

[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 200480038655.2

[51] Int. Cl.

C12N 15/30 (2006.01)
C07K 14/445 (2006.01)
A61K 39/015 (2006.01)
C07K 16/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 1 月 17 日

[11] 公开号 CN 1898384A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

[22] 申请日 2004.10.22

[21] 申请号 200480038655.2

[30] 优先权

[32] 2003.10.24 [33] EP [31] 03292673.5

[86] 国际申请 PCT/EP2004/012909 2004.10.22

[87] 国际公布 WO2005/040203 英 2005.5.6

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.23

[71] 申请人 巴斯德研究院

地址 法国巴黎

[72] 发明人 皮埃尔·德吕耶 苏巴哈什·辛格
杜·梭梭 佩德罗·麦吉亚

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 林晓红

权利要求书 14 页 说明书 109 页 序列表 30 页
附图 86 页

[54] 发明名称

MSP-3 样基因家族

[57] 摘要

本发明涉及抗疟疾。更具体地，本发明涉及包括已知的 MSP-3 基因的新的基因家族，且该基因家族具有异常过剩的暴露表位，由此提示该基因家族在该寄生虫的免疫原性方面具有重要作用。对该基因家族的表征能够确定抗恶性疟原虫的新的免疫原性和疫苗组合物。本发明还涉及抗原性多肽组合物，其包含至少一个 MSP-3-b 样基序和至少一个 MSP-3-c/d 样基序。

1. 抗原性多肽组合物，包含至少一个 MSP-3-b 样基序和至少一个 MSP-3-c/d 样基序。

2. 权利要求 1 的抗原性多肽组合物，包含至少两个不同的 MSP-3-b 样基序和/或至少两个不同的 MSP-3-c/d 样基序。

3. 权利要求 1 的抗原性多肽组合物，包含至少两个不同的 MSP3-b 样基序和至少一个 MSP3-c/d 样基序。

4. 权利要求 1 至 3 中任一项的抗原性多肽组合物，其中 MSP3-b 样基序被包括在具有 10 至 80 个氨基酸残基的多肽组分中。

5. 权利要求 1 至 3 中任一项的抗原性多肽组合物，其中 MSP3-c/d 样基序被包括在具有 20 至 80 个氨基酸残基的多肽组分中。

6. 权利要求 1 至 5 中任一项的抗原性多肽组合物，其中 MSP3-b 样基序和 MSP3-c/d 样基序被包括在一个独特的多肽组分中。

7. 权利要求 1 至 6 中任一项的抗原性多肽组合物，其中 MSP3-b 样基序和/或 MSP3-c/d 样基序在所述多肽组分中被氨基酸序列隔开，所述氨基酸序列在所述基序所源自的 MSP3 样蛋白质中天然存在于所述基序之间。

8. 权利要求 4 至 7 中任一项的抗原性多肽组合物，其中所述多肽组分或其中每一个多肽组分包含源自一种或数种 MSP3 样蛋白质的氨基

酸序列或由源自一种或数种 MSP3 样蛋白质的氨基酸序列组成, 所述氨基酸序列由选自疟原虫的、特别是恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 的 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 蛋白质中的一种或数种 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列的全部或部分组成。

9. 权利要求 1 至 8 中任一项的抗原性多肽组合物, 其中所述多肽组分由 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列或所述 C-末端序列的片段组成, 所述 MSP3 样蛋白质至少包括 MSP3-1 和 MSP3-2, 所述片段包含 MSP3-1-b、MSP3-1 c/d、MSP3-2-b 和 MSP3-2 c/d 基序或由 MSP3-1-b、MSP3-1 c/d、MSP3-2-b 和 MSP3-2 c/d 基序组成。

10. 权利要求 9 的抗原性多肽组合物, 其中所述多肽组分还包含由 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列或所述 C-末端序列的片段组成的氨基酸序列, 所述 MSP3 样蛋白质选自 MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8, 所述片段包含 MSP3-b 样基序和 MSP3- c/d 样基序或由 MSP3-b 样基序和 MSP3- c/d 样基序组成。

11. 权利要求 1 至 10 中任一项的抗原性多肽组合物, 其中所述多肽组分是数种融合多肽, 其中每一种融合多肽包含具有选自以下一组的序列的多肽或由该多肽组成:

(i) 选自 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 中的至少两种 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列; 或

(ii) 选自 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 中的至少两种 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列的数种肽片段, 其中每一种肽片段包含至少一个 MSP3-b 样基序或至少一个 MSP3-c/d 样基序或由至少一个 MSP3-b 样基序或至少一个 MSP3-c/d 样基序组成。

12. 权利要求 1 至 12 中任一项的抗原性多肽组合物，其包含一种融合多肽或由所述融合多肽组成，所述融合多肽包含如下(i)或(ii)或由如下(i)或(ii)组成：

(i) 选自 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 的每一种 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列；或

(ii) 选自 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 的每一种 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列的一或数种肽片段，其中每一种肽片段包含至少一个 MSP3-b 样基序或至少一个 MSP3-c/d 样基序或者由至少一个 MSP3-b 样基序或至少一个 MSP3-c/d 样基序组成，其中不同 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列的片段形成一个独特的氨基酸序列。

13. 权利要求 11 或 12 的抗原性多肽组合物，其中选自 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 的至少两种 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列的肽片段含有至少一个 MSP3-b 样基序和选自 MSP3-a、MSP3-c/d、MSP3-e 和 MSP3-f 样基序的一种或数种其他基序，且所述基序在所述肽片段中是连续的或不连续的。

14. 权利要求 1 至 13 中任一项的抗原性多肽组合物，其中所述 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列是以下序列：

(i) 对于 MSP3-1，为图 10A 的任何序列，且特别是 3D7 株的序列；

(ii) 对于 MSP3-2，为图 10B-D 的任何序列，且特别是 3D7 株的序列；或任一所述序列的开始于氨基酸残基 161 (或对于序列 MSP3.2FL D4 为 165) 并终止于氨基酸残基 371 (或对于序列 MSP3.2FL D4 为 376) 的片段；

(iii) 对于 MSP3-3，为图 10D-E 的任何序列，且特别是 3D7 株的序列；

(iv) 对于 MSP3-4, 为图 10E-F 的任何序列, 且特别是 3D7 株的序列;

(v) 对于 MSP3-7, 为图 10F-H 的任何序列, 且特别是 3D7 株的序列;

(vi) 对于 MSP3-8, 为图 10I 的任何序列, 且特别是 3D7 株的序列。

15. 权利要求 1 至 14 中任一项的抗原性多肽组合物, 其中所述至少两个不同的 MSP-3-b 样基序选自序列 SEQ ID No: 17 至 24 和/或所述至少两个不同的 MSP-3-c/d 样基序选自序列 SEQ ID No: 25 至 30。

16. 权利要求 1 至 15 中任一项的抗原性多肽组合物, 还包含一种包含来自 GLURP 的 R0 区域的至少 10 个连续的氨基酸残基的抗原性多肽。

17. 权利要求 1 至 15 中任一项的抗原性多肽组合物, 其包含至少两种合成肽, 所述合成肽包含或对应于序列

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-G-X_{10}-X_{11}-X_{12}$ (SEQ ID No:31),

其中:

$X_1 = I, Y$ 或无;

$X_2 = L, F$ 或无;

$X_3 = E, D, P$ 或无;

$X_4 = R, D$ 或无;

$X_5 = G, A, L$ 或无;

$X_6 = W, G, S, I$ 或 E;

$X_7 = E, L$ 或 A;

$X_8 = F, I, G, L$ 或 S;

$X_9 = G, S$ 或 A ;

$X_{10} = V, A, L, I$ 或 S ;

$X_{11} = P, Y$ 或 L ;

$X_{12} = E, F$ 或无。

18. 权利要求 1 至 15 中任一项的抗原性多肽组合物, 其包含至少两种合成肽, 所述合成肽包含或对应于序列

$X_1-X_2-X_3-W-E-X_4-G-G-G-X_5-P$ (SEQ ID No:32),

其中:

$X_1 = I$ 或 Y ;

$X_2 = L$ 或 F ;

$X_3 = G$ 或 A ;

$X_4 = F$ 或 I ; 和

$X_5 = V$ 或 A 。

19. 权利要求 1 至 15 中任一项的抗原性多肽组合物, 其包含至少两种合成肽, 所述合成肽包含或对应于序列

$L-X_1-X_2-X_3-X_4-X_3-X_5-X_6-X_7-D-X_8-X_9-X_{10}-I-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}$

(SEQ ID No:33),

其中:

$X_1 = E$, 或 S ;

$X_2 = L, H, S$ 或 Q ;

$X_3 = I, V$ 或 L ;

$X_4 = K, N, Y$ 或 P ;

$X_5 = T, S$ 或 P ;

$X_6 = S$ 或 L ;

