原	参考
CSP	13、14、29、32、41、55、66、69、78、85、87、91、99、114
SSP2	1、13、14、29、55、56、86、104、111、112
Exp1/Hep-17	15、16、27、28、29
PfLSA1	29 和 44
PfLSA3	22

表 B

RBC 期抗原

抗原	参考
MSP-1	7、10、12、20、34、35、46、58、59、65、95、96
MSP-2	3、4、17、80、81、88
MSP-3	72 和 73
MSP-4	50
MSP-5	7
AMA1	5、18、19、24、25、101、102
EBA175 II 区	97 和 98
SERA	26、48、49、76、77
RAP2	39、76、84、89

“环孢子蛋白”或“CSP”是疟孢子表面的主要表面多肽。已经克隆测序并表达了来自恶性疟原虫 7G8 株的 CSP(PfCSP) (21)。来自其它疟疾寄生虫的其它 CSPs 也已被描述了特征并含于表 A。

如这里所使用的,“RTS, S”指一种特定的疟疾抗原并代表本发明的一个实施方案。RTS, S 及其产生更详细的描述于在此引入为参考的美国专利 No. 5,928, 902 和国际专利申请 WO 93/10152。

“拓宽”指增加 T 细胞应答的组成 (repertoire)。在这种情况下,通过 DNA 引发/RTS, S 加强诱导了具有更宽的组成(repertoire)的产生 IFN- γ 的 T 细胞群体 (Tcl 和 Th1), 因为使用 DNA 免疫/引发激起了 CD4⁺ T 细胞依赖的 CD8⁺ 1 型(Tcl)和 CD4⁺ 1 型(Th1) IFN- γ 应答, 而单独的 RTS, S 仅诱导 CD4⁺ T 细胞依赖的 Th1 IFN- γ 应答。技术人员可以通过抗原特异的检测试验来检测拓宽的免疫应答。例如, 技术人员可以使用 ELISPOT、MHC 四聚体染色或铬释放 CTL 试验来确定 T 细胞群的所有组成成分。

“拓宽”也指增加将与免疫应答发生反应的表位的范围。除了最初引发的免疫细胞外, 未曾引发的或数量小到不能被检测到的免疫细胞也被诱导扩增和激活。因此, 拓宽的免疫应答不仅放大了原初的引发应答, 也包含并非初次应答的一部分的对新表位的应答。技术人员可以通过使用抗原特异的检测试验来检测拓宽的免疫应答。例如, 技术人员可以使用 ELISPOT 或 MHC 四聚体染色来确定与初次免疫应答反应的所有表位组成并将此组成和与二次免疫应答反应的所有表位组成相比较。如果二次免疫应答比初次免疫应答与更大数量的表位反应, 则二次免疫应答已被拓宽。

“CD8⁺ T 细胞”代表一类以具有 CD8 细胞表面标记为特征的 T 淋巴细胞。CD8⁺ T 细胞是 MHC I 型限制的“CTLs”或“抑制性 T 细胞”。

“CD4⁺ T 细胞”代表一类以具有 CD4 细胞表面标记为特征的 T 淋巴细胞。CD4⁺ T 细胞是 MHC II 型限制的 T 淋巴细胞。存在两种类型的 CD4⁺ T 细胞, 被称为 1 型或 2 型“辅助性 T 细胞”。

如上讨论的, 通过抗原与免疫系统细胞的相互作用, 产生了针对抗原的免疫应答。产生的免疫应答可以被粗略的分为两个极端的类别, 即体液或细胞介导的免疫应答 (传统上分别以保护的抗体机制和细胞效应子机制为特征)。这些类应答已被命名为 Th1 型应答 (细胞介导的应答) 和 Th2 型免疫应答 (体液应答)。极端的 Th1 型免疫应答可以以抗原特异的、单

元型-限制的 CTLs 的产生和天然杀伤细胞应答为特征。在小鼠中, Th1 型应答常常以 IgG2a 亚型抗体的产生为特征, 而在人中这些相应于 IgG1 型抗体。Th2 型免疫应答的特征在于产生广谱免疫球蛋白同种型, 包括小鼠中 IgG1、IgA 和 IgM。

位于这两种类型的免疫应答的发展背后的驱动力是细胞因子, 一些鉴定的蛋白质信使, 其帮助免疫系统的细胞并操纵最终的免疫应答向 Th1 或 Th2 应答发展。因此, 高水平的 Th1 型细胞因子倾向于支持针对给定抗原的细胞介导的免疫应答的诱导, 而高水平的 Th2 型细胞因子倾向于支持针对抗原的体液免疫应答的诱导。重要的是记住 Th1 和 Th2 型免疫应答的区别并不是绝对的。实际上, 个体将支持被描述为主要的 Th1 或主要的 Th2 的免疫应答。然而, 常常方便地按照 Mosmann 和 Coffman (70) 在鼠 CD4+ T 细胞克隆中的描述来考虑细胞因子家族。传统上, Th1 型应答与通过 T 淋巴细胞的 INF- γ 和 IL-2 的产生有关。其它通常与 Th1 型免疫应答的诱导直接相关的细胞因子不由 T 细胞产生, 如 IL-12。相对的, Th2 型应答与 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和肿瘤坏死因子- β (TNF- β) 的分泌有关。

用于本发明的适当佐剂包括铝盐, 如氢氧化铝胶体(alum)或磷酸铝, 但也可以是钙、铁或锌盐, 或可以是酰化酪氨酸的不溶悬浮液, 或酰化的糖、多糖的阳离子或阴离子衍生物、Polyphosphazenes、或 montanide 脂质体。

在用于本发明的疫苗制剂中, 在 P/CSP 质粒的情况下, 可以施用或不施用佐剂。在 RTS, S 的情况下, 佐剂组合物可以诱导优先 Th1 应答。此外, 还可以诱导其它应答, 包括其它体液应答。

某些疫苗佐剂尤其适于刺激 Th1 或 Th2 型细胞因子应答。传统上, 接种或感染后免疫应答的 Th1:Th2 平衡的最好指示包括用抗原再刺激后对 T 淋巴细胞体外产生的 Th1 或 Th2 细胞因子的直接测量, 和/或抗原特异的抗体应答的 IgG1 : IgG2a 比例的测量。因此, Th1 型佐剂是一种刺激分离的 T-细胞群体在接受抗原体外再刺激后产生高水平的 Th1 型细胞因子的佐剂, 该佐剂还诱导与 Th1 型同种型相关的抗原特异性免疫球蛋白应答。例

如,可以被配制来产生适合用于本发明中的佐剂的 Th1 型免疫刺激剂,可以包括单磷酸脂 A,特别是 3-脱-O-酰化的单磷酸脂 A(3D-MPL)。3D-MPL 是众所周知的由 Ribi Immunochem, Montana 生产的佐剂。化学上通常提供 3-脱-O-酰化的单磷酸脂 A 与 4、5 或 6 酰化链的混合物。其可以通过 GB 2122204B 教导的方法纯化和制备,该参考文献也讨论二磷酸脂 A 和它的 3-O-脱酰化变体的制备。已经描述了其它纯化和合成的脂多糖(US Pat. 6,005, 099,42,43、EP 0 729 473 B1、EP 0549 074B1)。在一个实施方案中, 3D-MPL 是具有直径小于 $0.2\mu\text{m}$ 的小粒径的颗粒制剂形式,其制作方法公开于 EP 0 689 454。

皂苷类化合物是可以被用于本发明的 Th1 免疫刺激剂的另一例子。皂苷类化合物是众所周知的佐剂(60)。例如, Quil A (来自南美 Quillaja Saponaria Molina 树皮)和它的级分被 US Pat. 5,057, 540、EP 0 362 279 B1 和 Kensil (52)描述。溶血皂苷 QS21 和 QS17 (HPLC 纯化的 Quil A 级分)已经被描述为有效的全身性佐剂 (systemic adjuvant), 它们的产生方法公开于 US Pat. 5,057, 540 和 EP 0 362 279 B1。这些参考文献也描述了作为有效佐剂的 QS7 (Quil A 的非溶血性级分)在全身性疫苗中的用途。Kensil 等人进一步描述了 QS21 的用途(51)。QS21 与聚山梨醇酯或环糊精的组合也已为人所知(WO 99/10008)。包含 Quil A 的级分,如 QS21 和 QS7 的颗粒佐剂系统描述于 WO 96/33739 和 WO 96/11711。

免疫刺激剂的另一例子是含有未甲基化的 CpG 二核苷酸(“CpG”)的免疫刺激性寡核苷酸。CpG 是存在于 DNA 中的胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸基序的缩写。本领域已知 CpG 是通过全身性和粘膜路径施用的佐剂(WO 96/02555、EP 468520,23, 68)。曾经观察到卡介苗(bacillus Calmette-Guerin, BCG)的 DNA 部分能够发挥抗肿瘤效果。在进一步的研究中,合成的来自 BCG 基因序列的寡核苷酸表现出能够诱导免疫刺激性效果(体内和体外都如此)。这些研究的作者作出结论:包含中心 CG 基序的某些回文序列携带这一活性。之后 Krieg(57)阐释了 CG 基序在免疫刺激中的中心作用。详细的分析已表明 CG 基序必须处于一定的序列背景中,并且这些序列在细菌

DNA 中常见，而很少存在于脊椎动物 DNA 中。免疫刺激性序列常常是：嘌呤，嘌呤，C，G，嘧啶，嘧啶；其中 CG 基序没有被甲基化，但是还已知其它未甲基化的 CpG 序列也具免疫刺激性，并且可以被用于本发明。

在某些 6 核苷酸的组合中，可以存在回文序列。在同一寡核苷酸中可以以一种基序的重复或不同基序的组合的形式而存在若干这些基序。一种或多种这样的含有免疫刺激性序列的寡核苷酸的存在可以激活多种免疫亚群，包括天然杀伤细胞（产生 γ 干扰素并具有溶细胞活性）和巨噬细胞（Wooldrige 等人，1997）。其它含有未甲基化 CpG 但不具有这一共有序列的序列现在也已被证实具有免疫调节性。当配制成疫苗时，CpG 通常在游离溶液中与游离抗原一起被施用(WO96/02555, 68)或与抗原共价缀合(WO 98/16247)，或与如氢氧化铝之类的载体一起配制（肝炎表面抗原）(9,23)。

上述这些免疫刺激剂可以与载体一起配制，所述载体如脂质体、水包油乳剂，和/或金属盐，包括铝盐（如氢氧化铝）。例如，3D-MPL 可以与氢氧化铝(EP 0 689454)或水包油乳剂(WO 95/17210)一起配制。QS21 与含有胆固醇的脂质体(WO 96/33739)、水包油乳剂(WO 95/17210)或 alum(WO 98/15287)一起配制可能是有利的；CpG 可以与 alum(9,23)或其它阳离子载体一起配制。

也可以使用免疫刺激剂的组合，如单磷脂 A 和皂苷衍生物的组合(WO 94/00153、WO95/17210、WO 96/33739、WO 98/56414、WO98/05355、WO 99/12565、WO 99/11241)或如描述于 WO94/00153 的 QS21 和 3D-MPL 的组合。可另选的是，本发明还可使用 CpG 加皂苷（如 QS21）的组合。因此，适当的佐剂系统包括如单磷脂 A（如 3D-MPL）与铝盐的组合。另一实施方案组合单磷脂 A 与皂苷衍生物，如公开于 WO 94/00153 的 QS21 和 3D-MPL 的组合，或如公开于 WO 96/33739 的低反应原性组合物，其中 QS21 在含有胆固醇的脂质体(DQ)中被淬灭。而 WO 95/17210 中描述了另一在水包油乳剂中包含 QS21、3D-MPL 和生育酚的佐剂制剂。在另一实施方案中，CpG 寡核苷酸被单独或与铝盐一同使用。额外的佐剂和/

或载体组合的实例包括：3D-MPL + DQ 中的 QS21、Alum + 3D-MPL、Alum + DQ 中的 QS21 + 3D-MPL、Alum + CpG、3D-MPL + DQ 中的 QS21 + 水包油乳剂，和 CpG。

在另一个实施方案中，组合 3D-MPL 和 QS21，具有或不具有 CpG。QS21:3D-MPL 的比例可以为大约 1:10 至 10:1；1:5 至 5:1；或 1:1。在一个实施方案中，D MPL: QS21 的比例为 2.5:1 至 1:1。通常，对于人类给药而言，QS21 和 3D MPL 将在疫苗中以 1 μ g-200 μ g 的范围存在，如每剂 1-100 μ g 或 10 μ g-50 μ g。通常水包油将包含 2 至 10% 的鲨烯、2 至 10% 的 α 生育酚和 0.33 至 3% 的 Tween80。鲨烯: α 生育酚的比例等于或小于 1，因为这样提供更稳定的乳剂。还可以以 1% 水平存在 Span85。在某些情况下，本发明的疫苗含有稳定剂可能是有利的。

与含有 CS 蛋白或它的免疫原性部位（任选地在如 RTS, S 之类的杂合蛋白中）的本发明多肽加强疫苗一起使用的佐剂，可以含有 3D-MPL 和 QS21 的组合并具有或不具有 CpG。

前面的一般性描述和以下的详细描述都仅是示例性和解释性的，并不对所要求的本发明构成限制。此外，本发明并不被限制于所描述的特定实施方案，这些实施方案本身当然可以变化。另外，用于描述特定实施方案的术语并无限制性意图，因为本发明的范围仅受其权利要求的限制。

关于数值范围，除非在上下文中另外明确的指出，否则本发明包括介于所述范围的上限和下限间的每一居间值，准确到下限单位的至少十分之一。此外，本发明包括任何其它陈述的居间值。另外，除非从所述范围中具体排除，本发明还包括排除所述范围的上限和下限之一或二者的范围。

除非另有定义，否则这里使用的所有技术和科技术语的意思为本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的意思。本领域的普通技术人员还将意识到，任何与这里描述的方法和材料相似或等价的方法和材料也可以用于本发明的实践和测试。此外，这里提及的所有出版物被引入为参考。

必须指出，如这里和附属的权利要求所指出的，除非在上下文中另有明确的指出，否则单数形式“一”（“a”），“或”，和“此”（“the”）包括复数

指示物。因此，例如，就“一种被试多肽”而言包括多种这类多肽，就“此试剂”而言包括一种或多种试剂和本领域技术人员已知的它的等价物，等等。

此外，除非另有指示，在说明书和权利要求中使用的所有表示成分的量、反应条件、%纯度、多肽及多核苷酸长度等的数字被术语“大约”所修饰。因此，在说明书和权利要求中列出的数字参数是可以根据需要的本发明的性质而改变的近似值。至少不企图限制等同原则在权利要求范围上的应用，每一个数字参数至少应该根据报道的有效数字，应用常规近似技术来理解。但是，在具体实施例中列出的数值是尽可能的精确报道。然而，任何数值均固有地含有某些来自其实验测量的标准偏差的误差。

以下实施例进一步说明了本发明。它们仅是举例说明本发明并公开本发明某些实施方案的多种有利特性。以下实施例不应该被理解为是对本发明的限制。

实施例

实施例1

用 RTS, S 疫苗加强已引发的抗 - *Pf*CSP 应答

为此项研究招募了24名HLA - A*0201阳性志愿者。为了可以进行遗传限制性T细胞反应的组间比较，志愿者的HLA多样性被限制为该群体中最常见的I型HLA亚型。这些志愿者中先前无人接触过疟疾。这24名受试者中，有10名参加过上述的第二项*Pf*CSP疫苗临床试验。在此试验过程中，这些志愿者已接受总共三剂*Pf*CSP DNA疫苗（VCL - 2510，由Vical, Inc（San Diego, CA）如前所述制备（62）），剂量是2500 μg/剂，每剂间隔4周（62）。因此，在这一试验中，这10名志愿者在接受加强的RTS, S疫苗前12 - 14个月接受他们最后一剂DNA疫苗。剩余的14名志愿者事先未接受*Pf*CSP DNA疫苗，因此用作未引发的对照。所有24名志愿者在用*Pf*CSP DNA疫苗和RTS, S疫苗二者免疫接种前在抗*Pf*CSP、HIV、HBV核心抗原、HCV、痘苗病毒和dsDNA的抗体方面都是阴性的。10名DNA引发的志

愿者中的6名和14名未引发的对照中的8名为抗HBsAg抗体阳性的。

所有24名志愿者在0周和8周时通过左侧三角肌肌肉内注射接受两剂RTS, S疫苗。RTS, S疫苗包含与乙型肝炎表面抗原(HBsAg)融合的恶性疟原虫(NF54/3D7) CSP蛋白的第207-395位氨基酸(8)。简而言之, RTS, S蛋白是一种杂合物, 包含基本上全部的CS蛋白的C端部分、4个或更多个串联重复的免疫显性区和HBsAg。有关RTS, S制备的一般性描述参阅WO 93/10152和美国专利5,928,902, 它们均全文收编于此作为参考。