$X_7 = K, W$ 或 S ;

$X_8 = E, K, R$ 或 I ;
 $X_9 = E$ 或 N ;
 $X_{10} = D, N$ 或 Q ;
 $X_{11} = I, V, S, P$ 或 A ;
 $X_{12} = K, D$ 或 N ;
 $X_{13} = H$ 或 E ;
 $X_{14} = N$ 或 S ;
 $X_{15} = E$ 或 D ;
 $X_{16} = D$ 或 Q 。

20. 权利要求 17 至 19 中任一项的抗原性多肽组合物，其是一种混合表位，特别是至少 50、至少 100、或至少 500 种不同序列的肽的混合物。

21. 权利要求 1 至 19 中任一项的抗原性多肽组合物，其中所述至少两个不同的 MSP-3-b 样基序是 SEQ ID No: 17 和 19、或 SEQ ID No: 17 和 20、或 SEQ ID No: 17 和 22、或 SEQ ID No: 20 和 23、或 SEQ ID No: 20 和 24、或其组合。

22. 权利要求 1 至 19 中任一项的抗原性多肽组合物，其中所述至少两个不同的 MSP-3-c/d 样基序是 SEQ ID No: 25 和 27、或 SEQ ID No: 25 和 28、或 SEQ ID No: 28 和 30、或 SEQ ID No: 25 和 29、或其组合。

23. 权利要求 1 至 19 中任一项的抗原性多肽组合物，其中所述多肽组分包含 MSP3 样蛋白质的序列，所述序列由 MSP3-1 的 C-末端序列和 MSP3-7 的 C-末端序列组成。

24. 权利要求 23 的抗原性多肽组合物，其还包含由 MSP3-3 的 C-末端序列组成的多肽组分。

25. 权利要求 23 或 24 的抗原性多肽组合物，其还包含由 MSP3-2 的 C-末端序列组成的多肽组分。

26. 权利要求 23 至 25 中任一项的抗原性多肽组合物，其还包含由 MSP3-8 或/和 MSP3-4 的 C-末端序列组成的多肽组分。

27. 纯化基因家族，所述基因具有以下特征：

- 它们定位于恶性疟原虫的 10 号染色体；
- 它们在恶性疟原虫株中高度保守；
- 它们同时表达于红内期的恶性疟原虫；
- 它们编码的蛋白质在 N-末端具有 NLRN 或 NLRK 的特征标记并定

位于裂殖子表面，

其中所述家族包含至少 3 个基因。

28. 权利要求 27 的基因家族的多核苷酸家族，其中所述多核苷酸来自所述基因，且特别是编码所述基因的 C-末端部分的多核苷酸家族，或所述 C-末端部分的多核苷酸片段，特别是具有 30 至 500 个核苷酸、特别是 30 至 250、或至 240、或至 210、或至 180、或至 150、或至 120、或至 90 个核苷酸的多核苷酸。

29. 权利要求 27 或 28 的基因家族，其中所述基因还具有保守的 C-末端序列，其编码的 T 表位在所述家族的基因中是保守的，且其中所述末端序列还包含所述家族的基因中的保守趋异性。

30. 权利要求 27 至 29 中任一项的基因家族，其中所述基因还具有以下特征：

- 在体外条件下，针对所述基因的产物的抗体通过单核细胞依赖性的抗体介导的 ADCI 机制介导在血液期杀死恶性疟原虫。

31. 权利要求 27 至 29 中任一项的基因家族，其中所述基因还具有以下特征：针对所述基因的产物的抗体在感染恶性疟原虫的小鼠中介导恶性疟原虫的生长抑制。

32. 权利要求 27 至 30 中任一项的基因家族，其包含编码如图 10 所示的恶性疟原虫 3D7 株的 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列或所述蛋白质的在如图 10 所示的其他疟原虫株中的同源物的 C-末端序列的序列。

33. 权利要求 27 至 31 中任一项的基因家族，其包含 SEQ ID No: 1、3、5、7、13 和 15 的基因或它们的在疟原虫株中的同源物。

34. 分离自权利要求 27 至 32 中任一项的家族的恶性疟原虫基因，其具有 SEQ ID No:5 的序列，或其在疟原虫株中的同源物。

35. 分离自权利要求 27 至 32 中任一项的家族的恶性疟原虫基因，其具有 SEQ ID No:7 的序列，或其在疟原虫株中的同源物。

36. 分离自权利要求 27 至 32 中任一项的家族的恶性疟原虫基因，其具有 SEQ ID No:13 的序列，或其在疟原虫株中的同源物。

37. 分离自权利要求 27 至 32 中任一项的家族的恶性疟原虫基因，其具有 SEQ ID No:15 的序列，或其在疟原虫株中的同源物。

38. 一种多核苷酸序列，其在严格性条件下与权利要求 34 至 37 中任一项的恶性疟原虫基因杂交或与权利要求 27 至 33 中任一项的基因家族杂交。

39. 由权利要求 34 至 38 中任一项的基因编码的蛋白质。

40. 一种抗原性多肽，其包含来自权利要求 39 的蛋白质的至少 10 个、优选地至少 15 个连续的氨基酸的片段或由所述片段组成。

41. 权利要求 40 的抗原性多肽，其包含至少一个 MSP-3-b 样基序。

42. 权利要求 39 或 40 的抗原性多肽，其包含至少一个 MSP-3-c/d 样基序。

43. 权利要求 39 至 42 中任一项的抗原性多肽或权利要求 1 至 26 中任一项的抗原性多肽组合物，其中至少部分所述多肽分子连接于一种脂质分子。

44. 权利要求 43 的抗原性多肽或多肽组合物，其中所述脂质分子是 C-末端 palmitoylysylamide 残基。

45. 权利要求 39 至 44 中任一项的抗原性多肽或权利要求 16 至 25 中任一项的抗原性多肽组合物，其中至少部分所述多肽分子结合于一种支持物。

46. 权利要求 45 的抗原性多肽或多肽组合物，其中所述支持物是病毒颗粒、或硝化纤维素或聚苯乙烯珠、或生物可降解聚合物例如 lipophosphoglycans 或聚-L 乳酸。

47. 一种免疫原性组合物，其包含权利要求 37 的重组蛋白质、或权利要求 39 至 46 中任一项的多肽、或权利要求 1 至 26 中任一项的多肽组合物作为免疫原。

48. 一种抗疟疾疫苗，其包含权利要求 39 的重组蛋白质、或权利要求 40 至 46 中任一项的多肽、或权利要求 1 至 26 中任一项的多肽组合物作为免疫原以及合适的药用载体。

49. 权利要求 47 的免疫原性组合物或权利要求 48 的疫苗，还包含选自 LSA-1、LSA-3、LSA-5、SALSA、STARP、TRAP、PfEXPI、CS、MSP1、MSP2、MSP4、MSP5、AMA-1、SERP 和 GLURP 中的至少一种抗原。

50. 权利要求 47 至 49 中任一项的免疫原性组合物或疫苗，其被配制为用于皮内或肌肉内注射。

51. 权利要求 50 的免疫原性组合物或疫苗，其每一注射剂量包含 1 至 100 μg 的免疫原，优选地为 2 至 50 μg 。

52. 权利要求 47 至 50 中任一项的免疫原性组合物或疫苗，还包含 SBAS2 和/或明矾和/或 Montanide 作为佐剂。

53. 权利要求 39 的重组蛋白质、或权利要求 40 至 46 中任一项的多肽、或权利要求 1 至 26 中任一项的多肽组合物在制备抗疟疾疫苗组合物中的用途。

54. 一种合成的或重组的纯化抗体或抗体片段，其与权利要求 39 的数种蛋白质交叉反应，并在体外条件下通过单核细胞依赖性的抗体介导的 ADCI 机制介导在血液期杀死恶性疟原虫。

55. 针对权利要求 39 的数种蛋白质和/或权利要求 40 至 46 中任一项的多肽的抗体库或抗体片段库。

56. 针对权利要求 1 至 26 中任一项的多肽组合物的抗体库或抗体片段库。

57. 权利要求 54 的抗体或权利要求 55 或 56 的抗体库，其中所述抗体是人抗体或人源化抗体。

58. 包含权利要求 55 至 57 中任一项的抗体或抗体库的组合物在制备抗疟疾药物中的用途。

59. 用于对疟疾进行被动免疫治疗的药物，包含权利要求 55 至 57 中任一项的抗体或抗体库。

60. 权利要求 60 的药物，还包含针对选自 LSA-1、LSA-3、LSA-5、SALSA、STARP、TRAP、PfEXP1、CS、MSP1、MSP2、MSP4、MSP5、AMA-1、SERP 和 GLURP 中的至少一种抗原的抗体。

61. 对可能感染恶性疟原虫的个体进行体外疟疾诊断的方法，该方法包含将来自所述个体的生物学样品与权利要求 39 的蛋白质、或权利要求 40 至 46 中任一项的抗原性多肽、或权利要求 1 至 26 中任一项的抗原性组合物相接触，所述接触在能够使得所述抗原性肽或多肽与可能存在于所述生物学样品中的抗体形成抗原/抗体复合物的条件下进行，并在体外检测可能形成的抗原/抗体复合物。

62. 权利要求 61 的方法，其中体外诊断通过 ELISA 分析进行。

63. 权利要求 61 或 62 的方法，其中还将所述生物学样品与源自其他抗原的一或数种抗原性肽相接触，所述其他抗原选自 LSA-1、LSA-3、LSA-5、SALSA、STARP、TRAP、PfEXP1、CS、MSP-3-1、MSP-3-2、MSP-3-5、MSP-3-6、MSP1、MSP2、MSP4、MSP5、AMA-1、SERP 和 GLURP。

64. 用于体外诊断疟疾的试剂盒，包含至少一种权利要求 39 至 46 中任一项的肽或多肽。

65. 权利要求 64 的试剂盒，其中所述抗原性肽或多肽结合于支持物。

66. 权利要求 64 或 65 的试剂盒，还包含能够使得所述抗原性肽或多肽与可能存在于生物学样品中的抗体形成抗原/抗体复合物的试剂，以及能够在体外检测可能形成的抗原/抗体复合物的试剂。

67. 对可能感染恶性疟原虫的个体进行体外疟疾诊断的方法，该方法包含将来自所述个体的生物学样品与权利要求 54 至 57 中任一项的抗

体相接触，所述接触在能够使得所述抗体与可能存在于所述样品中的恶性疟原虫特异性抗原形成抗原/抗体复合物的条件下进行，并在体外检测可能形成的抗原/抗体复合物。

68. 用于体外诊断疟疾的试剂盒，包含权利要求 54 至 57 中任一项目的抗体。

69. 权利要求 68 的试剂盒，还包含能够使得所述抗体与来自可能存在于生物学样品中的 MSP-3 家族的蛋白质的抗原形成抗原/抗体复合物的试剂，以及能够在体外检测可能形成的抗原/抗体复合物的试剂。

70. 一种重组核苷酸序列，包含编码权利要求 39 的蛋白质或权利要求 40 至 46 中任一项目的抗原性多肽的序列。

71. 权利要求 70 的重组核苷酸序列，包含编码至少两个 MSP-3-b-样和/或 MSP-3-c/d 样基序的序列，其中所述基序中的至少一个选自基序 SEQ ID No: 19 至 24 和 27 至 30。

72. 权利要求 71 的重组核苷酸序列，包含编码包含数个 MSP-3-b 样基序的融合蛋白的序列，其中所述基序中的至少两个选自基序 SEQ ID No: 17 至 24。

73. 权利要求 71 的重组核苷酸序列，包含编码包含数个 MSP-3-b 样基序的融合蛋白的序列，其中所述基序中的至少两个选自基序 SEQ ID No: 25 至 30。

74. 一种重组的克隆和/或表达载体，包含编码权利要求 33 至 38 或 70 至 73 中任一项的核苷酸序列。

75. 权利要求 74 的重组的克隆和/或表达载体，其中所述核苷酸序列受控于相对于宿主细胞是同源的或异源的启动子和调节元件，以便在所述宿主细胞中表达。

76. 权利要求 74 或 75 的表达载体在制备用于抗恶性疟原虫的基因免疫接种的药物中的用途。

77. 一种多核苷酸疫苗，包含权利要求 70 至 73 中任一项的核苷酸序列或权利要求 27 至 33 中任一项的基因家族的基因或权利要求 34 至 38 中任一项的基因。

78. 一种重组宿主细胞，其以权利要求 77 的载体转化。

79. 权利要求 78 的宿主细胞，其是细菌、酵母、昆虫细胞、或哺乳动物细胞。

MSP-3 样基因家族

本发明涉及抗疟疾。更具体地，本发明涉及包括已知的 MSP-3 基因的新的基因家族 (现称为 MSP3-1，如图 1 所示)，且该基因家族具有异常过剩的暴露表位，由此提示该基因家族在该寄生虫的免疫原性方面具有重要作用。对该基因家族以及相应的基因产物家族的表征能够确定抗恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 的新的免疫原性和疫苗组合物。

引起人类疟疾的寄生虫，特别是恶性疟原虫，在人类宿主中具有不同的形态，并表达不同的抗原以起到定位于被感染的宿主生物体中的功能。根据这些寄生虫在人体内的生命周期中不同的形态和抗原性，可将其至少明确分为 4 个不同的发育阶段。

该寄生虫在人体内最初的发育阶段相当于通过该寄生虫的昆虫载体的叮咬而进入血液的子孢子形式。第二个阶段相当于寄生虫进入肝脏并感染肝细胞的过程，寄生虫在肝细胞中发育成为肝裂殖体，后者成熟后 (例如，对于恶性疟原虫为子孢子进入人体后的第 6 天) 通过裂解 (bursting) 释放肝裂殖子。第三个阶段为通过该寄生虫的无性形式 (裂殖子) 感染血液中的红细胞；这种红内期发育相当于疾病的致病阶段。第四个阶段相当于有性 (或配子母细胞) 形式，可成为细胞外有性形式或蚊体内的配子。

已经再三证实，抗体在产生针对恶性疟原虫的临床免疫方面具有重要的作用。

众多免疫学研究提示，人的嗜细胞抗体亚型 (IgG1 和 IgG3) 对于带虫免疫状态特别至关重要。这种抗寄生虫免疫是一种在长期 (15-20 年) 暴露于寄生虫之后获得的、株依赖性的非消除性 (non-sterilizing type) 免

疫。其通常见于非洲和巴布亚-新几内亚，东南亚仅仅最近才有文献报道 (Soe, Khin Saw et al. 2001)。尽管抗体可直接作用于裂殖子对红细胞的入侵，但在流行地区，体内最有效的抗体介导的寄生虫控制机制则需要单核细胞的参与 (Khusmith and Druilhe 1983); (Lunel and Druilhe 1989)。抗体依赖性细胞抑制 (antibody-dependent cellular inhibition, ADCI) 分析模拟单核细胞和嗜细胞寄生虫特异性抗体之间的这种协作，且在现在看来是抗恶性疟原虫血液期的获得性免疫的最佳体外替代性标记物。

目前已经有两种分子被鉴定为可有效引起 ADCI 的人类抗体的靶位，即 48-kDa 的裂殖子表面蛋白 3，下文中称为 *MSP-3* (Oeuvray, Bouharoun-Tayoun et al. 1994); 和 220-kDa 的富含谷氨酸蛋白质，下文中称为 *GLURP* (Theisen, Soe et al. 1998)。已经发现，通过被动转运至恶性疟原虫人源化 SCID 小鼠中，*GLURP* 和 *MSP-3* 可在体内抑制寄生虫的生长 (Badell, Oeuvray et al. 2000)。许多免疫流行病学研究也提示针对 *MSP-3* 的人类抗体与产生临床保护相关，这些研究证实，*MSP-3* 特异性嗜细胞抗体 (IgG1 和 IgG3) 的水平与疟疾发作的风险降低明显相关 (Roussillon 1999)。这些研究进一步发现，嗜细胞 IgG3 抗体在抗疟疾保护中具有主要作用，因此从流行病学的证据达到以下认识，即针对 *MSP-3* 的抗体可通过与携带 Fcγ II 受体的细胞协作而在体内有效地抑制寄生虫的繁殖 (Bouharoun-Tayoun, Oeuvray et al. 1995)。这些受体对 IgG3 subclass 的亲合力高于对 IgG1 subclass 的亲合力 (Pleass and Woof 2001)。这些人类 IgG 抗体所识别的主要 B 细胞表位已经被定位于 *MSP-3*₂₁₂₋₂₅₇ 区域的保守序列中 (Oeuvray, Bouharoun-Tayoun et al. 1994; Theisen, Soe et al. 2000; Theisen, Dodoo et al. 2001)。核苷酸测序已经证实，这些重要表位在许多恶性疟原虫实验株和来自非洲和亚洲的野外分离株中高度保守 (Huber, Felger et al. 1997); (McColl and Anders 1997)。

本发明人现已表征了一系列的 9 种恶性疟原虫基因，均成簇位于 10 号染色体的 3'端，这些基因编码蛋白质，其中的表位均是暴露于疟疾的个体体内天然产生的抗体的靶位，通过与血液单核细胞协作而介导在红内期杀死恶性疟原虫，且在不同的恶性疟原虫分离株之间，这些表位的序列保守性程度不同寻常。