产生的重组RTS, S蛋白表达于酵母中(99)并与免疫刺激剂单磷酸脂A和QS21(在水包油乳剂中)(Glaxo SmithKline Inc, Rixensart, 比利时)组合制备RTS,S疫苗。具体而言, 冻干制剂包含RTS, S沉淀和佐剂稀释剂。沉淀包含RTS, S(50 μ g)和作为防冻剂的乳糖(3.15%)。佐剂稀释剂包含MPL(50 μ g)、QS-21(50 μ g)和油/水乳剂。产生的疫苗制剂在1ml体积的乳剂中包含50 μ g的RTS, S并在注射前30分钟制备。三名HLA不匹配的志愿者不接受PjCSP DNA疫苗和RTS, S疫苗。从这三名志愿者中获取的样品用作此试验中的阴性对照。未引发的组中的一名志愿者在第一次免疫接种后从试验中退出。

在全长PjCSP序列的上游区中包含许多T细胞表位, 包括在PjCSP DNA疫苗中, 但不存在于RTS, S疫苗中。但在这两种疫苗之间有足够重叠来保证将RTS,S疫苗作为潜在的“加强”疫苗施用给先前用PjCSP DNA疫苗免疫过的志愿者的正确性。具体而言, RTS,S包括与未融合的HBsAg共表达于酵母中的、与乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)融合的PjCSP的一部分, 其中包含具有19个NANP重复的高度保守区和CSP的羧基端(36)。PjCSP疫苗的全长CS蛋白包含9个T细胞表位, 而RTS, S包含5个T细胞表位(61)。RTS, S表位中有4个出现于PjCSP疫苗中。

实施例2-7详述了随后用来自各名志愿者的血样进行的分析。简而言之, 对于接受PjCSP DNA疫苗引发的志愿者在其接受最后一剂PjCSP DNA疫苗后12-14个月, 而对于所有志愿者在第一和第二剂RTS, S疫苗后第1周、2周和6周, 研究T细胞反应。在免疫接种之前和每剂RTS,S疫苗施用后

第2、4、6和8周检测抗体。

实施例2

CTL反应

如上所述，单独用RTS，S疫苗进行免疫接种在人体内诱发了抗体和CD4⁺T细胞依赖性IFN- γ 反应，但还未有报道说会在人体内引起抗原特异性CTL（61）。为了确定DNA诱发的记忆CTL是否能够通过用RTS，S疫苗加强来进行回忆以及加强后的应答是否比最初的DNA引发的应答更宽，检测了不同志愿者中抗原特异性CTL的细胞毒活性。在用RTS，S免疫之前1-2周和第一剂和/或第二剂RTS，S免疫后1或2周从DNA引发或未引发的志愿者的血液中收集外周血单核细胞（PBMC）。然后将这些PBMC用于铬释放试验中检测抗原呈递靶细胞的裂解（105）。

如前所述进行体外铬释放测定（105）。具体而言，为了产生效应细胞，用表达P/CSP的ALVAC(vCP182)以5pfu/个细胞的量在37℃感染总PBMC中的20% 90分钟。漂洗2次后，将这些PBMC与剩余的PBMC混合并一起培养7-10天。48小时后加入重组的人IL-2（Cetus, Emeryville, CA）（20U/ml）。靶细胞是用10 μ g/ml的P/CSP特异性CTL表位或对照肽敏化过夜的自体或MHC错配的PHA blast。用常规的6小时铬释放测定法检测CTL活性。裂解百分率定义为（实验组释放量-培养基对照释放量）/（最大释放量-培养基对照释放量）x100。通过从与实验肽共保温的靶细胞的裂解百分率中减去与阴性对照HIV gag A2-限制性肽一起培养的靶细胞的裂解百分率得到特异性裂解的百分率。只有在同一测定中对于至少2的效应子：靶（E：T）比率，免疫接种后特异性裂解百分率 $\geq 10\%$ 且免疫接种前的特异性裂解百分率 $<10\%$ ，CTL反应才被认为是阳性的。

纯度为80-95%的合成肽用于CTL靶细胞的敏化并获自Chiron Technologies（Clayton Victoria, 澳大利亚）。使用了8种来自P/CSP且包括在RTS，S序列中的肽。这8种肽包括4种9-10个氨基酸长的确定的CTL I类MHC限制性表位。这4种CTL表位受HLA-A*0201（肽A2.319；氨基

酸残基319-327, YLNKIQNSL; SEQ.ID.NO.1)、-A*0101(肽A1.310; 氨基酸残基310-319, EPSDKHIKEY; SEQ.ID.NO.2)、-A*0301(肽A3/11.336; 氨基酸残基336-345, VTCGNGIQVR; SEQ.ID.NO.3)和-B*3501(肽B35.353; 氨基酸残基353-360, KPKDEL DY; SEQ.ID.NO.4)所限制。其它4种肽是DR结合肽DR.316(氨基酸残基316-335, IKEYLNKIQNSLSTEWSPCS; SEQ.ID.NO.5)、DR.318(氨基酸残基318-332, EYLNKIQNSLSTEW; SEQ.ID.NO.6)、DR.363(氨基酸残基363-383, DIEKKICKMEKCSSVFNVVNS; SEQ.ID.NO.7)和DR.346(氨基酸残基346-365, IKPGSANKPKDEL DYANDIE; SEQ.ID.NO.8), 它们如前所述是15-20个氨基酸长(107)。Glaxo SmithKline Inc(Rixensart, 比利时)提供了一个具有13种*Pf*CSP衍生肽的集合和一个具有20种HBsAg衍生肽的集合, 长度均为15个氨基酸。13种*Pf*CSP肽的氨基酸序列如下:

NEEPSDKHIKEYLNK(SEQ.ID.NO.9) 、 DKHIKEYLNKIQNSL (SEQ.ID.NO.10)、EYLNKIQNSLSTEWS (SEQ.ID.NO.11)、IQNSLSTEWSPCSVT (SEQ.ID.NO.12)、STEWSPCSVTCGNGI (SEQ.ID.NO.13)、PCSVTCGNGIQVRIK (SEQ.ID.NO.14)、CGNGIQVRIKPGSAN (SEQ.ID.NO.15)、QVRIKPGSANKPKDE (SEQ.ID.NO.16)、PGSANKPKDEL DYEN (SEQ.ID.NO.17)、KPKDEL DYENDIEKK (SEQ.ID.NO.18)、LDYANDIEKKICKME (SEQ.ID.NO.19)、DIEKKICKMEKCSSVF (SEQ.ID.NO.20)和ICKMEKCSSVFNVVN (SEQ.ID.NO.21)。来自流感基质蛋白质的肽(第58-66位残基, GILGFVFTL, HLA-A2.1; SEQ.ID.NO.22)或破伤风毒素通用性T辅助细胞表位P30(第947-969位残基, FNNFTVSFWLRVPKVSASHLET, DR-和DP-限制性; SEQ.ID.NO.23)用作阳性对照(74)。来自HIV gag蛋白质的肽(第77-85位残基, SLYNTVATL, HLA-A2.1限制性; SEQ.ID.NO.24)或恶性疟原虫蛋白Exp-1(第82-96位残基, AGLLGNVSTVLLGGV, DR限制性; SEQ.ID.NO.25)用作阴性对照。

通过用 RTS,S 加强来回忆 DNA 诱导的记忆型 CTL

在临施用 RTS, S 疫苗前检测 DNA 引发或未引发的志愿者中无 CTL。在 14 名只接受 RTS, S 疫苗的未引发志愿者中都未检测到 CTL 反应。在 10 名 DNA 引发的志愿者中有 5 名检测到抗原特异性和遗传限制性 CTL 反应 (图 1c)。5 名有反应者之一在施用第一剂 RTS, S 后一周有了 CTL (V6), 其它几名都是在施用第二剂 RTS, S 后有了 CTL。DNA 引发的志愿者中 CTL 反应频率 (7/113 次测定, 6.2%) 显著高于未引发志愿者中的 CTL 反应频率 (0/125 次测定, 0%) ($P = 0.0047$)。所述 CTL 反应频率比得上在 12 - 14 个月之前接受了 3 剂 *Pf*/CSP DNA 疫苗的 15 名志愿者中只用 DNA 免疫接种后观察到的 CTL 反应频率 (30/458 次测定, 6.6%) (107)。

在已用 DNA 引发并用 RTS,S 加强的志愿者中 CTL 的强度 (magnitude) (特异性裂解百分率的范围 [几何平均值]: 11.4-28.1[15.4]) 也与单独用 DNA 免疫接种诱发的 CTL 强度 (10.5-90.0[15.6]) 在同一范围内。RTS,S 疫苗不包含在先前两项研究 (105, 107) 中与最高的应答普遍性相关的 CD8 + T 细胞表位。

检测到针对存在于 RTS, S 序列中的所有 4 种确定的 *Pf*/CSP 特异性 I 类 MHC 限制性表位的 CTL 反应。在 5 名 CTL 阳性反应者中, 4 名具有针对 HLA - A2 - 限制性表位 A2.319 的 CTL, 1 名对 HLA - A1 - 限制性表位 A1.310 (V2) 有反应, 在 4 名 A2.319 反应者中有两名分别对 HLA - A3 和 HLA - B7 - 限制性表位 A3.336(V8) 和 B7.285 (V9) 有反应。未检测到定向于报道过的 CD4⁺ CTL 表位 DR.318 (序列 EYLNKIQNSLSTEWs; SEQ ID NO.26) 的 CTL, 所说表位 DR.318 中包含 CD8⁺ CTL 表位 A2.319 (下划线标示处) (69)。在未接受 *Pf*/CSP DNA 但接受了 2 剂 RTS, S 疫苗的 14 名志愿者中也未检测到 CTL 活性。在这些志愿者中 CTL 活性的缺乏符合先前研究中显示的单独施用此疫苗不能诱导 CD8 + T 细胞活性 (即, CTL 活性) 的结果。

在第二和第三剂 *Pf*/CSP DNA 免疫接种后 2 周和 6 周、RTS,S 加强前约一年进行检测时, 5 名用 RTS, S 疫苗加强后具有阳性 CTL 反应的 DNA 引发的志愿者中有 3 名先前未检测到针对同一表位的 CTL 活性 (107)。相反, 在

只用DNA免疫接种后，5名志愿者中有2名先前就检测到了针对RTS，S中所含肽的CTL活性。这两名志愿者不对RTS.S加强产生应答。

RTS，S 加强的 CTL 反应比 DNA 引发的 CTL 反应更宽

在用RTS，S疫苗加强后具有阳性CTL反应的5名DNA引发的志愿者中，有3名（V3、V6和V8）在经RTS，S加强后对DNA引发后未有反应的表位产生了反应。具体而言，只有当免疫接种后的特异性裂解百分率比两种阴性对照（MHC + 对照和非MHC + 肽）的背景高10%或更多时，CTL反应才被认为是阳性的。V3和V6中，在用PfCSP疫苗进行DNA引发后对表位A2.319无CTL反应（图1a和1b）。不过，在用RTS，S加强后，两名志愿者都显示出了对此表位的CTL反应（图1c）。V8在DNA引发后对表位A2.319和A3.336无CTL反应，但是在用RTS，S疫苗加强此名引发的志愿者后，出现了对这些表位的CTL反应（图1a、1b和1c）。

如上所述，本领域的技术人员不认为以蛋白为基础的疫苗可以有效刺激CTL反应。同样的，RTS，S作为一种以蛋白质为基础的疫苗，迄今为止仍被认为对于刺激CD8 + T细胞反应而言是无效的（61）。与已知的相反，以上数据清楚的证实了在DNA引发后，RTS，S可激发对于新CTL表位的CTL反应。

用卡方检验、Fisher确切检验（双侧）或Student的t - 检验（双侧）分析肽特异性IFN - γ （在下面）和CTL反应的频率和强度。用成对样品的t - 检验比较T细胞亚群中IFN - γ mRNA表达水平的比例。显著性水平为P值<0.05。

实施例3

对PfCSp的T细胞IFN - γ 应答

用如下的标准ELISPOT试验评估IFN - γ 反应。如前所述（107）在10 μ g/ml肽存在的条件下体外刺激36小时后用ELISPOT测定产生IFN - γ 的PfCSP - 特异性细胞的数目。用自动斑点计数系统（Scanalytics, Fairfax,

VA) 清点孔中相应于产生细胞因子的细胞的斑点数目(斑点形成细胞; SFC)。反应表示为SFC/ 10^6 PMBC的平均数, 如果符合以下条件就被认为是显著的: 1) 含实验肽的孔中细胞的平均数目显著大于含对照肽的孔($p < 0.05$, student's T 检验); 2) 净SFCs/孔(试验肽孔中的平均SFC数目减去对照肽孔中的平均SFC数目) > 5 个SFC/孔; 和3) 刺激指数(试验肽孔中的平均SFC数目与对照肽孔中平均SFC数目的比率)大于2.0。此外, 如果免疫接种前获取的细胞对如上所述的PjCSP-特异性肽有阳性反应, 免疫接种后对同一种肽的这种反应就不被认为是阳性的。

用于此处时, IFN- γ ELISPOT中的“阳性反应者频率”是对于特定肽的测试呈阳性的志愿者的数目除以试验组中志愿者的总数。“阳性IFN- γ ELISPOT试验的频率”是对肽的阳性反应数除以对于此肽进行的测试的总数。例如, 如果在10名患者中每一个人身上进行6种肽的测试, 测试总数就是60。如果36次测试是阳性的, 那么阳性试验的频率是60次中有36次阳性。“IFN- γ 反应的强度”由每一百万PBMC中SFC的数目表示。

在第一剂和第二剂RTS,S疫苗施用之前1-2周和之后1、2和6周分离PBMC用于ELISPOT测定中。在这些测定中, 将PBMC与如实施例2中所述的8种规定的PjCSP肽(4种包含I型HLA限制性表位的9个氨基酸长的肽, 4种15-20个氨基酸长的肽, 后4种中每种都包含II型限制性表位, 其中3种还包含I型限制性表位)和RTS,S序列中所含的13种PjCSP肽的集合一起保温。这些肽在上文的实施例2中也进行了进一步的详述。

DNA引发过或未引发过的志愿者在RTS,S免疫接种前没有可检测到的PjCSP特异性IFN- γ 反应。在只用仅含I型MHC限制性表位的9个氨基酸长的肽进行的测定中, 在免疫接种后的任何时间都未检测到IFN- γ 反应。这些是与实施例2中所述相同的肽。在第一次免疫后, 在10名DNA引发过的志愿者中有6名对所有4种15-20个氨基酸长的PjCSP肽呈阳性IFN- γ 反应, 而相比之下, 在14名未引发过的志愿者中只有2名对一种这样的肽呈阳性IFN- γ 反应($p = 0.019$) (表1)。阳性反应者是对这4种肽中至少一种起反应的志愿者。此外, 在引发组中的反应者对所有4种被测试的

肽起反应，而未引发组中的反应者只对4种被测试肽中的一种起反应。无论受试者的HBsAg抗体情况如何，DNA引发组中的反应频率显著高于未引发组中的（阳性试验次数/总试验次数：20/116[18.1%]对4/164[2.4%]， $p = 0.00001$ ）。

表1 对P/CSP特异性肽的IFN- γ 反应的总频率和强度

组	反应者数目 / 被测试者数目		阳性试验数目 / 总试验数目 (%)			净SFCs/10 ⁶ PBMCs的范围(几何平均值)	
	DNA-引发过的志愿者	未引发过的志愿者	DNA引发过的志愿者	未引发过的志愿者	两组之间的P值	DNA引发过的志愿者	未引发过的志愿者
<u>第一次免疫接种后</u>							
HBsAg (+)	4/6 (66.7)	2/8 (25.0)	13/69 (18.8)	4/95 (4.2)	0.001	13.1-105.5 (38.5)	20.0-63.1 (39.6)
HBsAg (-)	2/4 (50.0)	0/6 (0)	7/47 (14.9)	0/69 (0)	0.0009	13.8-82.5 (32.7)	忽略不计
合计	6/10 (60.0)*	2/14 (14.3)*	20/116 (18.1)	4/164 (2.4)	<0.00001	13.1-105.5 (36.3)	20.0-63.1 (39.6)
<u>第二次免疫接种后</u>							
HBsAg (+)	5/6 (83.0)	6/8 (75.0)	23/72 (31.9)	11/84 (13.1)	0.0078	11.9-82.5 (32.1)	14.4-96.9 (37.8)
HBsAg (-)	3/4 (75.0)	6/6 (100.0)	18/48 (37.5)	29/72 (40.3)	0.76	11.7-122.5 (33.4)	17.5-125.6 (41.0)
合计	8/10 (80.0)	11/14 (84.6)	41/120 (34.2)	40/156 (25.6)	0.12	11.7-122.5 (32.6)	14.4-125.6 (39.6)
<u>总体</u>							
HBsAg (+)	5/6 (83.0)	6/8 (75.0)	36/141 (25.5)	15/179 (8.4)	0.00003	11.9-105.0 (34.3)	14.4-96.9 (38.1)
HBsAg (-)	3/4 (75.0)	6/6 (100.0)	25/95 (26.3)	29/141 (20.6)	0.3	11.7-122.5 (33.2)	17.5-125.6 (41.0)
合计	8/10 (80.0)	11/14 (84.6)	61/238 (25.6)	44/320 (13.8)	0.0004	11.7-122.5 (33.9)	14.4-125.6 (39.6)