本发明因此涉及分离的基因家族，称为 MSP-3 样家族，该基因家族的产物具有共同的结构特征和免疫学特征，并涉及一些这样的基因以及各个相应的蛋白质。

包含来自所述新蛋白质的表位的抗原性多肽以及包含所述表位和/或来自任何 MSP3 样蛋白质的表位中的至少两种的抗原性多肽组合物，也属于本发明的内容。

本发明的其他重要的方面是抗疟疾免疫原性组合物和疫苗，其包含作为免疫原的上述重组蛋白质、多肽或多肽组合物。

与 MSP-3 样基因家族的多种产物交叉反应的重组抗体及其部分也是本发明的一个目的，其可以指重组抗体及其部分本身，也可以指用于被动免疫治疗的药物或用于体外诊断疟疾的试剂盒。

本发明还涉及用于对个体的疟疾进行体外诊断的方法，其通过使用上述抗原性多肽或使用上述抗体，也涉及用于进行这些方法的包含至少部分必需试剂(多肽、抗体...)的试剂盒。

当然，编码至少一种本发明的新的恶性疟原虫抗原的核苷酸序列及其在抗恶性疟原虫的药物或核酸疫苗中的用途也属于本发明的内容。

在本文中，对于一些使用的术语可按照以下定义来理解：

下文中，术语“基因”是与包括编码序列的“天然存在的序列”或包括编码序列的重组或合成序列是同义词。本文中，“基因”并不一定含有调节元件，这与该词在科技文献中的常用含义不同。因此，本发明的基因是任何包含疟原虫的天然存在的可读框的核苷酸序列或包含疟原

虫的天然存在的可读框且进一步含有用于表达所述天然存在的序列的全部或部分调节序列的核苷酸序列。根据这个定义，基因是分离的核酸分子，即不处于天然环境中的核苷酸序列。这样的核苷酸序列也被称为是纯化的。

本文中，“基因家族”与其在科技文献中的含义相同，即指一组多个基因，所述基因具有许多共同的 (结构或功能) 特征或特点。

根据本发明，“MSP-3-c/d 样基序”是 20 个氨基酸的氨基酸序列，其与序列 SEQ ID No: 25 至 30 中的任一序列相同，或者其通过对这些序列中的至少两个序列进行重新组合而获得。例如，一个氨基酸序列，其具有 SEQ ID No:25 的 1 至 5 位氨基酸，随后是 SEQ ID No:29 的 6 至 12 位氨基酸，以及 SEQ ID No:27 的 13 至 20 位氨基酸，该氨基酸序列是 MSP-3-c/d 样基序。也就是说，“MSP-3-c/d 样基序”是 20 个氨基酸的氨基酸序列，其中所述的氨基酸选自下表：

氨基酸位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
氨基酸	L	E S	L H S Q	I V L	K N Y P	L I V	T S P	S L	K W S	D	E K R I	E N	D N Q	I	I V S P A	K D N	H E	N S	E D	D Q

表 1:

这些氨基酸中的一些具有相似的电荷，且可能不会改变分子的整体结构或抗体对其的识别，例如缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸。

任何 20 个氨基酸的氨基酸序列，如果其包含如下所示的最保守的氨基酸 (即第 1、2、8、10、12、14 和 17 至 20 位)，且其中位于其他位置的氨基酸残基不同于上述氨基酸，且其被针对 SEQ ID No: 25 至 30 中的任一 MSP-3-c/d 基序的抗体所识别，其同样被视为本发明的“MSP-3-

c/d 样基序”。对于后一种功能性特征，可通过任何免疫分析方法如那些本领域人员已知的方法和/或下文中所述的方法而进行测试。

本文中，“MSP-3-b 样基序”指的是 11 至 14 个氨基酸的氨基酸序列，其与序列 SEQ ID No: 17 至 24 中的任一序列相同，或者其通过对这些序列中的至少两个序列进行重新组合而获得。例如，一个氨基酸序列，其具有 SEQ ID No:17 的 1 至 5 位氨基酸，随后是 SEQ ID No:22 的 6 至 12 位氨基酸，该氨基酸序列是 MSP-3-b 样基序。也就是说，“MSP-3-b 样基序”是 11 至 14 个氨基酸的氨基酸序列，其中所述氨基酸选自下表，其中“-”代表“无氨基酸”：

氨基酸位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
氨基酸	I	L	E	R	G	W	E	F	G	G	G	V	P	E
	Y	F	D	D	A	G	L	I	S		S	A	Y	F
	-	-	P	-	L	S	A	G	A		A	L	L	-
			-		-	I		L				I		
						E		S				S		

表 2

这些氨基酸中的一些具有相似的电荷，且可能不会改变分子的整体结构或抗体对其的识别，例如缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸。

MSP-3-b 样基序的一个亚组相应于 SEQ ID No:17、18 和 22 的序列及其组合，即选自下表的 11 个氨基酸：

氨基酸位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
氨基酸	I	L	G	W	E	F	G	G	G	V	P
	Y	F	A			I				A	

表 3

任何 11 至 14 个氨基酸的氨基酸序列，如果其包含如下所示的最保守的氨基酸 (即表 3 中所示的氨基酸，其相应于表 2 所示的 1、2 和 5 至 13 位的具体的氨基酸)，且其中位于其他位置的氨基酸残基不同于上述氨基酸，且其被针对 SEQ ID No: 17 至 24 中的任一 MSP-3-b 基序的抗体所识别，其同样被视为本发明的“MSP-3-c/d 样基序”。对于后一种功能性特征，可通过任何免疫分析方法如那些本领域人员已知的方法和/或下文所述的方法而进行测试。

下文中，基因或蛋白质有时指的是在此揭示的具体的基因或蛋白质序列的“同源物”。该术语在此指的是不同疟原虫株 (特别是恶性疟原虫株) 中的近似的序列，即与所参照的序列具有至少 70% 的序列相同性、且优选地具有至少 90% 序列相同性的序列。

“保守性取代”指的是，在氨基酸序列中，一个氨基酸残基被另一个在疏水性和/或空间障碍方面具有相似特性的残基所取代，这样，多肽的三级结构不会发生显著的改变。例如，以丙氨酸取代鸟嘌呤 (guanine) 是一种保守性取代，反之亦然。缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸也是相互之间可进行保守性取代的氨基酸。非限制性的其他保守性取代组是 (D, E)、(K, R)、(N, Q)、和 (F, W, Y)。通过对多肽的至少一个氨基酸进行保守性取代所获得多肽变体在此被称为所述多肽的“保守性变体”。

用语“衍生自”，当用于核苷酸或氨基酸残基的序列时，指的是有关序列是从被鉴定为本发明的序列家族的所了解的结构和/或特征出发而设计的。不过，可通过任何合适的技术方法、包括重组技术或合成方法来制备有关序列。因此，所述序列并不限于那些自天然存在的基因或蛋白质而获得的序列，其甚至可以是嵌合序列。

需要的时候，下文中会给出其他的定义。

本发明人在此公开了一组 9 个基因，其中的 6 个是从未被公开过的，且这些基因成簇位于 10 号染色体的相同区域。该染色体实际上含

有一系列 9 个可读框，由非编码区域所分开，并包含一排 (5'-3') 编码最初被命名为 GLURP 的蛋白质的基因，在 1300 碱基对处后接 MSP-3 (现命名为 MSP-3-1)，随后是 7 个其他基因，命名为 MSP-3-2 (有时也称为 MSP6)、MSP-3-3、MSP-3-4、MSP-3-5、MSP-3-6、MSP-3-7、MSP-3-8。图 1 示出了这一组织结构。

除了成簇位于同一染色体区域以外，这 9 个基因还具有突出的特征，预示它们是用于开发抗恶性疟原虫血液期感染的疫苗的优先产物。

已经发现所有 9 个基因均同时表达于所有已经研究的寄生虫中，即在恶性疟原虫的红内期能够检测到相应的蛋白质，且这些蛋白质均位于裂殖子表面。此前发现 GLURP、MSP-3-1 和 MSP-3-2 (被称为“MSP6” (Trucco, Fernandez-Reyes et al. 2001)) 属于这种情况，对于其余的基因，通过构建其 N 端的独特序列证明也是如此，这些 N 端序列在这些基因之间是各自独特的，其不具有交叉反应性表位，且其相应的抗体均与裂殖子的表面发生反应。此外，通过以各自独特的特异性引物进行 RT-PCR 证实了其转录。

不仅如此，8 个 MSP-3 样基因均具有同样的一般性基因组织结构，如图 1 所示，其每一个均具有相同的最 N 端的 4 个氨基酸“特征标记”(在图 1 中以“s”表示)，并与间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*) 和诺氏疟原虫 (*Plasmodium Knowlesi*) 中所发现的相似的 MSP-3 同源蛋白质相同。

因此，本发明的第一个目的是一个家族 (或一组) 分离的或纯化的基因，这些基因具有以下特征：

- 它们位于恶性疟原虫的 10 号染色体；
- 它们在恶性疟原虫株中高度保守；
- 它们表达于恶性疟原虫的红内期；
- 它们编码的蛋白质在 N-末端具有 NLRN 或 NLRK 的特征标记并定位于裂殖子表面，