*第一次免疫后，在DNA引发过的志愿者中阳性反应者的数目显著高于未引发志愿者中的阳性反应者数目（6/10对2/14， $p = 0.019$ ）。

第二次施用RTS,S疫苗后，在10名DNA引发过的志愿者中的8名和14名未引发过的志愿者中的11名检测到了IFN- γ 反应（表1）。尽管在施用第二剂RTS,S疫苗后两组在反应者的数目方面没有差异（见阳性试验数目/总试验数目（%）），但DNA引发过的志愿者中总阳性试验数目在统计学上显著高于未引发的志愿者中的（阳性试验次数/总试验次数：61/238[25.6%]对44/320[13.8%]， $p = 0.0004$ ）（表1）。根据阳性试验的频率所显示的，总阳性试验数目中的这种差异与志愿者的HbS Ag抗体情况直接相关。第二次RTS,S免疫接种后，在HBsAg抗体阳性受试者中DNA引发过的志愿者中阳性试验的数目明显高于未引发的志愿者中的（23/72[31.9%]对11/84[13.1%]， $p = 0.0078$ ），但在HBsAg抗体阴性受试者中则并非如此（37.5%对40.3

% 阳性试验)。

在表位水平比较DNA引发过的和未引发过的组对肽DR.316、DR.318和DR.363的IFN- γ 反应。DR.316和DR.318包含重叠的CD4⁺和CD8⁺T细胞表位，而DR.363则只包含CD4⁺T细胞表位(107)。

如表2中所显示的，施用第一剂RTS,S疫苗后，在10名DNA引发过的志愿者中有4名检测到了对肽DR.316的IFN- γ 反应，而14名未引发的志愿者则均无反应($p = 0.0095$)，施用第一剂和第二剂RTS,S疫苗后，在10名DNA引发过的志愿者中有6名检测到了对肽DR.316的IFN- γ 反应，而13名未引发的志愿者中有5名有此反应($p = 0.35$)。当总体考虑所有测试时(在施用第一和第二剂RTS,S疫苗后)，DNA引发组的阳性试验频率较高(阳性试验数/总试验数，17/60对8/81， $p = 0.0046$)，但IFN- γ 反应的强度无差异(SFC的范围：11.9-106.3[33.0]对17.5-58.1[28.4]， $p = 0.21$)。

表2 表位水平针对PfCSP的IFN- γ 反应频率

组	反应者数目 / 被测试者数目 (%)			阳性试验数 / 总试验数 (%)		
	DR.316	DR.318	DR.363	DR.316	DR.318	DR.363
<u>第一次免疫接种后</u>						
DNA引发过	4/10 (40)	3/10(30.0)	3/10(30.0)	6/30 (20.0)	4/30 (13.3)	4/30 (13.3)
未引发过	0/14 (0)	0/14 (0)	2/14 (14.3)	0/42 (0)	0/42 (0)	2/42 (4.8)
P 值	0.0095	0.028	0.35	0.0025	0.015	0.195
<u>第二次免疫接种后</u>						
DNA引发过	5/10 (50.0)	6/10 (60)	2/10 (20)	11/30 (36.7)	10/30 (33.3)	4/30 (13.3)
未引发过	5/13 (38.5)	1/13 (7.7)	7/13 (54)	8/39 (20.5)	1/39 (20.5)	16/39 (41.0)
P 值	0.58	0.0069	0.099	0.136	0.00054	0.012
<u>总体</u>						
DNA引发过	6/10 (60)	6/10 (60)	4/10 (40)	17/60 (28.3)	14/60 (23.3)	8/60 (13.3)
未引发过	5/13 (38.5)	1/13 (7.7)	9/14 (64)	8/81 (9.9)	1/81 (1.2)	18/81 (22.2)
P 值	0.35	0.0069	0.24	0.0046	<0.00003	0.178

此外，如表2中所示，施用第一剂RTS,S疫苗后，在10名DNA引发过的志愿者中有3名检测到了对不含DR.316头两个氨基酸的肽DR.318的IFN- γ 反应，而14名未引发的志愿者则均无反应($p = 0.028$)，施用第一剂和第二剂RTS,S疫苗后，在10名DNA引发过的志愿者中有6名检测到了对肽DR.318的IFN- γ 反应，而13名未引发的志愿者中有1名有此反应($p =$

0.0069)。在第一剂和第二剂RTS,S疫苗接种后进行的ELISPOT测定总体显示DNA引发过的组具有较高的阳性试验频率(阳性试验数/总试验数, 14/60对1/81, $p < 0.00003$)。考虑到在只接受RTS,S疫苗的组里对这种肽只有一个的反应, 因此不可能比较反应的强度。

施用第一剂RTS,S疫苗后, 在10名DNA引发过的志愿者中有3名检测到了对不含已知的CD8 + T细胞表位的肽DR.363的IFN - γ 反应, 而14名未引发的志愿者中有2名有此反应 ($p = 0.35$)。施用第一剂和第二剂RTS,S疫苗后总体在10名DNA引发过的志愿者中有4名检测到了对肽DR.363的IFN - γ 反应, 而14名未引发的志愿者中有9名有此反应 ($p = 0.24$) (表2)。在第一剂和第二剂RTS,S疫苗接种完成后进行的测定显示DNA引发过的组与只施加了RTS,S的组之间阳性试验频率没有明显的差异(阳性试验数/总试验数, 8/60对18/81, $p = 0.178$)。但在施加第二剂RTS,S后, 未引发的志愿者中IFN - γ 反应的强度显著高于DNA引发过的志愿者中的反应强度(SFC的范围: 13.1-58.8[几何平均值26.4]/ 10^6 个细胞对14.0-140.6[几何平均值47.9]/ 10^6 个细胞, $p = 0.004$)。

类似的, 在施加完两剂RTS,S疫苗后, DNA引发组和只施加RTS,S的组中阳性反应受试者的频率无差异(8/10对11/13)。见表1。DNA引发组中的受试者比只接受RTS,S疫苗的志愿者对显著更多的测试肽有反应。在10名DNA引发过的志愿者中8名有反应的人中, 一名对所有4种15-20个氨基酸长的测试肽起反应, 1名对3种肽起反应, 5名对两种肽起反应, 只有1名对一种肽起反应。在13名未引发过的志愿者中11名有反应的人中, 1名对3种肽起反应, 2名对两种肽起反应, 8名只对一种肽起反应(2/8对DR.316有反应和6/8对DR.363有反应)。总而言之, 8名DNA引发过的志愿者中的7名和11名未引发过的志愿者中的3名对至少两种被测试肽有反应 ($p = 0.0094$)。

实施例4

对HBsAg的T细胞IFN - γ 应答

RTS,S是PfCSP的一部分和乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的融合蛋白。使用于佐剂中的RTS,S进行免疫接种在携带抗HBsAg抗体的受试者中诱发T细胞反应的效率明显较低。这种效果在DNA引发过的志愿者中则不显著得多。因为HBsAg抗体的状态对四种15-20个氨基酸长的肽的应答有明显影响,我们扩展了试验内容。通过在第一次和第二次RTS,S免疫后所有的试验时间点(PBMC)中同时用一组13种PfCSP肽(pPfCSP)和一组19种HBsAg肽如上所述进行ELISPOT测定,比较对于PfCSP和HBsAg的IFN- γ 反应。在幼稚的、未经DNA引发的受试者中,HBsAg组分对于T细胞反应而言是免疫显性的(HBsAg阴性的未引发志愿者中对PfCSP有反应者为0/6名而对HBsAg有反应者为6/6名,HBsAg阳性的未引发志愿者中对PfCSP有反应者为1/8名而对HBsAg有反应者为7/8名),但PfCSP DNA的引发似乎平衡了这种免疫优势,使T细胞反应朝向PfCSP(表3; HBsAg阴性且引发过的志愿者中对PfCSP有反应者为2/4名而对HBsAg有反应者为2/4名,HBsAg阳性且引发过的志愿者中对PfCSP有反应者为4/6名而对HBsAg有反应者为6/6名)。

表3 HBsAg血清反应阳性和血清反应阴性的志愿者之间IFN- γ 反应的频率和强度

对肽集合 的反应	DNA引发过的志愿者			未引发过的志愿者		
	HBsAg (+)	HBsAg (-)	P 值	HBsAg (+)	HBsAg (-)	P 值
频率 [阳性反应者 / 总志愿者 (%)]						
第一次免疫接种						
pPfcSP	4/6 (66.7)	2/4 (50.0)	0.6	1/8 (12.5)	0/6 (0)	0.37
pHBsAg	6/6 (100.0)	2/4 (50.0)	0.05	7/8 (87.5)	6/6 (100.0)	0.37
P 值	0.12	1.00		0.003	0.0005	
第二次免疫接种后						
pPfcSP	5/6 (83.0)	3/4 (75.0)	0.75	3/7 (42.9)	5/6 (83.0)	0.14
pHBsAg	5/6 (83.0)	3/4 (75.0)	0.75	7/7 (100.0)	6/6 (100.0)	-
P 值	1.00	1.00		0.018	0.3	
频率 [阳性试验数 / 总试验数 (%)]						
第一次免疫接种后						
pPfcSP	4/15 (26.7)	2/11 (18.2)	0.61	2/23 (8.7)	0/15 (0)	-
pHBsAg	12/15 (80.0)	3/11 (27.3)	0.007	16/23 (69.6)	9/15 (60.0)*	0.54
P 值	0.0034	0.61		0.00002	-	
第二次免疫接种后						
pPfcSP	9/18 (50)	7/12 (58.3)	0.65	3/21 (14.3)	12/18 (66.7)	0.0008
pHBsAg	12/18 (66.7)	7/12 (58.3)	0.64	16/21 (76.2)	17/18 (94.4)*	0.12
P 值	0.31	1.00		0.00006	0.035	
强度 [净 SFC/10 ⁶ PBMC (几何平均值)]						
第一次免疫接种后						
pPfcSP	19.5-52.2 (33.7)	53.1-82.5 (66.2)	0.23	35.6-54.4 (44.0)	neg	-
pHBsAg	13.5-80.0 (37.7)	21.3-144.4 (46.0)	0.54	13.1-222.9 (60.1)	13.1-132.5 (33.9)*	0.013
P 值	0.41	0.78		0.052	-	
第二次免疫接种后						
pPfcSP	18.1-68.8 (33.8)	11.7-122.5 (37.9)	0.11	25.0-54.4 (37.6)	17.5-125.6 (46.1)	0.09
pHBsAg	18.8-131.3 (52.8)	17.9-215.0 (57.6)	0.34	20.0-278.8 (62.3)	12.5-317.5 (97.3)*	0.013
P 值	0.024	0.29		0.0032	0.0001	

*来自未引发组的 HBsAg 血清反应阳性的志愿者在第二次免疫后对 HBsAg 的 IFN- γ 反应的频率和强度都比第一次免疫后明显增加, P 值分别为 0.035 和 0.00003。

在未引发过的志愿者中, 无论他们是否具有抗HBsAg抗体, 所有受试者都对HBsAg有高的IFN- γ 反应(表3和4; 参阅未引发过的志愿者)。如表3中所示, 在施加第一剂RTS,S疫苗后, 已存在抗HBsAg抗体的受试者对HbsAg肽集合的反应强度明显高于无这些抗体的受试者的反应强度(SFC/10⁶PBMC的范围[几何平均值]: 13.1-222.9[60.1]对13.1-132.5[33.9],

$p = 0.013$)。不过,在第二次RTS,S疫苗免疫后,这两组之间IFN γ 的强度就没有差异了(参阅反应强度资料)。与第一次RTS,S疫苗免疫后相比,第二次RTS,S疫苗免疫后,HBsAg抗体阴性受试者中对HBsAg的反应显著增加(表3)。具体而言,两次RTS,S疫苗免疫后阳性试验的频率是17/18,而第一次RTS,S免疫后则为9/15 ($p=0.035$) (见表3的脚注)。而IFN - γ 反应的强度是12.5-317.5[几何平均值 = 97.3],只免疫一次的IFN - γ 反应强度是13.1-132.5[几何平均值 = 533.9] ($p=0.024$) (参阅表3的脚注)。第二次RTS,S免疫后,HbsAg抗体阴性受试者中SFC的数目明显高于HbsAg抗体阳性受试者中SFC的数目(12.5-317.5[97.3]对20.0-278.8[62.3], $p=0.013$) (表3)。

如表3中所提供的,对PfcSP的IFN - γ 反应显示出与对HbsAg的反应的不同模式。一次RTS,S疫苗免疫后,14名未引发过的志愿者中有13名对HBsAg有反应,其中包括8名HBsAg阳性志愿者中的7名和所有的6名HBsAg阴性志愿者。相反,在这14名受试者中只有1名对PfcSP起反应 ($p = 0.0049$),此名起反应者是8名HBsAg阳性志愿者之一,而所有6名HBsAg阴性志愿者均无此反应。总而言之,按照第一和第二剂RTS,S免疫后检测的阳性反应者和阳性试验的频率,在所有未用DNA引发的志愿者中RTS,S诱发的对PfcSP的IFN - γ 反应显著低于它所诱发的对HBsAg的反应,在原先已存在抗HBsAg抗体的受试者中甚至更低(表3)。参见对于未引发的志愿者的p值。同样的,在HBsAg抗体阳性 ($p<0.05-0.0032$) 和抗体阴性受试者 ($p=0.0001$) 中,每一次免疫接种后IFN - γ 反应的强度也更低(表3)。参见表3中反应强度部分标出的p值。这些资料证实,在未引发的受试者中,RTS,S引发了对PfcSP和对HBsAg的T细胞反应,对HBsAg的反应显著强于对PfcSP的反应(表4)。

在DNA引发过且HbsAg抗体阳性的志愿者中,第一剂RTS,S免疫后对HBsAg的阳性试验的数目高于对PfcSP的阳性试验的数目(12/15对4/15, $p = 0.0034$) (表3)。不过,在施用第二剂RTS,S疫苗后,在HBsAg抗体阳性的志愿者中对PfcSP的阳性试验的频率与对HBsAg的阳性试验的频率无

差异。参阅针对DNA引发过的志愿者的频率数据。在DNA引发过且HbsAg抗体阴性的志愿者中，这些频率在第一剂和第二剂RTS,S疫苗接种后无差异。无论HbsAg抗体的情况如何，在第一剂RTS,S疫苗接种后对PfCSP和HbsAg的反应强度是相似的（表3）。但在DNA引发过且HBsAg抗体阳性的受试者中施用第二剂RTS,S后，与对PfCSP的反应强度相比，对HBsAg的反应强度显著增加（SFC/ 10^6 PBMC的范围[几何平均值]：18.1-68.8[33.8]对18.8-131.3[52.8]， $p = 0.024$ ）。这些结果表明，如果施用多剂RTS,S疫苗，最终对HBsAg的反应会比对PfCSP的反应占优势。

实施例 5

DNA 疫苗在人体中诱发了 Tc1 ($CD8^+$) 和 Th1 ($CD4^+$) 型反应，
而 RTS,S 只诱发了 Th1 反应

单独用PfCSP DNA疫苗或单独用RTS,S疫苗能诱发IFN- γ 反应，所以在施用第二剂RTS,S疫苗后，在两组中IFN- γ 反应就阳性反应者而言是相当的（8/10对11/14）（表1）。不过，如前所报道的，单独用PfCSP DNA疫苗或单独用RTS,S疫苗诱导的IFN- γ 反应随不同的T细胞亚群而定。DNA免疫诱导了 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞依赖型IFN- γ 反应（107），而RTS,S只诱导了 $CD4^+$ T细胞依赖型反应（61）。

用来自单独用DNA、单独用RTS,S免疫的志愿者或来自DNA引发/RTS,S加强的志愿者的PBMC，分别通过ELISPOT和实时PCR对体外诱导期和效应期中IFN- γ 反应的T细胞谱进行了表征。

用PBMC进行ELISPOT试验，在与肽一起培养之前用抗 $CD4^+$ 或抗 $CD8^+$ 包被的Dynabeads M-450 (Dynal, Inc., Great Neck, NY)耗竭PBMC中的 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ T细胞。在选择性富集的T细胞群中用实时PCR测定IFN- γ mRNA表达水平： $CD4^+/CD45RA^+$ 、 $CD4^+/CD45RA^-$ 、 $CD8^+/CD45RA^+$ 和 $CD8^+/CD45RA^-$ T细胞。在这些测定中，以含10%人AB血清的2ml完全RPMI培养基中有 3×10^6 个细胞/孔的量在24孔板中将冻存的PBMC培养过夜进行复苏，然后用短肽（9-10个氨基酸A2肽序列GILGFVFTL；SEQ ID