其中所述家族至少包含 3 个基因。

本发明还涉及所述基因家族的片段的家族。一个具体的家族具有所述基因的至少 3 种多核苷酸片段。本发明还涉及该家族的基因的 C-末端序列中所含的多核苷酸片段。

本发明的基因家族的特定多核苷酸片段或此类多核苷酸片段的特定家族来自所述基因，并编码所述基因的 C-末端部分。所述 C-末端部分随后在实施例和图 10 中进行描述。本发明还涉及所述片段的组合，包括具有多个编码所述基因的 C-末端部分的多核苷酸的组合，特别是重组序列。

所述基因的或所述基因家族的其他多核苷酸片段，包括重组的片段，是编码所述基因的 C-末端部分的序列的片段。

本发明的多核苷酸具有 30 至 1500 个、特别是 30 至 500 个核苷酸，特别是 30 至 250、或至 240、或至 210、或至 180、或至 150、或至 120 或至 90 个核苷酸。

在本发明的 MSP-3 家族的蛋白质中，NLRN 或 NLRK 特征标记的后面最常见地是 A 或 G。

该家族的基因优选地还具有相同的总体组织结构，如图 1 所示。

该家族的一个实例是整个 MSP-3 样家族，包含序列 SEQ ID No: 1、3、5、7、9、11、13、和 15 的基因或其如上所定义的片段。选自这些基因中的任何一组至少 3 个基因或其如上所定义的片段，也被认为是本发明的一个基因家族。

除了上述 N-末端特征标记以外，N-末端部分的其余部分在不同基因产物之间是高度可变的，然而，与此不同的是，C-末端的组织结构在除 MSP-3-5 和 MSP-3-6 两种基因以外的所有的基因中的相同的，包括“b”表位样序列段 (stretch) (“b”)、“c/d”表位样 (“c/d”) 的、富含谷氨酸区域 (Glutamic-rich region)、以及最 C 端的亮氨酸拉链。

基于所述基因的在基因产物的 C-末端部分的组织结构, 本发明人提供了一个具体的基因家族, 其范围在如上所述的 9 个基因的基因簇中, 且其范围在如上所述的 8 个 MSP3 样基因中。该具体的家族包括疟原虫株的 8 个 MSP3 样基因中的 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 基因, 特别是恶性疟原虫株中的那些基因。

该具体的基因家族编码相应的具体的蛋白质 (也称为多肽) 家族, 包括 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 多肽。

所述具体的基因家族和相应的蛋白质的具体的家族的特征还在于, 所述基因进一步具有保守的 C-末端序列, 其编码在该家族的基因中具有保守性的表位、特别是 T 表位, 且其中所述末端序列在表位 (包括 MSP-3-b 样基序和 MSP-3-c/d 样基序) 以外的区域进一步包含密码子趋异性 (divergences in codons), 所述趋异性在该家族基因中是保守的。

因此, 本发明的具体的基因家族是如上所述的家族, 其中所述基因还具有如下特性: 它们编码具有 MSP-3-b 样基序 和/或 MSP-3-c/d 样基序的蛋白质。这种家族的一个实例是包括序列 SEQ ID No: 1、3、5、7、13、和 15 的基因的家族或任何一组至少 3 个选自这些序列中的基因的家族。

所有 7 种蛋白质 (GLURP + 6 种同源性 MSP-3 样分子) 均在暴露于疟疾的个体中引发产生抗体。

对于那些已经进行研究的基因产物, 特别是 GLURP、MSP-3-1 和 MSP-3-2, 其所引发的免疫应答与抵抗野外条件下的疟疾侵袭的临床保护是相关联的。这种关联具有高度的统计学显著性, 特别是与由 IgG3 同种型组成的抗体有关, 且这已经在非洲的 Dielmo 和 Ndiop 以及缅甸的 Oo-do I 等三组研究中被证实。鉴于下面所提及的同源性原因, 对于其余 5 个基因也极有可能会发现相同的发现。

对于 GLURP、MSP-3-1 和 MSP-3-2, 与保护性相关的抗体所针对的区域是 GLURP 的非重复区域 R0 和 MSP-3-1 和 MSP-3-2 的 C-末端非重

复区域。图 2 显示了来自 MSP-3-1 的不同的肽。保护作用与针对肽 MSP-3-b、c 和 d 的抗体相关。

针对这 7 种基因产物的抗体均有效地在体外条件下通过单核细胞依赖性的抗体介导的 ADCI 机制介导在血液期杀死恶性疟原虫。实施例 1 给出的这些结果说明, 针对这些区域的每一个的抗体可同样有效地在体外条件下实现对恶性疟原虫红内期的生长抑制。

因此, 本发明的优选的基因家族还具有如下特性: 针对所述基因的产物的抗体在体外条件下通过单核细胞依赖性的抗体介导的 ADCI 机制介导在血液期杀死恶性疟原虫。

根据本发明的另一个优选的实施方式, 本发明的基因家族因此还具有如下特性: 针对所述基因的产物的抗体在感染了恶性疟原虫的小鼠中介导恶性疟原虫的生长抑制 (见例如实施例 1 和 8 所公开的测试结果)。

本发明人还证实, 这 7 种基因中的每一种在各种恶性疟原虫分离株中均具有异乎寻常的高度的序列保守性。在此之前已经发现 GLURP 即是如此, 并导致选择了在各种分离株中最具保守性的 R0 非重复区域, 不过其具有一些氨基酸取代。MSP-3-1 也是如此, 已经发现在 111 株分离株中, 该序列在覆盖肽 MSP-3-a, b, c 和 d 的区域 (即用于免疫志愿者的区域) 具有显著的保守性, 其中没有发现单个氨基酸取代, 且因此没有发现任何氨基酸的改变。最近进一步证实, MSP-3-1 的 C-末端的其余部分以及 MSP-3-2、MSP-3-3、MSP-3-4、MSP-3-7 和 MSP-3-8 的整个 C-末端保守区域也是如此 (图 9 和 10)。该基因家族的这种不同寻常的序列保守程度明显不同于在当前所研究的绝大多数其他疫苗候选物中所观察到的较大的多态性, 且这显然是加强该基因家族在疫苗开发中的应用前景的一个重要标志。

本发明特别指出, MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 这 6 个基因的特定家族 (以及相应的 6 种蛋白质的特定家族) 的特征在于以下两方面, (i) 在于包含或限定表位 (例如如上所述的 b 样

基序或 c/d 样基序中所含的表位) 的区域中的核苷酸或氨基酸的保守性, 以及 (ii) 在于 C-末端部分中含有的、特别是特定基序 (包括 b-, c/d-基序) 中所含的所述表位以外的区域中的趋异核苷酸 (以及所编码的氨基酸) 的保守性。

要注意到, 这两种相反的保守性, 即 (i) 这 6 种 MSP3 样基因 (或基因产物) 的 C-末端序列的确定区域所共同具有的核苷酸 (氨基酸) 的保守性和 (ii) 这 6 种 MSP3 样基因 (或基因产物) 的所述 C-末端序列的其他区域中的趋异核苷酸和编码的氨基酸的保守性, 对于确定能够引发或增强免疫应答且特别是抗疟原虫 (特别是恶性疟原虫株) 感染的保护性免疫应答的方式具有重要性。

因此, 包含至少 3 种选自具有序列 SEQ ID No: 1、3、5、7、9、11、13、和 15 的基因的基因的上述基因家族, 且特别是选自具有序列 SEQ ID No: 1、3、5、7、13 和 15 的基因或它们在疟原虫 (特别是恶性疟原虫株) 中的同源物的上述基因家族, 也是本发明的优选的基因家族。

一个具体的家族特别是由 6 种 MSP3 样基因即 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 组成或另一个家族包含包括 MSP3-1 和 MSP3-2 基因的至少 3 种基因。

本发明的另一个方面是一种具有序列 SEQ ID No: 5、7、13 或 15 的分离的或纯化的恶性疟原虫基因, 或疟原虫株的相应于具有序列 SEQ ID No: 5、7、9、11、13 或 15 的恶性疟原虫基因的同源物的分离的基因, 特别是 SEQ ID No: 5、7、13 或 15。

根据前面以及随后所体积的理由, 对于本领域人员来说, 这些未被公开过的 MSP-3 样基因在研究、诊断以及免疫接种领域具有多种用途。具体而言, 它们可用于制备重组 MSP-3 样蛋白质。因此, 蛋白质 SEQ ID No: 6、8、10、12、14 和 16, 特别是蛋白质 SEQ ID No: 6、8、14 和 16, 也是本发明的一部分, 此外, 具有如下蛋白质的序列的任何重组蛋