NO.27) 刺激2小时, 或用长肽(15-20个氨基酸) 刺激4小时, 肽浓度均为10 μ g/ml。然后, 用MACS MultiSort试剂盒针对CD8⁺或CD4⁺T细胞收获并富集PBMC, 然后使富集的CD4⁺或CD8⁺T细胞通过CD45RA MicroBeads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) 分离CD45RA⁺和CD45RA⁻细胞。

为了用实时PCR对IFN- γ mRNA定量, 用RNeasy试剂盒(Qiagen, Valencia, CA) 从富集的T细胞亚群中分离总RNA。用随机六聚物和TaqMan逆转录试剂盒(PE Applied Biosystems, Foster City, CA) 从总RNA中合成cDNA。在ABI PRISM 7700序列检测仪(Perkin-Elmer) 上用TaqMan PCR试剂盒按照制造商的说明书通过实时PCR对IFN- γ mRNA进行相对定量。设计用于扩增IFN- γ 和GAPDH mRNA的引物、探针和标准物并进行内部标准化。在ABI PRISM7700序列检测仪(Perkin-Elmer) 上用TaqMan PCR试剂盒按照制造商的说明书通过实时PCR对IFN- γ mRNA进行相对定量。设计用于扩增IFN- γ 和GAPDH mRNA的引物(hIFN- γ -F, TTGGTGATGATTTGAACATTGGA, SEQ.ID.NO.28; hIFN- γ -R, CCCAGTTCCTGCAGAGTAGAAAA, SEQ.ID.NO.29; hGAPDH-F, 5'GAAGGTGAAGGTCGGAGTC, SEQ.ID.NO.30; hGAPDH-R, GAAGATGGTGATGGGATTTC, SEQ.ID.NO.31)、探针(hIFN- γ 探针: TGTCACCTTGCAAACACACAGCTTGTCGAA, SEQ.ID.NO.32; hGAPDH探针: CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC, SEQ.ID.NO.33) 并按制造商的说明进行内部标准化。对于每个试验样品都进行GAPDH扩增作为内源性的对照来解释加入各反应的总RNA的量和质的差异。热循环条件是50 $^{\circ}$ C 2分钟和95 $^{\circ}$ C 10分钟, 然后进行50个循环的2步PCR(95 $^{\circ}$ C 15秒和60 $^{\circ}$ C 1分钟)。所有样品均以三等份试样进行扩增。确定与靶mRNA水平负相关的循环阈值(Ct) 为这样的循环数, 在此循环数报道分子荧光发射增加到阈值水平以上。以GAPDH基因的表达值为基础对两个不同样品之间靶基因的表达进行标准化。

为了鉴定体外IFN- γ 反应的诱导期涉及哪些T细胞亚群,在进行ELISPOT测定之前将耗竭后的T细胞群与限定的PfCSP肽一起保温。并行的,将PBMC与用于ELISPOT测定相同的肽一起保温后通过实时PCR在T细胞群的富集亚群中测定IFN- γ 的mRNA表达水平,从而了解真正分泌IFN- γ 的效应T细胞。检测对肽DR.363(只含II型限制性CD4+T细胞表位)和DR.316(含重叠的I型和II型限制性CD4+和CD8+表位)的反应,从而比较通过不同疫苗递送体系针对PfCSP的IFN- γ 反应的潜在机制。同时还并行测定了对来自流感基质蛋白质(Flu M A2)的HLA-A2限制性、免疫显性和保守的CD8+T细胞表位以及对来自破伤风毒素(TT-DR)的HLA-DR限制性CD4+T细胞表位的反应,从而提供了不同表位、试验和志愿者之间的内在统一标准。

对Flu M A2肽的IFN- γ 反应的体外诱导是CD8+T细胞依赖型而非CD4+T细胞依赖型的,因为在PBMC临培养之前耗竭CD8+而非CD4+T细胞完全终止或显著降低了所有17名受试个体中的IFN- γ 反应,无论他们接受的是哪一类型的抗疟疾疫苗(图2a)。相反,在所有被测试的3名阳性反应者中,对于肽TT-DR的反应则完全是CD4+而非CD8+T细胞依赖型的(图2b)。

用实时PCR检测到的4种富集的T细胞群(CD4⁺/CD45RA⁺、CD4⁺/CD45RA⁻、CD8⁺/CD45RA⁺和CD8⁺/CD45RA⁻)中的IFN- γ mRNA表达水平与获自ELISPOT试验的结果一致。用Flu M A2肽刺激后,主要在CD8+T细胞中IFN- γ mRNA上调(图2e: 标准)。IFN- γ mRNA表达水平在CD8+T细胞中提高6.8倍(范围, 3.4-12.9倍),相比之下,在CD4+T细胞中提高了2.2倍(范围, 0.98-7.58倍)($p = 0.03$)。在CD8+T细胞中IFN- γ mRNA上调的百分率超过CD4+T细胞中的,平均为78%(范围62-99%)。相反,用TT-DR刺激后主要在CD4+T细胞中IFN- γ mRNA上调(图2e: 标准)。IFN- γ mRNA水平在CD4⁺T细胞中提高7.6倍(范围, 2.4-18.3),相比之下,在CD8⁺T细胞中提高了2.2倍(范围1.1-4.6)($p = 0.02$)。CD4⁺T细胞中IFN- γ mRNA上调的百分率超过CD8⁺T细胞

中的, 平均为79% (在74-100%之间)。这些结果表明CD8⁺T细胞是针对Flu M A2肽的IFN- γ 反应的功能效应器, 而CD4⁺T细胞则是针对TT-DR肽的效应器。

通过与上述两个标准平行地进行测定, 我们阐明了用DNA PfCSP疫苗或RTS,S疫苗诱导的针对两种不同PfCSP肽 (DR.363和DR.316) 的IFN- γ 反应的T细胞谱。与DR.363包含CD4⁺T细胞表位而不含CD8⁺T细胞表位的事实一致的是, 用耗竭后的T细胞群进行的ELISPOT测定结果显示, 在只接受了PfCSP DNA疫苗 (2/2被测试者, V1和V5) 或只接受了RTS,S疫苗 (6/6被测试者) 的志愿者中, 对肽DR.363的IFN- γ 反应完全是CD4⁺T细胞依赖型的 (图2c)。通过ELISPOT测定发现, 富集的T细胞群中IFN- γ mRNA表达水平与T细胞依赖性相关。在PfCSP DNA和RTS,S疫苗免疫的志愿者中IFN- γ mRNA主要在CD4⁺T细胞中上调 (图2e: DR.363)。在5名DNA免疫过的受测试志愿者中, IFN- γ mRNA水平在CD4⁺T细胞中提高5.3倍 (范围, 2.6-11.5), 相比之下, 在CD8⁺T细胞中提高了1.7倍 (范围, 0.99-3.2) ($p = 0.014$)。在CD4⁺T细胞中IFN- γ mRNA上调超过CD8⁺T细胞中的, 为74% (范围, 64-91%)。在4名RTS,S免疫过的受测试志愿者中观察到同一模式 (图2e), IFN- γ mRNA水平在CD4⁺T细胞中提高9.2倍 (范围, 2.9-53.5), 相比之下, 在CD8⁺T细胞中提高了0.9倍 (范围, 0.6-1.1), 在CD4⁺T细胞中IFN- γ mRNA上调超过CD8⁺T细胞中的, 为86% (范围, 73-98%)。这些结果提供了第一手证据, 表明除了CD8⁺T细胞依赖型IFN- γ 反应之外, DNA PfCSP疫苗在人体中诱发了PfCSP特异且CD4⁺T细胞依赖型的IFN- γ 反应。

对DR.316 (重叠的CD4⁺和CD8⁺T细胞表位) 的IFN- γ 反应在只接受PfCSP DNA疫苗或只接受RTS,S疫苗的志愿者中依赖于T细胞的不同亚群。如以前所报道的 (107), 在只接受DNA (V1) (图2d) 的志愿者中反应既是CD4⁺又是CD8⁺T细胞依赖型的 (107), 相比之下, 在只接受RTS,S疫苗的志愿者中则反应只是CD4⁺而非CD8⁺T细胞依赖型的 (3/3受测试的志愿者) (图2d)。此外, 在DNA免疫的志愿者中IFN- γ mRNA

主要是在CD8⁺T细胞中上调（图2e: DR.316），尽管ELISPOT的测定显示反应既是CD4⁺又是CD8⁺T细胞依赖型的。

IFN- γ mRNA表达水平在CD8⁺T细胞中提高64.7倍，相比之下，在CD4⁺T细胞中提高了0.36倍，在CD8⁺T细胞中IFN- γ mRNA上调超过CD4⁺T细胞中的，为99.6%。相反，在RTS,S疫苗免疫的志愿者中IFN- γ mRNA的转录主要是在CD4⁺T细胞中上调（图2e: DR.316）。IFN- γ mRNA表达水平在CD4⁺T细胞中提高24.7倍（范围，5.3-176.7倍），相比之下，在CD8⁺T细胞中提高了2.5倍（范围，1.1-5.6倍）。在CD4⁺T细胞中IFN- γ mRNA上调超过CD8⁺T细胞中的，为86%（范围，69-98%）。这些结果表明，通过DNA免疫接种，CD4⁺T细胞只在IFN- γ 反应的体外诱导期中被涉及，CD8⁺T细胞是针对DR.316的真正分泌IFN- γ 的细胞。相反，在RTS,S疫苗免疫的受试者中，这些结果表明CD4⁺T细胞是针对同一种肽（DR.316）产生IFN- γ 的效应T细胞。

实施例 6

DNA-引发/RTS,S加强拓宽了产生IFN- γ 的T细胞群的组成

在DNA引发过的志愿者中通过RTS,S疫苗加强，勾画出回忆的产生IFN- γ 的T细胞群的组成。在只用PfcSP DNA疫苗或只用RTS,S疫苗免疫的志愿者中对肽DR.363（不含CD8⁺T细胞表位）的IFN- γ 反应只是CD4⁺T细胞依赖型的。DNA引发过的组在RTS,S加强后在2/3的反应者（V1和V5）中检测到对DR.363的同一类型反应。惊人的是，经RTS,S加强后，通过CD4⁺T细胞中IFN- γ mRNA表达水平估量的反应强度在志愿者V1中提高了94.9倍，在V5中提高了46.7倍，相比之下，在只用DNA免疫3次后，在V1中只增加了7.6倍，而在V5中只增加了12.5倍。见图3中的“只施用DNA”的柱子。与DNA免疫接种后的情况相比，RTS,S加强后V1中反应的强度高出了12.5倍，而在V5中高出了3.7倍（图3；比较“只施用DNA”的柱和“DNA/RTS,S”柱）。

只接受PfcSP DNA疫苗或只接受RTS,S疫苗的志愿者对肽DR.316的

IFN- γ 反应取决于不同的T细胞亚群。DNA诱发的反应在诱导期既是CD4 + T细胞依赖型又是CD8 + T细胞依赖型的，但在效应期则只是CD8 + T细胞依赖型的。检测效应期时，在用肽刺激后对T细胞群进行耗竭。相反，RTS,S诱发的反应则在诱导期和效应期都只是CD4 + T细胞依赖型的。因此，并不令人惊讶的是，DNA引发过的志愿者在RTS,S加强后对DR.316的反应是单独用DNA或RTS,S免疫的志愿者中观察到的两种模式的混合（图2d）。

在体外诱导期，第一次RTS,S免疫后3/5的反应者（4/6次测定）中检测到了对DR.316的CD4⁺和CD8⁺T细胞依赖型IFN- γ 反应。第二次RTS,S免疫后4/6的反应者（7/12次测定）中检测到了完全的CD4 + T细胞依赖型但只是部分CD8 + T细胞依赖型的IFN- γ 反应。耗竭CD8+T细胞不终止IFN- γ 的产生（图4a），表明在RTS,S加强后，CD4 + T细胞与CD8 + T细胞一样产生IFN- γ 。同时，在效应期，IFN- γ mRNA表达水平不仅在CD8 + T细胞中上调（8/8反应者），也在CD4 + T细胞中上调（第一次RTS,S免疫后有4/8名反应者，第二次免疫后有6/8名反应者），相比之下，在只用DNA免疫的志愿者中只在CD8 + T细胞中上调，而在只用RTS,S免疫的志愿者中只在CD4 + T细胞中上调（图2e：用DR.316比较V1（DNA）和V22（RTS,S））。

总而言之，在用RTS,S加强后，8名反应者中有6名的CD8 + 和CD4 + T细胞中都检测到了IFN- γ mRNA的上调，在CD4⁺T细胞中IFN- γ mRNA上调的范围是3.0-28.3倍（几何平均值为6.6倍），在CD8⁺T细胞中IFN- γ mRNA上调的范围是4.0-281.03倍（几何平均值为19.7倍）。在CD4 + T细胞中IFN- γ mRNA的上调百分率超过CD8 + T细胞中的，为23.5%（范围，6.5-45.1%）。此处的结果证明，经RTS,S加强后，DNA引发过的志愿者中的DR.316特异性CD4 + T细胞不仅作为CD8 + T细胞产生IFN- γ 的T辅助细胞（DNA诱导的IFN- γ 反应的一个特征），而且还是产生IFN- γ 的效应细胞（RTS,S诱导的IFN- γ 反应的特征）（表5）。

以上数据证实了在DNA引发 - RTS,S加强的志愿者中的CD8 + T细胞

依赖型IFN- γ 反应，但在未引发的志愿者中则无此反应。这些数据还证实了对同一表位的CD4和CD8依赖型IFN- γ 反应。基于IFN- γ 反应对不同T细胞亚群的依赖性，肽DR.316被鉴定为CD4和CD8重叠表位。

表4: RTS,S免疫后在DNA引发过和未引发过的组之间IFN- γ 反应的比较

IFN- γ 反应的对象	特异抗原 PfCSP		主干抗原 HBsAg	
基线处的 HBsAg 血清学	HBsAg (+)	HBsAg (-)	HBsAg (+)	HBsAg (-)
DNA 引发过的组				
第一剂免疫后	++	++	++	++
第二剂免疫后	++	++	++	++
未引发过的组				
第一剂免疫后	+/-	-	+++	+++
第二剂免疫后	+	++	++++	++++

反应性得分的标准基于有关以下因素的统计学显著性的增加 ($p < 0.05$): (1) 阳性反应者的频率, (2) 阳性试验的频率, 和 (3) 与基线相比阳性反应的强度, 以及 (4) 在第二次免疫后与第一次免疫后进行比较的 IFN- γ 反应的显著性增加。-, 无反应; +/-, 增加但在统计学上不显著; +、++、+++和++++分别表示在4种标准的1、2、3或4种中的显著增加。

实施例 7

在 DNA 引发过/RTS,S 加强的志愿者中的抗体反应

在用 RTS,S 免疫之前和第一次 RTS,S 免疫后 2、4、6 和 8 周以及第二次免疫后 1、2、4 和 6 周检测抗空气干燥的恶性疟原虫孢子的抗体反应。如前所述 (33) 用间接的荧光抗体试验 (IFAT) 测定抗体效价。正如所预计的, 尽管在组间抗体反应有一些变化, 但抗体效价仍然极好 (图 5)。在第二次

RTS,S免疫后4周效价达到最高,几何平均效价在5120-20480之间。不过,除了一个例外之外,在任何时间点针对整个孢子的抗体效价没有统计学上的显著差异。第一次免疫后两周,在从未接受过PfCSP且具有抗HBsAg抗体(DNA-/HB+)的志愿者组中IFAT测定的抗体的几何平均效价是3225,比在已接受过PfCSP且具有抗HBsAg抗体(DNA+/HB+)的志愿者中的几何平均效价718.4高($p = 0.02$)。这主要是由于DNA-/HB+组中一名志愿者的高效价10240造成的,他在6周后,即恰好在预定的第二次RTS,S免疫之前退出了这项研究。在第二次RTS,S免疫后两组间未出现统计学上的显著性差异。

结论

针对类似恶性疟原虫、结核分枝杆菌和HIV等感染的有效且可持久的疫苗的开发过程已被证实了比预计的要更缓慢、更困难和复杂。本发明的以上分析证明了用PfCSP DNA引发并以RTS,S加强可以导致通过免疫系统的细胞和体液免疫诱发反应。而且,在携带抗HBsAg抗体的受试者中,那些用PfCSP引发过的受试者在施用RTS,S佐剂疫苗后产生了比从未接受过PfCSP DNA的志愿者显著更好的T细胞反应。由于免疫或感染,疟疾疫苗或其它疫苗的大部分接受者具有抗HBsAg抗体,这可能为这种引发加强的免疫策略提供重要优势。

这种分析显示,通过在最后一次DNA接种后12-14个月时用RTS,S加强,在50%的志愿者中回忆了DNA引发的PfCSP特异性CTL反应,表明DNA疫苗对于诱发长寿记忆型T细胞反应非常有效。在注射RTS,S后具有回忆CTL反应的5名志愿者中有2名在只用DNA免疫后未检测到CTL,说明用DNA疫苗进行免疫对于在这些受试者中诱导记忆型CTL是有优势的,但可能对于诱发效应T细胞反应则还不是最佳的(38, 92)。由于在只接受了RTS,S的未引发志愿者中未检测到CTL反应,所以RTS,S不能引发PfCSP-特异性CTL,但具有加强DNA疫苗所引发的CTL反应的能力。DNA引发的PfCSP特异性IFN- γ 反应也被RTS,S强烈加强,尤其是在第一剂免疫

后。10名DNA引发过的志愿者中有6人具有针对所有4种测试肽的IFN- γ 反应,而在未引发过的志愿者中只有两人对4种肽中的仅一种有反应。施加两次RTS,S后,尽管反应的频率和强度没有显著的差异,DNA引发过的志愿者中表位水平的IFN- γ 反应宽度显著大于未引发的志愿者中的。8名DNA引发过的志愿者中有7名,而11名未引发过的志愿者中只有3名对至少2种测试肽有反应($p = 0.0094$)。

结果还显示了DNA引发/RTS,S加强可以拓宽产生IFN- γ 的T细胞群的组成。DNA引发开启了两种产生IFN- γ 的T细胞谱:(1)针对重叠的CD4⁺/CD8⁺T细胞表位(DR.316和DR.318)的CD4⁺T细胞依赖型CD8⁺类型1反应,和(2)针对DR限制性CD4⁺T细胞表位(DR.363)的CD4⁺类型1 IFN- γ 反应。另一方面,单独施用RTS,S只诱发了CD4⁺类型1 IFN- γ 反应(图2)。至于DR.316,一种重叠的CD4⁺/CD8⁺T细胞表位,单独施用DNA诱发了针对此肽的CD4⁺依赖型CD8⁺类型1反应,而单独施用RTS,S诱发了针对此肽的CD4⁺类型1反应。不过,用DNA引发和用RTS,S加强同时诱发了针对DR.316的两种模式的IFN- γ 反应(图4,表4)。此外,RTS,S刺激了针对DNA引发后未检测到的新CTL表位的CTL反应。

CD4⁺T细胞可能对CD8⁺T细胞产生IFN- γ 起到了旁观者辅助功能。通过在体外用肽刺激PBMC之前和之后在耗竭后的或富集后的T细胞群中分别平行进行ELISPOT测定和实时PCR,以上结果证实了这种假设。肽刺激之前或之后对产生IFN- γ 的细胞数目和IFN- γ mRNA表达水平的比较勾勒了单独施用DNA疫苗和单独施用RTS,S疫苗诱发的IFN- γ 反应中涉及的功能性T细胞谱。

这里的结果提示了DNA引发可以将加强后的反应定向于已引发的抗原。对于用RTS,S进行免疫,这一点似乎尤为重要。用HBsAg作为载体设计RTS,S,它会增强T细胞对疟疾抗原PfCSP的反应。基线水平携带抗HBsAg抗体的受试者事先已用乙型肝炎疫苗免疫。在撒哈拉沙漠以南的非洲传递的抗疟疾疫苗预期会有这样的靶群体,该靶群体明显天然暴露于HBsAg中或事先用HBsAg免疫接种。

DNA引发过和未引发过的志愿者之间对PfCSP的IFN- γ 反应的比较显示出在那些已存在抗HBsAg抗体的受试者中有显著的差异(表1、3和5)。就各个体对HBsAg和PfCSP的IFN- γ 反应的平行比较显示了在所有未用DNA引发的志愿者中RTS,S诱导的对PfCSP的IFN- γ 反应显著低于对HbsAg的反应,在先前已存在抗HBsAg的受试者中甚至更低。尽管13/14的对照志愿者在一剂RTS,S免疫后对HBsAg起反应,但对PfCSP的IFN- γ 反应却只在14名受试者中的一人中检测到。另一方面,在DNA引发过的志愿者中对主干抗原的反应对于诱导对PfCSP的IFN- γ 反应只有微弱的影响或无影响,因为在用RTS,S加强后HBsAg血清反应阳性和血清反应阴性的受试者之间对PfCSP的IFN- γ 反应的频率和强度是相当的(表5)。这些结果证实了DNA引发T细胞反应并使其定向于特异抗原,并平衡期望的免疫性和背景应答。无论其抗HBsAg的血清反应性如何,DNA引发过的志愿者对PfCSP和HBsAg二者具相当的IFN- γ 反应;未引发的志愿者对HBsAg的IFN- γ 反应显著高于对PfCSP的反应(表4)。

目前有相当多的研究致力于产生重组融合蛋白质和表达靶蛋白的重组病毒及细菌。在许多案例中,对于HBsAg、痘苗、脊髓灰质炎病毒和伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)而言,被免疫的个体将具有预先存在的抗这些疫苗主干组分的抗体。在携带抗这些疫苗主干组分(如HBsAg)的抗体的受试者中,与单独用重组蛋白质引发的情况相比,用编码靶蛋白的DNA引发显著增强了对这些蛋白质的T细胞免疫反应,这一事实可能是此引发加强的免疫策略的一个优点。

表5 抗原特异性 IFN- γ 反应的 T 细胞群组成

肽	单独施加 DNA	单独施加 RTS,S	DNA 引发/RTS,S 加强
Flu M A2 (CD8 ⁺ T 表位)			
诱导期	CD8 +	CD8 +	CD8 +
效应期	CD8 +	CD8 +	CD8 +
TT - DR (CD4 ⁺ T 表位)			

诱导期	CD4 +	CD4 +	CD4 +
效应期	CD4 +	CD4 +	CD4 +
PfCSP DR.363 (CD4⁺T 表位)			
诱导期	CD4 +	CD4 +	CD4 +
效应期	CD4 +	CD4 +	CD4 +
PfCSP DR.316 (重叠的 CD4⁺和 CD8⁺T 表位)			
诱导期	CD4 + 和 CD8 +	CD4 +	CD4 + 和 CD8 +
效应期	CD8 +	CD4 +	CD8 + 和 CD4 +

用DNA作为疫苗载体引发免疫反应可以使最初的T细胞反应集中于重组免疫原上，这仅仅是因为那是表达于DNA疫苗中的唯一外源蛋白。尽管作为疫苗载体而言，重组RTS,S或痘病毒可能本质上比DNA载体更具有免疫原性，但病毒感染的细胞可以产生许多与重组免疫原竞争T细胞免疫优势的病毒来源表位。许多接受疫苗的受试者最可能已天然暴露过载体抗原，或已接受过在重组病毒或蛋白质中含此抗原的其它疫苗接种，因此针对载体抗原的效应反应将干扰针对特异抗原的T细胞反应的诱发。

在此研究中，通过DNA引发/重组蛋白质加强的免疫策略，在人类志愿者中同时实现了抗原特异性CD4 + 辅助细胞、CD8 + T细胞依赖型CTL和IFN - γ 反应以及Th1型CD4 + T细胞依赖型IFN - γ 反应。此策略能诱导免疫反应的两个武器，为预防性和治疗性疫苗提供了独一无二的优越性。

以下出版物以及本申请中任何部分提及的文献均在此特别并入作为参考：

1. Aguiar JC, Hedstrom RC, Rogers WO, Charoenvit Y, Sacci JB Jr, Lanar DE, Majam VF, Stout RR 和 Hoffman SL. 利用无针头喷射装置通过免疫接种增强兔子对疟疾 DNA 疫苗的免疫应答 (Enhancement of the immune response in rabbits to a malaria DNA vaccine by immunization

with a needle-free jet device) . *Vaccine* 20: 275-80 (2001).

2. Aidoo, M. , Lalvani,A., Allsopp, C. E. , Plebanski, M. , Meisner, S. J. , Krausa, P. , Browning, M. , Morris Jones, S. , Gotch, F., Fidock, D. A. 等, 用于针对疟疾的细胞毒性 T 淋巴细胞诱导性疫苗的保守抗原性组分的确定 (Identification of conserved antigenic components for a cytotoxic T lymphocyte-inducing vaccine against malaria) . *Lancet* 345: 1003 (1995).

3. al Yaman, F. , Genton, B. , Anders, R., Falk M, Triglia T, Lewis, D. 等, 对恶性疟原虫裂殖子表面抗原 - 2 的体液应答和巴布亚新几内亚高地地方病区疟疾发病率之间的关系 (Relationship between humoral response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 and malaria morbidity in a highly endemic area of Papua New Guinea) . *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51: 593 (1994).

4. al Yaman, F. , Genton, B. , Anders R, Taraika J, Ginny M, Mellor S 等, 与 RESA 和 SPf66 相较而言的针对恶性疟原虫 MSP2 的体液反应在巴布亚新几内亚孩子临床疟疾防护中的作用 (Assessment of the role of the humoral response to *Plasmodium falciparum* MSP2 compared to RESA and SPf66 in protecting Papua New Guinean children from clinical malaria) . *Parasite Immunol* 17: 493 (1995).

5. Anders RF, Crewther PE, Edwards S, Margetts M, Matthew ML, Pollock B, Pye D. 用重组 AMA - 1 进行免疫保护小鼠免受疟原虫感染 (Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*) . *Vaccine* 16 (2-3): 240-7 (1998).

6. Barouch, D. H.等.通过细胞因子增加的 DNA 疫苗接种对恒河猴病毒血症的控制以及临床 AIDS 的预防(Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination) . *Science* 290,486-92. (2000).

7. Blackman, M. J. , Heidrich, H. G , Donachie, S. , McBride, J. S.和 Holder, A. A. 疟疾裂殖子表面蛋白的一个单一片段在红细胞侵入期间留在

寄生虫上且是抑制侵入的抗体的靶目标 (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.172: 379 (1990).

8. Bojang KA, Milligan PJ, Pinder M, Vigneron L, Allouche A, Kester KE, Ballou WR, Conway DJ, Reece WH, Gothard P, Yamuah L, Delchambre M, Voss G, Greenwood BM, Hill A, McAdam KP, Tornieporth N, Cohen JD, Doherty T; RTS, S Malaria Vaccine Trial Team. 在冈比亚半免疫的成年男人中施用 RTS,S/AS02 疟疾疫苗抵御恶性疟原虫感染的效率: 一个随机试验 (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 (2001).

9. Brazolot Millan CL, Weeratna R, Krieg AM, Siegrist CA, Davis HL. CpG DNA 能在年轻小鼠中诱发针对 B 型肝炎表面抗原的强 Th1 体液和细胞介导的免疫反应 (CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice) .Proc Natl Acad Sci U SA. 95: 15553-8 (1998).

10. Burns, J. M. , Daly, T. M. , Vaidya, A. B.和 Long, C. A. 约氏疟原虫裂殖子表面抗原编码基因的 3'部分编码了保护性单克隆抗体识别的表位 (The 3'portion of the gene for a *Plasmodium yoelii* merozoite surface antigen encodes the epitope recognized by a protective monoclonal antibody) . Proc.Natl.Acad. Sci. USA 5: 602 (1988).

11. Calarota, S.等, 在 HIV-1 感染的患者中 DNA 疫苗接种所诱发的细胞毒性反应 (Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients) . Lancet 351: 1320-25 (1998).

12. Chang, S. P. , Case, S. E. , Gosnell, W. L. , Hashimoto, A. , Kramer, K. J., Tam,L. Q. , Hashiro, C. Q. , Nikaido, C. M. , Gibson, H. L. , Lee Ng, C. T. , Barr, P. J. , Yokota, B. T.和 Hut, G. S. 恶性疟原虫裂殖子表

面蛋白 1 的重组杆状病毒 42KD 的 C - 末端片段保护夜猴免受疟疾感染(A recombinant baculovirus 42-kilodalton C-terminal fragment of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 protects Aotus monkeys against malaria) .Infect. Immun. 64: 253 (1996).

13. Charoenvit, Y., Leef, M. L., Yuan, L. F., Sedegah, M.和 Beaudoin, R. L., 定向于阶段特异性孢子体抗原的疟原虫单克隆抗体的特性 (Characterization of plasmodium yoelii monoclonal antibodies directed against stage- specific sporozoite antigens) . Infect. Immun. 55: 604 (1987).

14. Charoenvit, Y., Collins, W. E., Jones, T. R., Millet, P., Yuan, L., Campbell, G. H., Beaudoin, R. L., Broderick, J. R.和 Hoffman, S. L. 疟疾疫苗不能诱导针对其序列内保护性表位的抗体 (Inability of malaria vaccine to induce antibodies to a protective epitope within its sequence) . Science 251: 668 (1991).

15. Charoenvit, Y., Mellouk, S., Cole, C., Bechara R.等. 约氏疟原虫: 分子量 17kD 的肝炎和红细胞阶段蛋白是抑制性单克隆抗体的靶目标 (Plasmodium yoelii :17-kD hepatic and erythrocytic stage protein is the target of an inhibitory monoclonal antibody).Exp Parasitol. 80: 419-429 (1995).

16. Charoenvit, Y., Fallarone Majam, V., Corradin, G. P.等, 用来自疟原虫的且分子量为 17kD 的肝细胞红细胞蛋白的线性合成肽进行免疫针对小鼠疟疾的 CD4 + T 细胞和 γ 干扰素依赖型保护 (CD4+ T-cell-and gamma interferon dependent protection against murine malaria by immunization with linear synthetic peptide from plasmodium yoelii 17-kilodalton hepatocyte erythrocyte protein) .Infect. Immun. 67: 5604-5614 (1999).

17. Clark, J. T, Donachi S., Anand R.等, 来自恶性疟原虫裂殖子表面且分子量为 46 - 53kD 的糖蛋白(46-53 kD glycoprotein from the surface of Plasmodium falciparum merozoites) . Mol Biochem. 32: 15-24 (1988).

18. Collins, W. E., Galland, G. G., Sullivan, J. S.和 Morris, C. L. 选择不同菌株的疟原虫用于测试秘鲁夜猴中血液阶段的疫苗 (Selection of different strains of *Plasmodium falciparum* for testing blood-stage vaccines in *Aotus nancymai* monkeys) . *Am. J.Trop. Med. Hyg.* 51: 224-232 (1994).

19. Collins, W. E., Pye, D., Crewther, P. E., Vandenberg, K. L., Galland, G. G., Sulzer, A. J., Kemp, D. J., Edwards, S. J., Coppel, R. L., Sullivan, J. S., Morris, C. L.和 Anders, R. F. 用脆弱疟原虫的重组顶膜抗原 - 1 在松鼠猴诱发的预防免疫性 (Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of *Plasmodium fragile*). *Am. J. Trop. Med. Hyg* 51: 711-719 (1994).

20. Daly, T. M.和 Long, C. A., 约氏疟原虫 *yoelli* 17XL 裂殖子表面蛋白 1 的 15kD 的重组羧基末端片段在小鼠中诱发了保护性免疫反应 (A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal fragment of *plasmodium yoelii* 17XL merozoite surface protein 1 induces a protective immune response in mice). *Infect. Immun.* 61: 2462-2467 (1993).

21. Dame JB, Williams JL, McCutchan TF, Weber JL, Wirtz RA, Hockmeyer WT, Maloy WL, Haynes JD, Schneider I, Roberts D 等, 人疟疾寄生虫恶性疟原虫孢子体上免疫显性表面抗原编码基因的结构 (Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*) . *Science* 225 (4662): 593-9 (1984).

22. Daubersies P, Thomas AW, Millet P, Brahimi K, Langermans JA, Ollomo B, BenMohamed L, Slierendregt B, Eling W, Van Belkum A, Dubreuil G, Meis JF, Guerin Marchand C, Cayphas S, Cohen J, Gras-Masse H, Druilhe P 和 Mohamed LB, 用保守的前红细胞肝阶段抗原 3 免疫黑猩猩预防恶性疟原虫疟疾 (Protection against *Plasmodium falciparum* malaria in chimpanzees by immunization with the conserved pre-erythrocytic liver-stage antigen 3) . *Nat Med.* 6: 1258-63 (2000).

23. Davis HL, Weeratna R, Waldschmidt TJ, Tygrett L, Schorr J, Krieg AM, Weeranta R. 在用重组 B 型肝炎表面抗原免疫的小鼠中 CpG DNA 是特异免疫性的有效增强子 (CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen) . *J Immunol.* 160: 870-6 (1998).

24. Deans, J. A. 血液阶段诺氏疟原虫寄生虫的预防性抗原 (Protective antigens of blood stage plasmodium knowlesi parasites) . *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol.* 307: 159-169 (1984).

25. Deans, J. A., Knight, A. M., Jean, W. C., Waters, A. P., Cohen, S. 和 Mitchell, G. H. 在猕猴中用较小的无变化的诺氏疟原虫的 66kD 裂殖子抗原进行的疫苗接种试验 (Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, plasmodium knowlesi 66 kD merozoite antigen) . *Parasite Immunol.* 10: 535-552 (1988).

26. Delplace P, Bhatia A, Cagnard M et al. 蛋白质 p126: 与恶性疟原虫裂殖子相关的寄生泡抗原 (Protein pl26: a parasitophorous vacuole antigen associated with the release of Plasmodium falciparum merozoites) . *Biol Cell* 64: 215 (1987).