白质也是本发明的一部分，所述蛋白质是除 3D7 以外的疟原虫株中的蛋白质 SEQ ID No: 6、8、10、12、14 或 16 的同源物、特别是蛋白质 SEQ ID No: 6、8、14 或 16 的同源物。

本发明还涉及一些基因或其多核苷酸片段，它们是如上所定义的基因或其片段的变体，且它们在严格性条件下与所述基因或基因片段杂交。这些变体的长度尤其是等于或者是短于其在严格性条件下与之杂交的基因或基因片段。

在此，“严格性杂交条件”的定义是该条件允许两种核酸、特别是两个 DNA 分子，在大约 65°C，在例如 6 X SSC、0.5% SDS、5 X Denhardt 溶液和 100 µg/ml 的变性的非特异性 DNA 的溶液中或任何具有同等的离子强度的溶液中，并经过在 65°C、在例如至多 0.2 X SSC 和 0.1% SDS 的溶液中或任何具有同等的离子强度的溶液中进行的洗涤步骤之后，发生特异性杂交。不过，本领域人员可以将所述条件的严格性作为待杂交的序列的长度、其 GC 核苷酸含量以及其他参数的函数而进行适当调整，例如可根据 Sambrook 等 2001 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) 的方案进行调整。

比较 MSP-3 家族的基因之间的序列发现，其表位具有十分罕见的保守性，并且位于表位之间的趋异氨基酸残基也具有保守性，所述保守性存在于家族成员之间，特别是产生保护作用至关重要的、具有生物学活性的抗体所针对的那些成员之间，且特别是由 SEQ ID No 1、3、5、7、13 和 15 所代表的那些基因成员之间。图 11 概括说明了序列比较的结果。因此，分离并表征 MSP3 样家族的各种基因对于理解抗疟原虫、特别是抗恶性疟原虫的免疫应答以及设计更加有助于制备抗疟原虫、特别是抗恶性疟原虫的免疫原性组合物的手段，具有重要的意义。

本发明人已经在家族成员之间鉴定到了 2 个区域，这 2 个区域即使不完全相同，至少也是极为相似，且其涉及 MSP-3-b 肽中的一个关键区

域以及涉及 MSP-3-c 和 d 肽中的一个关键区域 (该区域在 MSP-3-c 肽和 MSP-3-d 肽两者之间是保守的)。图 12 和 13 概括说明了不同基因中这些非常保守的表位之间的细微差异。值得注意并且十分重要的是, 不同基因之间的最为保守的区域是两个区域, 体外的 ADCI 分析和被动转移至 SCID 小鼠的研究发现它们是具有生物学活性的抗体的靶位 (见上)。

本发明人还证实, 作为这一基因家族成员之间具有的结构同源性的结果, 在 MSP-3 家族的不同蛋白质之间存在免疫学交叉反应性 (实施例 5 至 8)。

免疫学和疫苗开发层面的实际的结果在于, 以该基因家族的任何一成员进行免疫接种均可诱导对同一个基因产物以及所有其余基因产物具有反应性的抗体。

因此, 本发明构成了一个十分独特的多基因家族类型, 不同于现今所公开的以表位多态性为特征的多基因家族, 本发明的多基因家族的主要特征在于表位的保守性, 且其中如果一个特定基因出现缺失、突变, 另一个或所有其他的家族成员可接管其抗原性功能。此外, 所有基因均同时表达于一种给定的寄生虫中。

因此, 本发明还涉及一种蛋白质, 其由上述基因中的一种基因所编码。在一个具体的实施方式中, 所述蛋白质是重组蛋白质。

因此, 包含来自本发明的蛋白质的至少 5 个、或至少 10 个、优选地至少 15 个连续氨基酸的片段的抗原性多肽是本发明的一部分。在本发明的一个具体实施方式中, 这样的抗原性多肽具有 80 个或更少的氨基酸残基、特别是至多 70 个、或至多 60 个、或至多 50 个、或至多 40 个、且可以是至多 30 个氨基酸残基。

限于 Oeuvray, Bouharoun-Tayoun 等 1994 所公开的 MSP3-1 的片段 (HERAKNAYQKANQAVLKAKEASSY, AKEASSYDYILGWEEFGGGVPEHKKEEN, PEHKKEENMLSHLYVSSKDKENISKENE) 或 Trucco, Fernandez-Reyes 等在

2001 所公开的 MSP-3-2 的片段 (ILGWEFGGG-[AV]-P) 的多肽不属于本发明的范围。

而来自 MSP3-1 或 MSP3-2 的任何符合上述定义的片段，当其被包括在本发明的抗原性组合物中时，则属于本发明的范围。

如上针对 MSP3 样基因、特别是 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 的家族及其相应的多肽家族所述，本发明还涉及抗原性多肽的组合物，其包含至少两种来自 MSP3 样蛋白质家族的抗原性多肽，所述多肽所引发或增强的免疫应答能够代表人类宿主针对天然多肽而获得的应答，特别是能够代表抗疟原虫株、特别是抗恶性疟原虫的保护性应答。因此，所述组合物是抗原性多肽组合物且优选地为免疫原性组合物。

本发明的优选的抗原性多肽是那些包含至少一个如上所述的 MSP3-b 样基序和/或至少一个如上所述的 MSP3-c/d 样基序的多肽。

例如，任何符合上述定义的包含选自序列 SEQ ID No: 19 至 24 (b 样基序) 和 27 至 30 (c/d 样基序) 中的至少一个基序的抗原性多肽或由任何此类基序所组成的抗原性多肽，均属于本发明的一部分，任何包含选自通过在序列 SEQ ID No: 19 至 24 和 27 至 30 中进行至少一个氨基酸的取代而获得的变体中的至少一个基序的抗原性多肽同样属于本发明的一部分，条件是所述抗原性多肽不是上述现有技术中所公开的 MSP-3-1 或 MSP-3-2 的片段。或者，相应的 b-或 c/d 样基序或包含所述基序的抗原性多肽，如果其符合上述有关所述抗原性多肽的定义并可来自其他疟原虫株，特别是来自恶性疟原虫，也属于本发明。此类片段可来自图 10 所示序列。

如 SEQ ID No: 17、18、25 或 26 所示的来自 MSP3-1 或 MSP3-2 的抗原性多肽、或所述抗原性多肽的具有保守性取代的变体或具有来自其他疟原虫 (特别是其他恶性疟原虫株) 的序列的变体，当其与本发明的抗

原性多肽 (特别是从 SEQ ID No: 19 至 24 或 27 至 30 出发而设计的抗原性多肽或其变体) 组合成组合物时, 也属于本发明的范畴。

本发明的另一个方面是一种抗原性多肽组合物, 其包含至少两个不同的 MSP-3-b 样基序和/或至少两个不同的 MSP-3-c/d 样基序。“多肽组合物”指的是包含多肽组分的组合物, 多肽组分即多肽或包含多肽部分的分子, 例如脂多肽、由结合于支持物的多肽组成的缀合物等等。本发明的多肽组合物可以是溶液、囊片等等。

根据本发明的抗原性多肽组合物一个具体的实施方式, 所述至少两个不同的 MSP-3-b 样基序选自序列 SEQ ID No: 17 至 24 及其保守性变体, 和/或所述至少两个不同的 MSP-3-c/d 样基序选自序列 SEQ ID No: 25 至 30 及其保守性变体。

上述本发明的抗原性多肽本发明的或抗原性多肽组合物优选地包含多肽组分或由多肽组分组成, 其中每一多肽组分具有 10 至 80 个氨基酸, 特别是每一多肽组分具有 10 (或 12、或 15、或 20)至 70、或 10 (或 12、或 15、20)至 60、或 10 (或 12、或 15、或 20)至 50、或 10 (或 12、或 15、或 20)至 40、或 10 (或 12、或 15、或 20)至 30 个氨基酸。

本发明的抗原性多肽组合物优选地是免疫原性组合物, 其能够在宿主、特别是人类宿主中引发或增强抗体的产生。

因此, 根据对所述基因和多肽家族所作的上述表征, 每一种多肽或多肽组分的特征在于, 除了涉及存在所述的基序 b-、c/d-及可能的 a-、e-和 f-样基序中的一或多个基序的上述特征, 它们还衍生于 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 蛋白质的 C-末端多肽。

后面的实施例和附图 (图 10) 描述了不同恶性疟原虫株的 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 蛋白质的这些 MSP3 样蛋白质的具体的 C-末端多肽序列。图 10 描述的所有序列, 无论是独立

的还是作为与这些序列中的至少一种、优选地至少两种的组合，特别是来自各种 MSP3 样蛋白质的序列的组合，均属于本发明的范畴。

本发明还涉及这些具体多肽的、来自其他疟原虫株、特别是来自恶性疟原虫的同源性序列。这些同源性序列 (包括嵌合序列) 可用于产生本发明的多肽组分。

在本发明的抗原性多肽组合物中，所述至少两个不同的 MSP-3-b 样基序和/或至少两个不同的 MSP-3-c/d 样基序可由不同的分子所携带 (即所述组合物可包含各种分子，所述分子各自仅含有一个基序)；或者，这些组合物中的每一多肽组分可携带至少两个基序。因此，含有包含至少两个不同的 MSP-3-b 样基序和/或至少两个不同的 MSP-3-c/d 样基序的分子的上述抗原性组合物，也是本发明的一个目的。这些分子可以是复合分子，其中所述至少两个基序是共价连接于一个共同载体的不同肽的部分；优选地，它们的多肽部分由包含所述基序的独特多肽所构成。包含来自不同 MSP-3 蛋白质的多个部分的融合蛋白质，可纳入这些组合物中。

本发明的具体的多肽组合物包含融合多肽或由融合多肽组成，所述融合多肽例如为：

- 包含选自 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 中的所有或至少三种 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列的、或由选自 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 中的所有或至少三种 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列组成的融合多肽；优选的融合多肽至少包含 MSP3-1 和/或 MSP3-2 蛋白质的所述 C-末端序列；

- 短于所述 C-末端序列的多肽组分的融合多肽 (即短于 80 个氨基酸)，其中所述多肽组分包含或其组成为：包含表位的至少一个基序，其选自本申请所述的名为 b 和 c/d 基序，所述基序来自 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 中的一种 MSP3 样蛋白质，其与这些 MSP3 样蛋白质中的另一种蛋白质的特征性的相同基序或不同

基序相结合，或与 MSP3 样蛋白质的多个 (2, 3, 4, 5,) 相同基序相结合，或与 MSP3 样蛋白质的多个 (2, 3, 4, 5,) 不同基序相结合。

本发明的组合物的多肽组分能够：

通过任何合适的制备方法而制备，包括通过涉及重组表达或通过化学合成的方法。对于来自所述多肽组分的结合物的分子也是如此，包括制备融合多肽。

鉴于表位的保守性，本发明人研究了针对 GLURP 和 MSP-3 的嗜细胞抗体是否如其在非洲被报道的那样，也在缅甸的亚洲人群中 (即在不同遗传背景的人和寄生虫中) 参与了对疟疾的临床免疫的产生。结果记载于实施例 7，其说明，针对 MSP-3-1 和 GLURP 的保守区域的嗜细胞 IgG3 抗体与抗恶性疟原虫疟疾的临床保护显著相关。与此不同的是，针对 GLURP 的非嗜细胞 IgG4 抗体随着疟疾发作的次数而升高。最重要的是，MSP-3-1 特异性 IgG3 和 GLURP 特异性 IgG3 抗体在抗疟疾保护作用中具有互补作用。在那些对抗原之一没有产生应答的个体中，总是检测到针对另一种抗原的强应答，并且其与保护作用相关，这提示诱导产生针对 MSP3 和 GLURP 两者的抗体对产生保护性免疫可能具有重要意义。

因此，根据本发明的另一个具体的实施方式，抗原性多肽组合物还包含抗原性多肽分子，所述分子包含来自 GLURP 的区域 R0 的至少 10 个连续的氨基酸残基 (SEQ ID No: 34)。

如上所述，本发明的抗原性多肽组合物可包含有限数量的分子，所述分子各自包含多个表位，或组合物可包含多个分子，所述分子各自包含有限数量的表位。根据一个具体实施方式，抗原性多肽的组合物包含 2 至小于 9 个、优选地 3 至小于 9 个、特别是 2 至 6 个由本发明的基因编码的多肽。

如上所述，表位可以是来自 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 中的不同 MSP3 样蛋白质的相应的表位，或是这些蛋白质中的相同或不同蛋白质的不同表位，如 b 和 c/d 样基序。

基于以上定义的特征来阐述本发明的各种实施方式。

本发明涉及抗原性多肽组合物，其中 MSP3-b 样基序被包括在具有 10 至 80 个氨基酸残基的多肽组分中。

或者或此外，本发明涉及抗原性多肽组合物，其中 MSP3-c/d 样基序被包括在具有 20 至 80 个氨基酸残基的多肽组分中。

根据另一个实施方式，本发明涉及抗原性多肽组合物，其中 MSP3-b 样基序和 MSP3-c/d 样基序被包括在一个独特的多肽组分中。

本发明的抗原性多肽组合物的特征可以是，MSP3-b 样基序和/或 MSP3-c/d 样基序在多肽组分中被氨基酸序列隔开，所述氨基酸序列在所述基序所源自的 MSP3 样蛋白质中天然存在于所述基序之间。

在本发明的另一个具体实施方式中，抗原性多肽组合物的特征在于，所述多肽组分或每一所述多肽组分包含源自一种或数种 MSP3 样蛋白质的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由选自疟原虫（特别是恶性疟原虫）的 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 中的一种或数种 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列的全部或部分组成。

本发明的抗原性多肽组合物的特征也可在于，所述多肽组分(们)由至少包括 MSP3-1 和 MSP3-2 在内的 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列或所述 C-末端序列的片段组成，所述片段包含 MSP3-1-b、MSP3-1 c/d、MSP3-2-b 和 MSP3-2 c/d 基序或由这些基序组成。

在这样的一种抗原性多肽组合物中，所述多肽组分(们)进一步包含由选自 MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 的 MSP3 样蛋白质的 C-

末端序列或所述 C-末端序列的片段组成的氨基酸序列，所述片段包含 MSP3-b 样基序和 MSP3- c/d 样基序或由所述基序组成。

在另一个实施方式中，抗原性多肽组合物的特征在于，所述多肽组分是数种融合多肽，其中每一融合多肽包含具有如下序列的多肽或由所述多肽组成：

(i) 选自 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 的至少两种 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列，或

(ii) 选自 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 的至少两种 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列中的数种、特别是至少 2 种肽片段，其中每一肽片段包含至少一个 MSP3-b 样基序或至少一个 MSP3-c/d 样基序或由至少一个 MSP3-b 样基序或至少一个 MSP3-c/d 样基序组成。

本发明的另一种抗原性多肽组合物包含一种融合多肽或由所述融合多肽组成，所述融合多肽 包含或其组成为：

(i) 选自 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 的每一种 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列，或

(ii) 选自 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 的每一种 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列中的一或数种、特别是至少 2 种肽片段，其中每一肽片段包含至少一个 MSP3-b 样基序或至少一个 MSP3-c/d 样基序或由至少一个 MSP3-b 样基序或至少一个 MSP3-c/d 样基序组成，其中不同 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列的片段形成一个独特的氨基酸序列。

在另一种抗原性多肽组合物中，所述至少 2 种 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列的肽片段选自 MSP3-1、MSP3-2、MSP3-3、MSP3-4、MSP3-7 和 MSP3-8 并含有至少一个 MSP3-b 样基序和选自 MSP3-a、-c/d、-e 和-f 样基序的一种或数种其他基序，且所述基序在所述肽片段中是连续的或不连续的。

在上述本发明的另一个具体点实施方式中，抗原性多肽组合物，其中 MSP3 样蛋白质的 C-末端序列是如下序列：

- (i) 对于 MSP3-1，为图 10A 的任何序列，且特别是 3D7 株的序列；
- (ii) 对于 MSP3-2，为图 10B-D 的任何序列且特别是 3D7 株的序列；或任一所述序列的开始于氨基酸残基 161 (或对于序列 MSP3.2FL D4 为 165) 并终止于氨基酸氨基酸残基 371 (或对于序列 MSP3.2FL D4 为 376) 的片段；
- (iii) 对于 MSP3-3，为图 10D-E 的任何序列，且特别是 3D7 株的序列；
- (iv) 对于 MSP3-4，为图 10E-F 的任何序列，且特别是 3D7 株的序列；
- (v) 对于 MSP3-7，为图 10F-H 的任何序列，且特别是 3D7 株的序列；
- (vi) 对于 MSP3-8，为图 10I 的任何序列，且特别是 3D7 株的序列。

上述各种可能性中的抗原性多肽组合物的另一个实例是一种组合、特别是一种混合表位 (mixotope)，其包含多种、特别是至少 2 种合成肽，所述合成肽包含以下序列：

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-G-X9-X10-X11-X12 (SEQ ID No:31),
其中：

X1 = I, Y 或无；

X2 = L, F 或无；

X3 = E, D, P 或无；

X4 = R, D 或无；

X5 = G, A, L 或无；

X6 = W, G, S, I 或 E；

X7 = E, L 或 A；

X8 = F, I, G, L 或 S；

X9 = G, S 或 A;

X10 = V, A, L, I 或 S;

X11 = P, Y 或 L;

X12 = E, F 或无。

“混合表位”是一种肽组合文库，其可通过文献所述单独合成而获得 (Gras-Masse, Georges et al. 1999)。

源自 MSP-3-b 的、且可纳入本发明的抗原性多肽组合物中的另一种混合物或特别是混合表位是一种组合、特别是混合表位，其包含多种、特别是至少 2 种合成肽，所述合成肽包含以下序列：