27. Doolan, D. L., Sedegah, M., Hedstrom, R. C., Hobart, P., Charoenvit, Y. 和 Hoffman, S. L., 用多基因 DNA 免疫接种避开疟疾预防中的遗传限制: CD8 + T 细胞、 γ 干扰素和一氧化氮依赖的免疫性 (Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multi- gene DNA immunization: CD8+ T cell, interferon-gamma, and nitric oxide dependent immunity) . *J. Exp. Med.* 183: 1739-1746 (1996).

28. Doolan, D. L., Hedstrom, R. C., Rogers, W. O., Charoenvit, Y., Rogers, M., De la Vega, P. 和 Hoffman, S. L., 约氏疟原虫预防性肝细胞红细胞蛋白 17kDa 基因 - 恶性疟原虫输出蛋白 1 的同系物的识别和鉴定 (Identification and characterization of the protective hepatocyte erythrocyte protein 17kDa gene of plasmodium yoelii, homolog of

Plasmodium falciparum exported protein 1). *J. Biol.Chem.* 271: 17861-17868 (1996).

29. Doolan, D. L., Hoffman, S. L., Southwood, S., Wentworth, P. A., Sidney, J., Chestnut, R. W., Keogh, E., Apella, E., Nutman, T. B., Lal, A. A., Gordon, D. M., Oloo, A.和 Sette, A., HLA - A 和 HLA - B 父型等位基因所限制的来自恶性疟原虫的退化细胞毒性 T 细胞表位 (Degenerate cytotoxic T cell epitopes from *P. falciparum* restricted by HLA-A and HLA-B supertypes alleles). *Immunity* 7: 97-112 (1997).

30. Doolan DL, Hedstrom RC, Gardner MJ, Sedegah M, Wang H, Gramzinski RA, Margalith M, Hobart P 和 Hoffman SL, 将 DNA 疫苗接种作为控制疟疾的一个方法: 目前的状态和策略 (DNA vaccination as an approach to malaria control: current status and strategies). *Curr Topic Microbiol Immunol* 226: 37-56 (1998).

31. Doolan DL, Hoffman SL. 在 *Plasmodium yoelii* 模型中用 CD8 + T 细胞引发针对疟疾的抗原特异继承性免疫性需要 IL - 12 和 NKI 细胞 (IL-12 and NK cells are required for antigen- specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model. *J.Immunol* 163 (2): 884-92 (1999).

32. Egan, J. E., Weber, J. L., Ballou, W. R., Hollingdale, M. R., Majarian, W. R., Gordon, D. M., Maloy, W. L., Hoffman, S. L., Wirtz, R. A., Schneider, I., Woollett, G. R., Young, J. F.和 Hockmeyer, W. T., 小鼠疟疾孢子体疫苗的效力: 对人疫苗开发的意义 (Efficacy of murine malaria sporozoite vaccines: implications for human vaccine development). *Science* 236: 453-456 (1987).

33. Epstein J, Gorak E, Y Charoenvit, R Wang, N Freyberg, O Osinowo, TL Richie, E Stoltz, F Trespalacios, J Nerges, J Ng, V Fallanne-Majam, E Abot, L Goh, S Parker, S Kumar, R Hedstrom, J Norman, R Stout, SL Hoffman., 通过针头或无针喷射注射施用 PfCSP

DNA 疟疾疫苗后抗体反应的安全性、耐受力和缺乏, 以及肌肉内和肌肉内/皮层内组合路径的比较 (Safety, Tolerability and Lack of Antibody Responses following Administration of a PfCSP DNA Malaria Vaccine via Needle or Needle-free Jet Injection, and Comparison of Intramuscular and Combination Intramuscular/Intradennal Routes). *Human Gene Therapy* 13: 1551-60 (2002).

34. Etlinger, H. M., Caspers, P., Matile, H., Schoenfeld, H. J., Stueber, D.和 Takacs, B., 重组或天然蛋白质保护猴子免受恶性疟原虫异体攻击的能力 (Ability of recombinant or native proteins to protect monkeys against heterologous challenge with *Plasmodium falciparum*). *Infect. Immun.* 59: 3498-3503 (1991).

35. Freeman, R. R.和 Holder, A. A., 用纯化的约氏疟原虫裂殖体抗原免疫 BALB/c 小鼠的保护性反应的特性 (Characteristics of the protective response of BALB/c mice immunized with a purified plasmodium yoelii schizont antigen). *Clin.Exp. Immunol.* 54: 609-616 (1983).

36. Gordon DM, McGovern TW, Krzych U, Cohen JC, Schneider I, LaChance R, Heppner DG, Yuan G, Hollingdale M, Slaoui M 等, 重组产生的恶性疟原虫环孢子蛋白-B 型肝炎表面抗原亚基疫苗的安全性、免疫原性和效力 (Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine). *J Infect Dis* 171: 1576-85 (1995).

37. Gramzinski RA, Maris DC, Doolan D, Charoenvit Y, Obaldia N, Rossan R, Sedegah M, Wang R, Hobart P, Margalith M 和 Hoffman S. 夜猴的疟疾 DNA 疫苗 (Malaria DNA vaccines in Aotus monkeys). *Vaccine* 15: 913-915 (1997).

38. Gurunathan, S., Wu, C. Y., Freidag, B. L. & Seder, R. A., DNA 疫苗: 诱发长期细胞免疫性的手段 (DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity). *Curr Opin Immunol* 12, 442-7 (2000).

39. Harnyuttanakorn P, McBride JS, Donachie S, Heidrich HG, Ridley RG, 恶性疟原虫 RAP-1 蛋白上邻近蛋白水解位点的抑制性单克隆抗体识别表位 (Inhibitory monoclonal antibodies recognise epitopes adjacent to a proteolytic cleavage site on the RAP-1 protein of *Plasmodium falciparum*). *Mol Biochem Parasitol.* 55: 177-86 (1992).

40. Hedstrom R, Doolan D, Wang R 等, 恶性疟原虫前红细胞阶段 DNA 疫苗的体外表达和体内免疫原性 (In vitro expression and in vivo immunogenicity of *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic stage DNA vaccines). *Int J Molec Med* 2: 29-38 (1998).

41. Herrington, D., Davis, J., Nardin, E., Beier, M., Cortese, J., Eddy, H., Losonsky, G., Hollingdale, M., Sztein, M., Levine, M., Nussenzweig, R. S., Clyde, D. 和 Edelman, R., 用受辐射孢子体对人进行成功免疫: 受保护个体的体液和细胞反应 (Successful immunization of humans with irradiated sporozoites: humoral and cellular responses of the protected individuals). *Am.J Trop. Med. Hyg.* 45: 539-547 (1991).

42. Hilgers LA, Snippe H, Jansze M, Willers JM., 合成佐剂对体液免疫反应的增效作用 (Synergistic effects of synthetic adjuvants on the humoral immune response). *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 79: 392-6 (1986).

43. Hilgers LA, Snippe H, Jansze M, Willers JM., 合成的硫脂多糖: 体液免疫反应的新佐剂 (Synthetic sulpholipopolysaccharides: novel adjuvants for humoral immune responses). *Immunology.* 60: 141-6 (1987).

44. Hill AVS, Elvin J, Willis AC 等, HLA-B53 和抗严重疟疾之间联系的分子分析 (Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria). *Nature* 360: 434 (1992).

45. Hoffman, S. L. 和 Doolan, D. L., 定向于受感染肝细胞的疟疾疫苗 (Malaria vaccines-targeting infected hepatocytes). *Nature Med.* 6: 1218-19 (2000).

46. Holder, A. A.和 Freeman, R. R. 利用纯化的寄生虫抗原针对血液阶段啮齿动物疟疾的免疫接种 (Immunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens). *Nature* 294: 361-364 (1981).

47. Horn NA, Meek JA, Budahazie G, Marquet M., 利用质粒 DNA 的癌症基因疗法: 纯化 DNA 用于人体临床试验 (Cancer Gene Therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials). *Human Gene Therapy* 6 (5): 565-73 (1995).

48. Inselburg, J., Bzik, D. J., Li, W. B., Green, K. M., Kansopon, J., Hahm, B. K., Bathurst, I.C., Barr, P. J. and Rossan, R. N., 恶性疟原虫重组 SERA 蛋白在夜猴中诱发的预防免疫性(Protective immunity induced in Aotus monkeys by recombinant SERA proteins of Plasmodium falciparum). *Infect. Immun.* 59: 1247-1250 (1991).

49. Inselburg, J., Bathurst, I. C., Kansopon, J., Barchfeld, G. L. , Barr, P. J.和 Rossan, R. N., 恶性疟原虫重组 SERA 蛋白在夜猴中诱发的预防免疫性: 对预防免疫性诱导的辅助作用 (Protective immunity induced in Aotus monkeys by a recombinant SERA protein of Plasmodium falciparum : adjuvant effects on induction of protective immunity). *Infect. Immun.* 61: 2041-2047 (1993).

50. Kedzierski L, Black CG 和 Coppel RL., 用重组的约氏疟原虫裂殖子表面蛋白 4/5 进行免疫接种保护小鼠免受致命攻击 (Immunization with recombinant Plasmodium yoelii merozoite surface protein 4/5 protects mice against lethal challenge). *Infect Immun.* 68: 6034-7 (2000).

51. Kensil CR, Patel U, Lennick M, Marciani D. , 来自 Quillajasaponaria Molina 皮层且具有佐剂活性的皂角甙的分离和定性 (Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from Quillajasaponaria Molina cortex). *J Immunol.*146: 431-7 (1991).

52. Kensil, C. R. 作为疫苗佐剂的皂角甙 (Saponins as vaccine adjuvants). *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 12: 1-55 (1996).

53. Kester K.E.,McKinney D. A.,Tornieporth N, Ockenhouse C. F. , Heppner D. G , Hall T. , Krzych U. , Delchambre M, Voss G, Dowler MG, Palensky J, Wittes J, Cohen J, Ballou WR; RTS,S 疟疾疫苗鉴定小组(RTS, S Malaria Vaccine Evaluation Group), 抗实验性恶性疟原虫疟疾的重组环孢子蛋白疫苗法的效力 (Efficacy of Recombinant Circumsporozoite Protein Vaccine Regimens Against Experimental Plasmodium falciparum Malaria). J Infect Dis 183 (4): 640-7 (2001).

54. Kester, K. E.等, 抗实验性恶性疟原虫疟疾的重组环孢子蛋白疫苗法的效力 (Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental Plasmodium falciparum malaria). J. Infect. Dis. 183: 640-47 (2001).

55. Khusmith, S., Charoenvit, Y., Kumar, S., Sedegah, M., Beaudoin, R. L.和 Hoffman, S. L., 用孢子体表面蛋白 2 加 CS 蛋白质进行疫苗接种预防疟疾 (Protection against malaria by vaccination with sporozoite surface protein 2 plus CS protein). Science 252: 715-718 (1991).

56. Khusmith, S., Sedegah, M.和 Hoffman, S. L., 通过识别孢子体表面蛋白 2 的 CD8 + 细胞毒性 T 细胞克隆的继承性转移完全预防约氏疟原虫的感染 (Complete protection against Plasmodium yoelii by adoptive transfer of a CD8+ cytotoxic T cell clone recognizing sporozoite surface protein 2). Infect. Immun. 62: 2979-2983 (1994).

57. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, KoretzkyGA, Klinman DM., 细菌 DNA 中的 CpG 基元触发直接的 B 细胞活化 (CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation). Nature. 374: 546-9 (1995).

58. Kumar, S., Yadava, A., Keister, D. B., Tian, J. H., Ohl, M., Perdue Greenfield, K. A., Miller, L. H.和 Kaslow, D. C., 在夜猴中重组的恶性疟原虫裂殖子表面蛋白 - 1 的免疫原性和体内效力 (Immunogenicity and in vivo efficacy of recombinant Plasmodium falciparum merozoite surface

protein-1 in Aotus monkeys). Mol.Med. 1: 325-332 (1995).

59. Kumar S, Collins W, Egan A, Yadava A, Garraud O, Blackman MJ, Patino JA, Diggs C, Kaslow DC., 以裂殖子表面蛋白 1 的 19kD 末端为基础的多种辅助试剂中的四种重组恶性疟原虫疫苗在夜猴中的免疫原性和效力 (Immunogenicity and Efficacy in Aotus monkeys of Four Recombinant Plasmodium falciparum Vaccines in Multiple Adjuvant Formulations Based on the 19-Kilodalton C Terminus of Merozoite Surface Protein 1). Infect Immun 68: 2215- 2223 (2000).

60. Lacaille-Dubois, M 和 Wagner H., 有关皂角苷生物学和药理学活性的综述 (A review of the biological and pharmacological activities of saponins). Phytomedicine 2: 363-386 (1996).

61. Lalvani A, Moris P, Voss G, Pathan A 等, 利用 RTS,S/SBAS2 - 一种重组恶性疟原虫疟疾疫苗强诱导聚焦的 Th1 型细胞和体液免疫应答 (Potent induction of focused Th1-Type cellular and humoral immune responses by RTS, S/SBAS2, a recombinant Plasmodium falciparum malaria vaccine). J Infect Dis 180: 1656-64 (1999).

62. Le T, Coonan K, Hedstrom R 等, 疟疾 DNA 疫苗肌肉内施用于健康成年志愿者后的安全性、耐受性和体液免疫反应 (Safety, tolerability, and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers). Vaccine 18: 1893-1901 (2000).

63. Lee, A. Y.等, 特异于 DNA 免疫接种所引发的免疫显性 HCV 特异性 CTL 表位的细胞毒性 T 细胞数目的定量 (Quantification of the number of cytotoxic T cells specific for an immunodominant HCV-specific CTL epitope primed by DNA immunization). Vaccine 18: 1962-68 (2000).

64. Luke CJ, Carner K, Liang X, Barbour AG., 基于 ospA 的 DNA 疫苗保护小鼠免受疏螺旋体的感染 (An ospA-based DNA vaccine protects mice against infection with Borrelia burgdorferi). J Inf Dis 175: 191-7

(1997)。

65. Majarian WR, Daly TM 等, 用 IgG3 单克隆抗体进行针对小鼠疟疾的被动免疫 (Passive immunization against murine malaria with an IgG3 monoclonal antibody). *J Immunol* 132 : 3131 (1984)。

66. Malik, A., Egan, J. E., Houghten, R. A., Sadoff, J. C.和 Hoffman, S. L., 抵御恶性疟原虫环子孢子蛋白的人细胞毒性 T 淋巴细胞 (Human cytotoxic T lymphocytes against the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3300-3304 (1991)。

67. Martin T, Parker SE, Hedstrom R 等, 质粒 DNA 疟疾疫苗: 肌肉内注射后基因整合的可能性 (Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration following intramuscular injection). *Human Gen Ther* 10: 759-68 (1999)。

68. McCluskie MJ, Davis HL., CpG DNA 是通过鼻内施用针对抗 B 型肝炎表面抗原的全身性和粘膜免疫反应的有效增强子 (CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice). *J Immunol*. 161: 4463-6 (1998)。

69. Moreno, A., Clavijo, P., Edelman, R., Davis, J., Sztein, M., Herrington, D.和 Nardin, E., 来自孢子体免疫过的志愿者的细胞毒性 CD4 + T 细胞识别恶性疟原虫 CS 蛋白 (Cytotoxic CD4+ T cells from a sporozoite-immunized volunteer recognize the Plasmodium falciparum CS protein). *Int. Immunol.* 3: 997-1003(1991)。

70. Mosmann, T. R.和 Coffman, R. L., TH1 和 TH2 细胞: 淋巴因子分泌的不同模式导致了不同的功能特性 (TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties). *Ann. Rev. of Immunol.* 7: 145-173 (1989)。

71. Musti, A. M., Zehner, Z., Bostian, K. A., Paterson, B. M.和

Kramer, R. A., 用小鸡基因同源序列分离且编码甘油醛 3 - 磷酸脱氢酶的两两种酵母基因的转录定位 (Transcriptional mapping of two yeast genes coding for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isolated by sequence homology with the chicken gene). *Gene* 25: 133-143 (1983).

72. Oeuvray C, Bouharoun Tayoun H, Gras Masse H 等, 裂殖子表面蛋白 3: 一种诱导抗体的疟疾蛋白质, 与血液单核细胞合作加强杀死恶性疟原虫 (Merozoite surface protein-3 : a malaria protein inducing antibodies that promote Plasmodium falciparum killing by cooperation with blood monocytes). *Blood* 84: 1594 (1994).

73. Oeuvray C, Bouharoun Tayoun H, Gras Masse H 等, 恶性疟原虫的新裂殖子表面抗原 (MSP - 3), 通过抗体的细胞 - 抗体协作机制抗原性和生物活性识别 (A novel merozoite surface antigen of Plasmodium falciparum (MSP-3), identified by cellular-antibody cooperative mechanism antigenicity and biological activity of antibodies). *Mem Inst Oswaldo Cruz Supp2* : 77 (1994).

74. Panina-Bordignon P, Tan A, Termijtelen A, Demotz S, Corradin G, Lanzavecchia A., 普遍的免疫原性 T 细胞表位: 与人 II 性 MHC 混杂结合并被 T 细胞不加选择的识别 (Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells). *Eur J Immunol* 12 : 2237-42 (1989).

75. Parker SE, Borellini F, Wenk ML 等, 质粒 DNA 疟疾疫苗: 在小鼠和兔子中的组织分布和安全性研究 (Plasmid DNA malaria vaccine: tissue distribution and safety studies in mice and rabbits). *Human Gene Ther* 10 (5): 741-58 (1999).

76. Perrin, L. H., Dayal, R.和 Rieder, H., 来自与人免疫血清反应的红细胞阶段恶性疟原虫的抗原的特性 (Characterization of antigens from erythrocytic stages of Plasmodium falciparum reacting with human immune sera). *Trans.R. Soc. Trop. Med. Hyg* 75: 163-165 (1981).

77. Perrin, L. H., Ramirez, E., Lambert, P. H.和 Miescher, P. A., 用单克隆抗体抑制人红细胞中恶性疟原虫的生长 (Inhibition of *P.falciparum* growth in human erythrocytes by monoclonal antibodies). *Nature* 289: 301-303 (1981).

78. Potocnjak, P., Yoshida, N., Nussenzweig, R. S.和 Nussenzweig, V., 针对孢子体表面抗原 (Pb44) 的单克隆抗体的单价片段 (Fab) 保护小鼠免受疟疾感染 (Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malaria infection). *J. Exp. Med.* 151: 1504-1513 (1980).

79. 蛋白质 - 结构和分子特性, 第二版 (Proteins-Structure and Molecular Properties), 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, 纽约, 1993.

80. Ramasamy R., 对人疟疾寄生虫恶性疟原虫 - 外源凝集素结合特性中的糖蛋白和可能的糖 - 蛋白质联接的研究 (Studies on glycoproteins in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*-lectin binding properties and the possible carbohydrate-protein linkage). *Immunol Cell Biol* 65: 147 (1987).

81. Ramasamy RJ, Jones G, Lord R., 疟疾疫苗候选抗原上抑制性单克隆抗体限定表位的特性 (Characterization of an inhibitory monoclonal antibody defined epitope on a malaria vaccine candidate antigen). *Immunol Lett* 23: 305 (1990).

82. Rattan 等, 蛋白质合成: 翻译后修饰和老化 (Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging). *Ann NY Acad Sci* 663: 48-62 (1992).

83. Remington 制药学, 第 18 版 (Remington's Pharmaceutical Sciences), 18th Edition (A. Gennaro 编辑, Mack Pub., Easton, Pa., 1990).

84. Ridley RG, Takacs B, Etlinger H, Scaife JG., 恶性疟原虫的棒状体抗原在松鼠猴中起保护作用 (A rhoptry antigen of *Plasmodium*

falciparum is protective in Saimiri monkeys). *Parasitology* 101: 187-92 (1990).

85. Rodrigues, M. M., Cordey, A.-S., Arreaza, G. , Corradin, G. , Romero, P., Maryanski, J. L. , Nussenzweig, R. S.和 Zavala, F., 针对约氏疟原虫环孢子蛋白的 CD8 + 细胞毒性 T 细胞克隆预防疟疾(CD8+ cytolytic T cell clones derived against the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein protect against malaria). *Int. Immunol.* 3: 579-585 (1991).

86. Rogers, W. O.等, 针对诺氏疟原虫疟疾的多阶段多抗原异源引发强化疫苗为恒河猴提供了部分保护 (Multistage multiantigen heterologous prime boost vaccine for *Plasmodium knowlesi* malaria provides partial protection in rhesus macaques). *Infect Immun* 69: 5565-72 (2001).

87. Romero, P., Maryanski, J. L., Corradin, G., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V.和 Zavala F., 克隆的细胞毒性 T 细胞识别环孢子蛋白中的表位并预防疟疾 (Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria). *Nature* 341: 323-325 (1989).

88. Saul A, Lord R, Jones GL 等, 用恶性疟原虫抗原 MSA2 的恒定肽进行的预防性免疫 (Protective immunization with invariant peptides of the *Plasmodium falciparum* antigen MSA2). *J Immunol* 148: 208 (1992).

89. Schofield L, Bushell GR, Cooper JA 等, 恶性疟原虫的棒状体抗原包含了抑制性单克隆抗体识别的保守和可变表位 (A rhoptry antigen of *Plasmodium falciparum* contains conserved and variable epitopes recognised by inhibitory monoclonal antibodies). *Mol Biochem Parasitol.* 18: 183-95 (1986).

90. Schofield L, Villaquiran J, Ferreira A 等, 针对疟疾孢子体的免疫性所需的 γ 干扰素、CD8 + T 细胞和抗体(Gamma-interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites). *Nature.* 330: 664-666 (1987).

91. Sedegah, M.等, 通过基于 DNA 的免疫接种诱导的改进的预防免疫性: 用抗原和编码 GM-CSF 的质粒 DNA 引发并用表达抗原的重组痘病毒强化 (Improving protective immunity induced by DNA-based immunization: priming with antigen and GM-CSF-encoding plasmid DNA and boosting with antigen-expressing recombinant poxvirus). *J Immunol* 164 : 5905-12 (2000).

92. Seder, R. A. & Hill, A. V., 针对需要细胞免疫性的细胞内感染的疫苗 (Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity). *Nature* 406,793-8. (2000).

93. Seguin MC, Klotz FW, Schneider I, Weir JP, Goodbary M, Slayter M 等, 一氧化氮合酶的诱导帮助暴露于受辐射伯氏疟原虫感染蚊子中的小鼠抵御疟疾 (Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated Plasmodium berghei infected mosquitoes: involvement of interferon gamma and CD8+ T cells). *J Exp Med* 180: 353-358 (1994).

94. Seifter 等, 蛋白质修饰和非蛋白辅助因子的分析 (Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors). *Meth Enzymol* 182 : 626-646 (1990).

95. Shi, Y. P., Sayed, U., Qari, S. H., Roberts, J. M., Udhayakumar, V., Oloo, A. J., Hawley, W. A., Kaslow, D. C., Nahlen, B. L.和 Lal, A. A., 针对恶性疟原虫裂殖子表面蛋白 1 的 C 末端 19kD 结构域的天然免疫反应 (Natural immune response to the C-terminal 19-kilodalton domain of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1). *Infect.Immun.* 64: 2716-2723 (1996).

96. Siddiqui, W. A., Tam, L. Q., Kramer, K. J., Hui, G S., Case, S. E., Yamaga, K. M., Chang, S. P., Chan, E. B.和 Kan, S. C., 裂殖子表面包被前体蛋白完全预防了夜猴患恶性疟原虫疟疾 (Merozoite surface coat precursor protein completely protects aotus monkeys against Plasmodium

falciparum malaria). *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* 84 : 3014-3018 (1987).

97. Sim BKL, Orlandi PA, Haynes JD 等, 175K 的恶性疟原虫红细胞结合抗原的一级结构以及引起抑制疟疾裂殖子入侵的抗体的肽的识别 (*Primary structure of the 175K Plasmodium falciparum erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which eleicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion*). *J Cell Biol* III: 1877 (1990).

98. Sim BKL, Chitnis CE, Deal CD 等, 恶性疟原虫: 裂殖子配基 EBA - 175 的功能活性区的进一步定性 (*Plasmodium falcipaum: further characterization of a functionally active region of the merozoite ligand EBA-175*). 78: 259 (1994).

99. Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG 等, 抗恶性疟原虫疟疾的环孢子体疫苗的初步研究 (*A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against Plasmodium falciparum malaria*). *N Eng J Med* 336: 86-91 (1997).

100. Stoute JA, Kester KE, Krzych U 等, 用 RTS,S 疟疾疫苗免疫后的长期效力和免疫反应 (*Long-term efficacy and immune responses following immunization with the RTS, S malaria vaccine*). *J Infect Dis* 178: 1139-44(1998).

101. Thomas AW, Trape JF, Rogier C, Goncalves A, Rosario VE, Narum DL., 利用全长的杆状病毒重组 PF83/AMA-1 进行捕捉-酶-联接免疫吸附测定检测到抗恶性疟原虫 83kD 的顶膜抗原(PF83/AMA-1)的天然抗体的高普遍性 (*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 : 730-40 (1994).

102. Thomas AW, Narum D, Waters AP, Trape JF, Rogier C, Goncalves A, Rosario V, Druilhe P, Mitchell GH, Dennis D., 针对人和非

人灵长类疟疾中 AMA - 1 家族分子的免疫性概况(Aspects of immunity for the AMA-1 family of molecules in humans and non-human primates malarias). Mem Inst Oswaldo Cruz 89 Suppl 2: 67-70 (1994).

103. Valenzuela, P., Gray, P., Quiroga, M.等,B 型肝炎表面抗原主要蛋白编码基因的核苷酸序列 (Nucleotide Sequences of the Gene Coding for the Major Protein of Hepatitis B Virus Surface Antigen). Nature 280: 815-819 (1979).

104. Wang, R., Charoenvit, Y., Corradin, G., De la Vega, P., Franke, E. D.和 Hoffman, S. L., 通过约氏疟原虫 孢子体表面蛋白 2 线性肽诱导被感染肝细胞的 CD4 + T 细胞和 IFN - γ 依赖型消除来预防疟疾 (Protection against malaria by Plasmodium yoelii sporozoite surface protein 2 linear peptide induction of CD4+ T cell-and IFN-gamma-dependent elimination of infected hepatocytes). J.Immunol. 157: 4061-4067 (1996).

105. Wang, R., Doolan, D. L., Le, T. P., Hedstrom, R. C., Coonan, K. M., Charoenvit, Y., Jones, T. R., Hobart, P., Margalith, M., Ng, J., Weiss, W. R., Sedegah, M., de Taisne, C., Norman, J. A.和 Hoffman, S. L., 用疟疾 DNA 疫苗在人体中诱发抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine). Science 282: 476- 480 (1998).

106. Wang R, Doolan DL, Charoenvit Y, Hedstrom RC, Gardner MJ, Hobart P, Tine J, Sedegah M, Fallarme V, Sacci JB Jr, Kaur M, Klinman DM, Hoffman SL, Weiss WR., 通过用四种恶性疟原虫 DNA 质粒的混合物进行免疫在非人灵长类中同时诱发多重抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (Simultaneous induction of multiple antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonhuman primates by immunization with a mixture of four Plasmodium falciparum DNA plasmids). Infect Immun 66 : 4193-202 (1998).

107. Wang R, Epstein J, Baraceros FM, Gorak EJ, Charoenvit Y,

Carucci DJ, Hedstrom RC, Rahardjo N, Gay T, Hobart P, Stout R, Jones TR, Richie TL, Parker SE, Doolan DL, Norman J, Hoffman SL., 用疟疾 DNA 疫苗在人体中诱发 CD4 (+) T 细胞依赖型 CD8 (+) 1 型反应 (Induction of CD4 (+) T cell-dependent CD8 (+) type 1 responses in humans by a malaria DNA vaccine). PNAS-USA 98 (19): 10817-22 (2001).

108. Weiss WR, Sedegah M, Beaudoin RL, Miller LH, Good MF., 用疟疾孢子体对小鼠进行的预防性免疫中需要 CD8 + T 细胞(细胞毒性/抑制物) (CD8+ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites). PNAS-USA. 85 (2): 573-6 (1988).

109. Weiss WR, Berzofsky JA, Houghten RA, Sedegah M, Hollindale M, Hoffman SL., 定向于预防小鼠感染约氏疟原虫和伯氏疟原虫的环子孢子蛋白的 T 细胞克隆 (A T cell clone directed at the circumsporozoite protein which protects mice against both Plasmodium yoelii and Plasmodium berghei). J Immunol 15; 149 (6): 2103-9 (1992).

110. WHO Report. 世界疫苗和免疫现状 (State of the World's Vaccines and Immunization). Geneva: World Health Organization. (1996).

111. Wize, B. , Rogers, W. O. , Houghten, R. A. , Lanar, D. E. , Tine, J. A.和 Hoffman, S. L., 针对恶性疟原虫孢子体表面蛋白 2 的小鼠细胞毒性 T 淋巴细胞的诱导 (Induction of murine cytotoxic T lymphocytes against Plasmodium falciparum sporozoite surface protein 2). Eur. J. Immunol. 24: 1487-1495 (1994).

112. Wize, B. , Houghten, R. , Church, P. , Tine, J. A. , Lanar, D. E. , Gordon, D. M., Ballou, W. R. , Sette, A. and Hoffman, S. L., HLA - A2 限制性细胞毒性 T 淋巴细胞在孢子体免疫的志愿者中与多种恶性疟疾孢子体表面蛋白 2 表位反应 (HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple Plasmodium falciparum sporozoite surface protein 2 epitopes in

sporozoite-immunized volunteers). J. Immunol. 155: 766-775 (1995).

113. Wold, F., 蛋白质的翻译后修饰: 前景和展望, 1-12, 蛋白质的翻译后共价修饰 (Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, 1-12, in Post-translational Covalent Modification of Proteins), B. C. Johnson, Ed., Academic Press, 纽约, 1983.

114. Yang C, Collins WE, Sullivan JS 等, 用阻滞性共聚物佐剂中的裂殖子表面蛋白 1 的重组 C 末端片段进行免疫在松鼠猴中局部预防 Plasmodium vivax 的血液阶段感染(Partial protection against Plasmodium vivax blood-stage infection in Saimiri monkeys by immunization with a recombinant C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 in block copolymer adjuvant). Infect Imm 2 67: 342 (1999).

115. Zinsser Microbiology 1180-83 (Wolfgang K. Joklik, Hilda P. Willett, D. Bernard Amos和Catherine M. Wilfert 编辑, 第20版, Appleton and Lange 1992).

从此处公布的本发明的详述和实践中本领域技术人员显而易见本发明的其它实施方案。说明书和实施例均只起例证性说明的作用, 以下权利要求才指出了本发明真正的范围和精神。

序列表

<110> 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS, S.A.)
由海军部长代表的美利坚合众国 (THE UNITED STATES OF AMERICA REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE NAVY)

<120> 抗疟疾的疫苗接种方法

<130> 04012.0374-01139

<140>

<141>

<150> 60/447,026

<151> 2003-02-13

<150> 60/420,265

<151> 2002-10-23

<160> 33

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 1

Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu

1

5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 2

Glu Pro Ser Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr

1

5

10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 3

Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg
1 5 10

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 4

Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr
1 5

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 5

Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp
1 5 10 15

Ser Pro Cys Ser
20

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 6

Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp
1 5 10

<210> 7
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 7
Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe
1 5 10 15
Asn Val Val Asn Ser
20

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 8
Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Ala
1 5 10 15
Asn Asp Ile Glu
20

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 9
Asn Glu Glu Pro Ser Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys
1 5 10 15

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 10

Asp	Lys	His	Ile	Lys	Glu	Tyr	Leu	Asn	Lys	Ile	Gln	Asn	Ser	Leu
1				5				10						15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 11

Glu	Tyr	Leu	Asn	Lys	Ile	Gln	Asn	Ser	Leu	Ser	Thr	Glu	Trp	Ser
1				5				10						15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 12

Ile	Gln	Asn	Ser	Leu	Ser	Thr	Glu	Trp	Ser	Pro	Cys	Ser	Val	Thr
1				5				10						15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 13

Ser	Thr	Glu	Trp	Ser	Pro	Cys	Ser	Val	Thr	Cys	Gly	Asn	Gly	Ile
1				5				10						15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 14
Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys
1 5 10 15

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 15
Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn
1 5 10 15

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 16
Gln Val Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp Glu
1 5 10 15

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 17
Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Glu Asn
1 5 10 15

<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 18
Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Glu Asn Asp Ile Glu Lys Lys
1 5 10 15

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 19
Leu Asp Tyr Ala Asn Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu
1 5 10 15

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 20
Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe
1 5 10 15

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 21

Ile Cys Lys Met Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe Asn Val Val Asn
1 5 10 15

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 22

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 23

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 23

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu Thr
20

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 24

Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu
1 5

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 25

Ala Gly Leu Leu Gly Asn Val Ser Thr Val Leu Leu Gly Gly Val
1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 26

Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser
1 5 10 15

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 27

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的引物

<400> 28

ttggtgatga tttgaacatt gga

23

<210> 29

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的引物

<400> 29

cccagttcct gcagagtaga aaa

23

<210> 30

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的引物

<400> 30

gaaggtgaag gtcggagtc

19

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的引物

<400> 31

gaagatggtg atgggatttc

20

<210> 32

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的引物

<400> 32

tgtcacttgc aaacacacag cttgtcgaa

29

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的引物

<400> 33

caagcttccc gttctcagcc

20

图1

图 1a: DNA 免疫后 PICSP 特异性 CTL

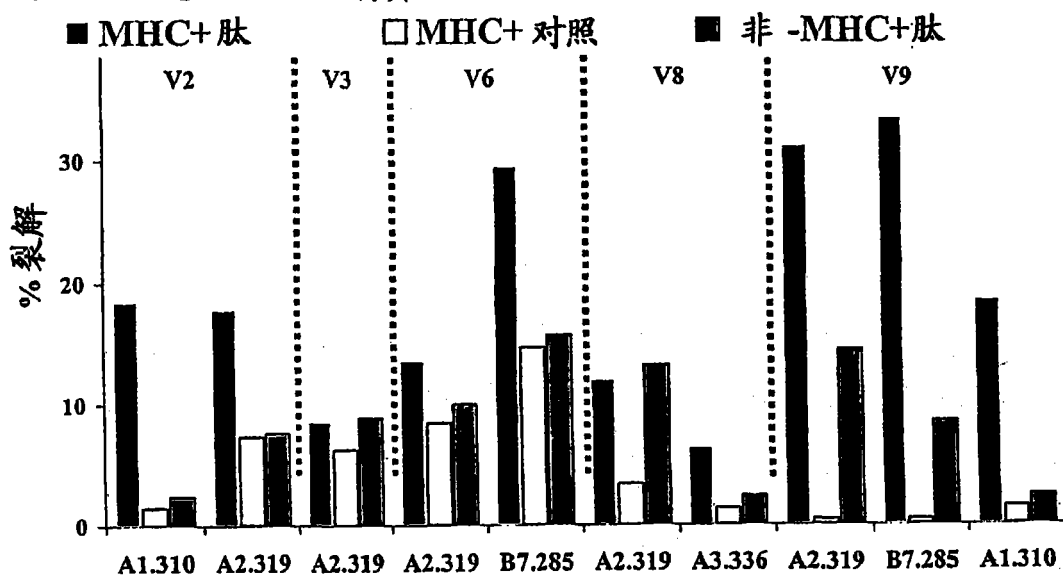


图 1b: 临用 RTS,S 加强前 PICSP 特异性 CTL

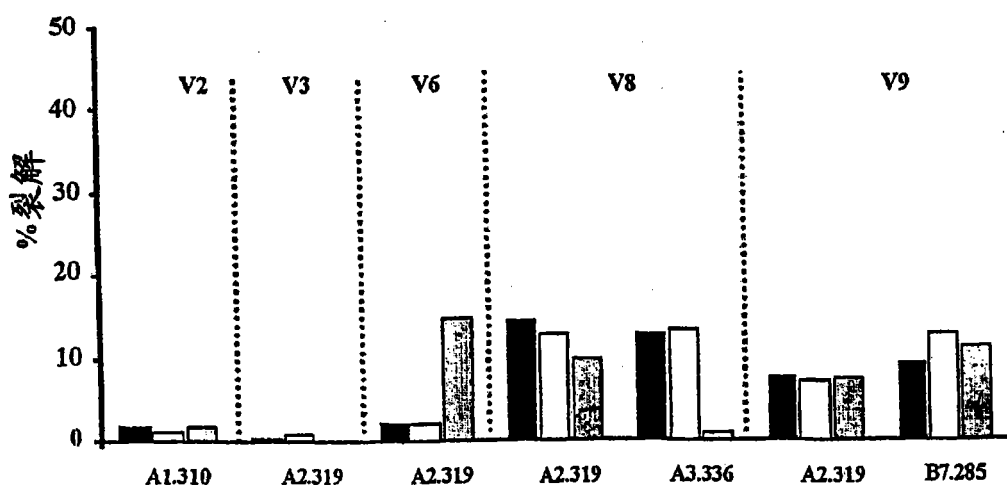


图1

图1c: RTS,S加强后 P1CSP特异性 CTL

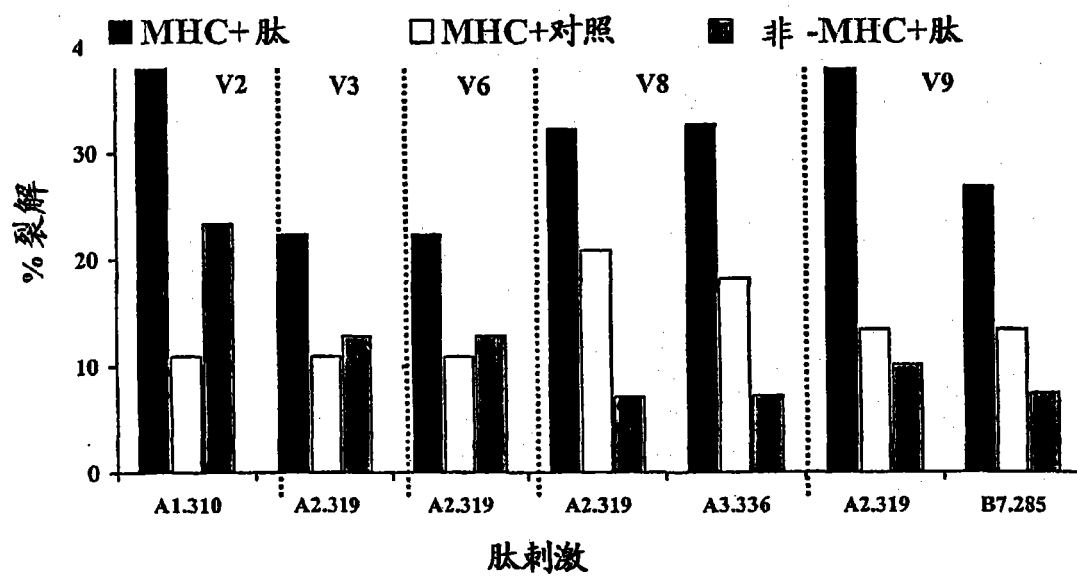
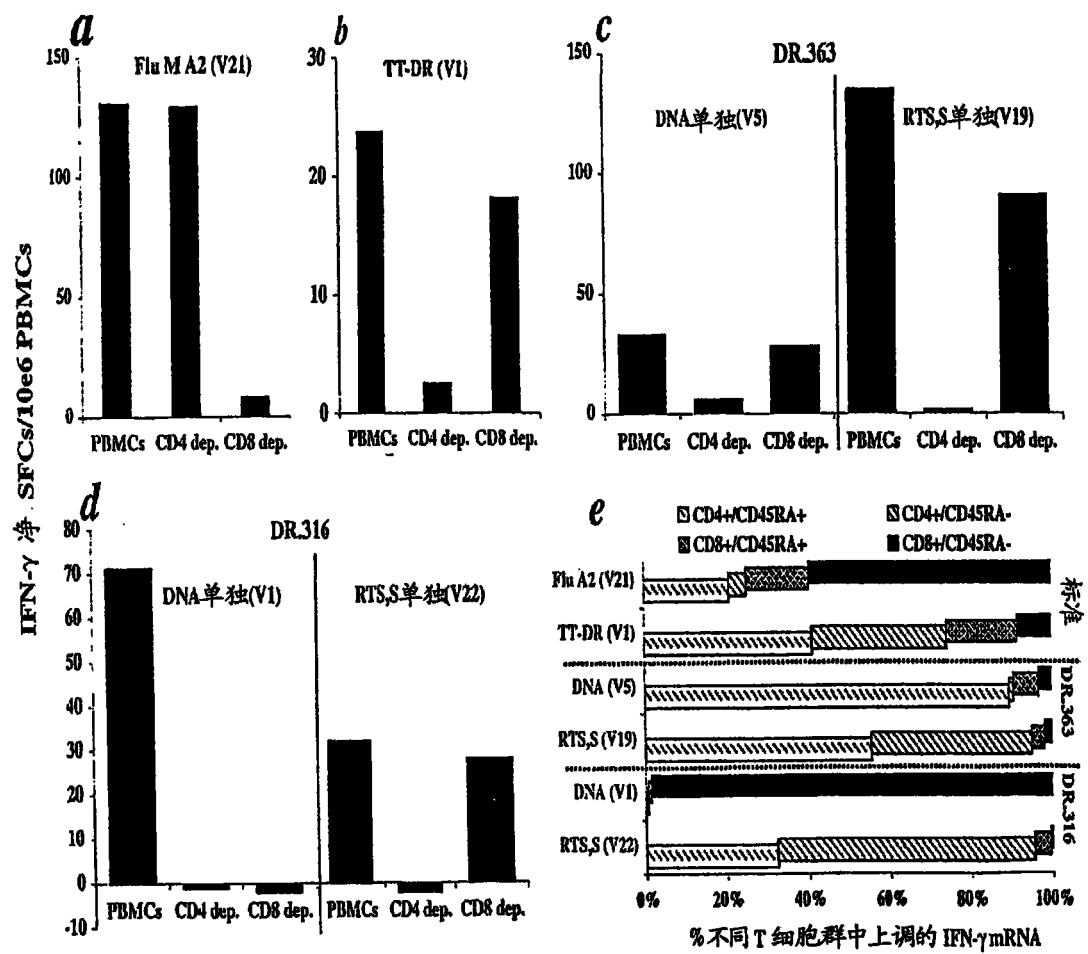


图 2



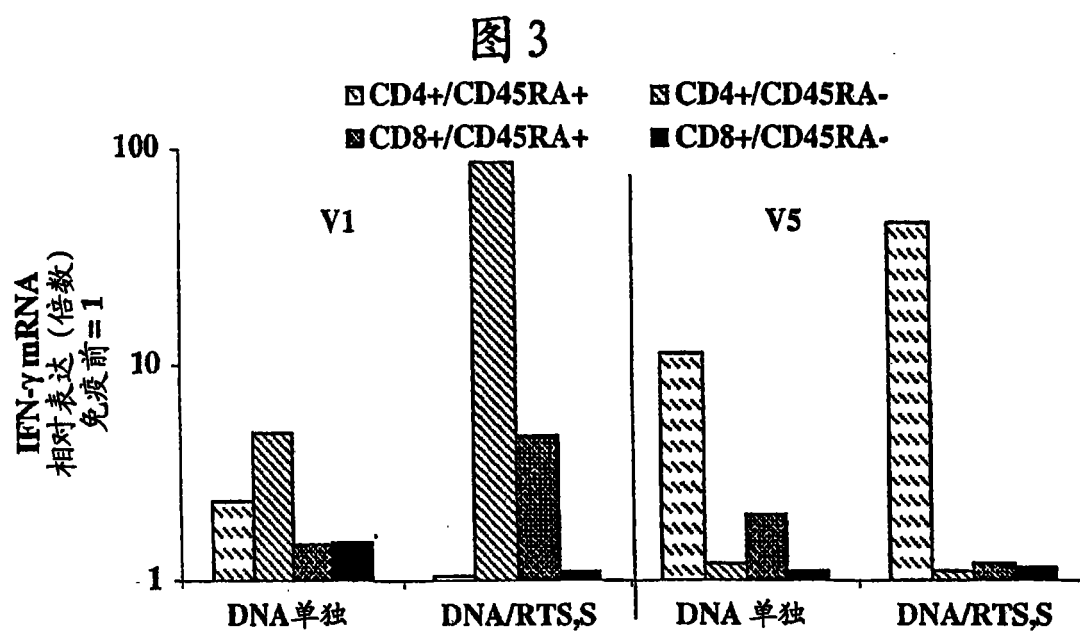


图 4

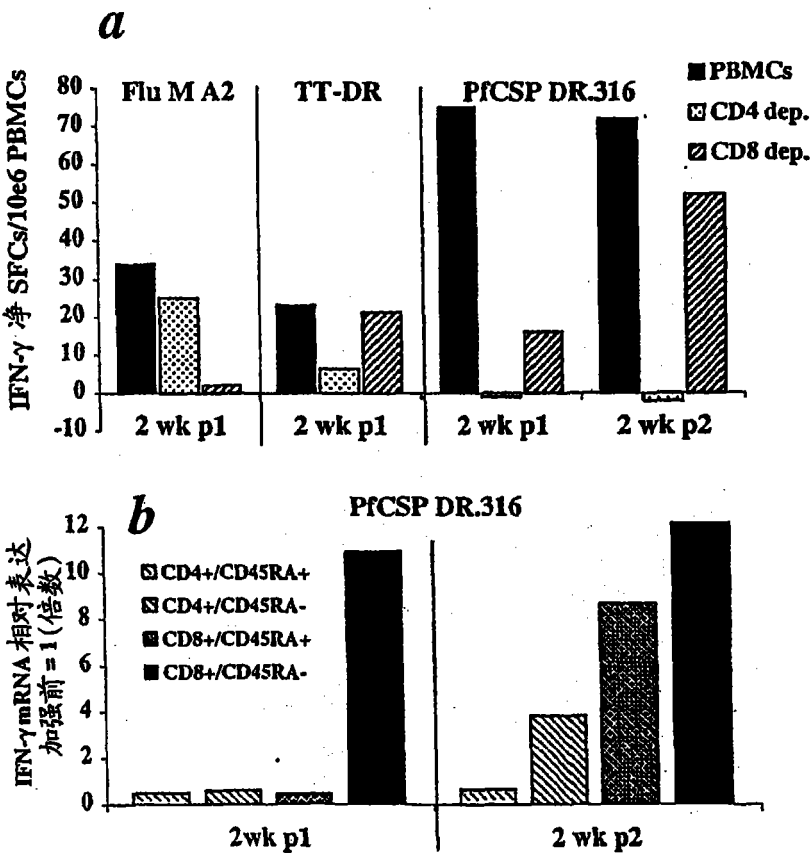
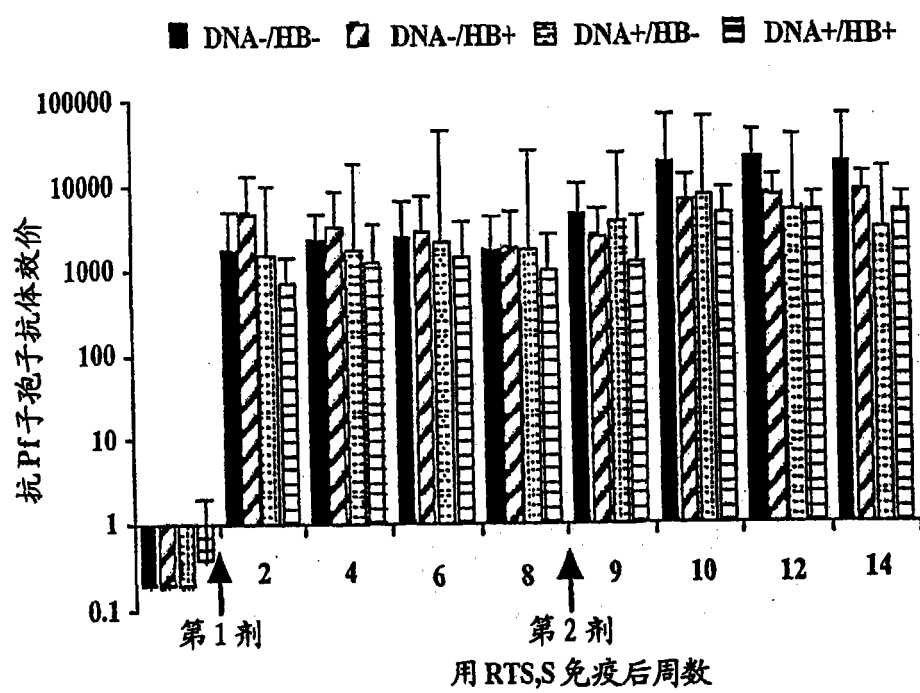


图 5



专利名称(译)	抗疟疾的疫苗接种方法		
公开(公告)号	CN101077416A	公开(公告)日	2007-11-28
申请号	CN200710126985.2	申请日	2003-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司 由海军部长代表的美利坚合众国		
申请(专利权)人(译)	葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司 由海军部长代表的美利坚合众国		
当前申请(专利权)人(译)	葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司 由海军部长代表的美利坚合众国		
[标]发明人	SL霍夫曼 R王 JE爱泼斯坦 JD科恩		
发明人	S· L· 霍夫曼 R· 王 J· E· 爱泼斯坦 J· D· 科恩		
IPC分类号	A61K39/02 A61K39/005 A01N43/04 G01N33/53		
CPC分类号	Y02A50/412 Y02A50/58		
优先权	60/447026 2003-02-13 US 60/420265 2002-10-23 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及通过疫苗接种抗疟疾感染的方法。本发明方法涉及利用基于DNA的疫苗引发抗疟疾免疫应答和用基于蛋白质的疫苗加强该应答。本发明方法也涉及通过用基于蛋白质的疫苗进行加强来拓宽所产生的免疫应答。

图 1

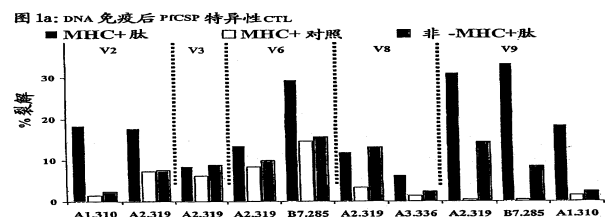


图 1b: 临用 RTS,S 加强前 PICSP 特异性 CTL