X₁-X₂-X₃-W-E- X₄-G-G-G-X₅-P (SEQ ID No:32),

其中：

X₁ = I 或 Y;

X₂ = L 或 F;

X₃ = G 或 A;

X₄ = F 或 I; 且

X₅ = V 或 A。

类似地，本发明的另一种抗原性多肽组合物是一种组合、特别是一种混合表位，其包含多种、特别是至少 2 种合成肽，所述合成肽包含以下序列：

L-X₁-X₂-X₃-X₄-X₃-X₅-X₆-X₇-D-X₈-X₉-X₁₀-I-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆ (SEQ ID No:33),

其中：

X₁ = E, 或 S;

X₂ = L, H, S 或 Q;

X₃ = I, V 或 L;

X₄ = K, N, Y 或 P;

X₅ = T, S 或 P;

X6 = S 或 L;

X7 = K, W 或 S;

X8 = E, K, R 或 I;

X9 = E 或 N;

X10 = D, N 或 Q;

X11 = I, V, S, P 或 A;

X12 = K, D 或 N;

X13 = H 或 E;

X14 = N 或 S;

X15 = E 或 D;

X16 = D 或 Q。

以上三组中每一组中的数种多肽的组合或以上三组中数组中的多肽的组合可形成源自 MSP3 样蛋白质的 C-末端区域的包含所述肽的肽或多肽的混合物，或可形成融合多肽，或可形成不同融合多肽的混合物。

以上抗原性混合表位组合物具体可以是至少 50 种、至少 100 种、或至少 500 种不同序列的肽的混合物。还可包含相应于每一种观察到的和可能的取代物的合成肽的组合文库。包含两种上述组合或混合表位的抗原性组合物也包括在本发明范围内。

在任一上述抗原性多肽或抗原性多肽组合物中，可将脂质分子与多肽分子的至少部分相连接。可用于这方面的脂质分子的一个实例是 C-末端 palmitoylysylamide 残基。

上面已经提到，本发明的抗原性多肽的至少部分多肽或多肽分子可结合于支持物，由此构成缀合物。在本发明的这一实施方式中，优选的支持物是病毒颗粒、硝化纤维素或聚苯乙烯珠、以及生物可降解聚合物如 lipophosphoglycans 或聚-L 乳酸。

本发明的另一个方面涉及包含蛋白质或多肽或多肽组合物作为免疫原的免疫原性组合物，所述蛋白质或多肽或多肽组合物特别可通过上述任何重组方法而制备。

如实施例 5 中所讨论的，在此所述的基因家族表现出一个显著的特征，即该家族的不同成员之间存在的表位的保守性，这造成该基因家族的不同产物之间存在的免疫原性交叉反应性。实施例 2 和 3 中所阐述的 MSP-3-1 及其片段在疫苗接种中的潜力，连同上面提及的表位保守性和交叉反应性，是使得该基因家族及由其产生的多肽组合物成为针对疟疾进行疫苗接种的特别引人关注的候选物的显著特征。因此，本发明的另一方面涉及上述重组蛋白质或多肽或多肽组合物在制备抗疟疾疫苗中的用途以及这样的疫苗，所述疫苗包含作为免疫原的所述重组蛋白质或多肽或多肽组合物以及合适的药用载体。

本发明的免疫原性组合物和疫苗可进一步包含选自 LSA-1 (Guerin-Marchand, Druilhe et al. 1987)、LSA-3 (Daubersies, Thomas et al. 2000)、LSA-5、SALSA (Bottius, BenMohamed et al. 1996)、STARP (Fidock, Bottius et al. 1994)、TRAP (Robson, Hall et al. 1988)、PfEXP1 (Simmons, Woollett et al. 1987)、CS (Dame, Williams et al. 1984)、MSP1 (Miller, Roberts et al. 1993)、MSP2 (Thomas, Carr et al. 1990)、MSP4 (Marshall, Tieqiao et al. 1998)、MSP5 (Marshall, Tieqiao et al. 1998)、AMA-1 (Peterson, Marshall et al. 1989; Escalante, Grebert et al. 2001)、SERP (Knapp, Hundt et al. 1989) 和 GLURP (见上) 中的至少一种抗原。将 GLURP 和/或 LSA-3 和/或 SERP 蛋白质用于本发明的免疫原性组合物中值得特别关注。

上述中的一种具体的免疫原性组合物包含选自 LSA-3、SERP 和 GLURP 或其组合或其免疫原性功能片段中的特定抗原。

根据本发明的一个具体实施方式，免疫原性组合物或疫苗被配制为用于皮内或肌肉内注射。为此，所述免疫原性组合物或疫苗优选地在每

个注射剂量中包含 1 至 100 μg 的免疫原，更优选地为 2 至 50 μg 。或者，免疫原性组合物或疫苗可如文献所述被配制为用于口服施用 (BenMohamed, Belkaid et al. 2002)。

本发明的免疫原性组合物或疫苗还可进一步包含 SBAS2 和/或明矾和/或 Montanide 作为佐剂。

本发明的其他方面涉及针对在此所述的抗原的抗体、特别是纯化的抗体、以及抗体片段。如以上及实施例 5 所述，MSP-3 家族的表位保守性造成所获得的针对一种抗原的抗体具有交叉反应性。例如，本发明的一种特别引起关注的抗体是这样一种合成或重组的抗体，其与 MSP-3 家族、特别是与 MSP-3-3 和/或 MSP-3-4 和/或 MSP-3-7 和/或 MSP-3-8 的数种蛋白质发生交叉反应，并介导在体外条件下通过单核细胞依赖性的抗体介导的 ADCI 机制介导在血液期抑制恶性疟原虫的生长或杀死恶性疟原虫。

针对选自 MSP-3 家族中的、特别是具有 SEQ ID No: 6、8、14 和 16 的蛋白质中的数种蛋白质、和/或本发明的数种多肽的抗体库和/或抗体片段库，也是本发明的一部分。

本发明的另一种抗体库和/或抗体片段库针对的是如上所述的多肽组合物。

本发明的优选的抗体 (或片段) 是人抗体或人源化抗体。这些抗体或抗体片段可例如在浮萍属 (*Lemna*) 以及玉米、烟草、CHO 细胞等等中制备。如果在 CHO 细胞中制备，则可例如通过采用 WO 03/016354 中所述的方法而获得。

本发明还涉及包含上述抗体或抗体库或其抗体片段库的组合物在制备抗疟疾药物中的用途。当然，包含这一抗体或抗体库的、用于疟疾的被动免疫治疗的药物，也视同为本发明的一部分。该药物可进一步包含针对选自 LSA-1、LSA-3、LSA-5、SALSA、STARP、TRAP、

PfEXP1、CS、MSP1、MSP2、MSP4、MSP5、AMA-1、SERP 和 GLURP 中的至少一种抗原的抗体。

本发明还包括通过给有需求的患者施用上述免疫原性组合物、疫苗或包含抗体的药物而预防、减轻或治疗疟疾的方法。

本发明还涉及对可能感染恶性疟原虫的个体进行体外疟疾诊断的方法，其包含将来自所述个体的生物样品与本发明的蛋白质或抗原性多肽相接触，所述接触在能够使得所述抗原性肽或多肽与可能存在于所述生物样品中的抗体形成抗原/抗体复合物的条件下进行，并在体外检测可能形成的抗原/抗体复合物。在该方法中，可通过 ELISA 分析进行体外针对。作为该方法的附加步骤，还可将所述生物样品与源自其他抗原的一或数种抗原性肽相接触，所述其他抗原选自 LSA-1、LSA-3、LSA-5、SALSA、STARP、TRAP、PfEXP1、CS、MSP-3-1、MSP-3-2、MSP-3-5、MSP-3-6、MSP1、MSP2、MSP4、MSP5、AMA-1、SERP 和 GLURP，特别是选自 LSA-3、SERP 和 GLURP。

用于对可能感染恶性疟原虫的个体进行体外疟疾诊断的一个替代方法包含，将来自所述个体的生物样品与本发明的抗体相接触，所述接触在能够使得所述抗体与可能存在于所述样品中的恶性疟原虫特异性抗原形成抗原/抗体复合物的条件下进行，并在体外检测可能形成的抗原/抗体复合物。

本发明还预期基于 MSP-3 家族的特殊特征的、用于体外诊断疟疾的试剂盒。例如，它们可包含本发明的至少一种肽或多肽，所述肽或多肽可结合于一种支持物。该试剂盒可进一步包含能够使得所述抗原性肽或多肽与可能存在于生物样品中的抗体形成抗原/抗体复合物的试剂，以及能够在体外检测可能形成的抗原/抗体复合物的试剂。

根据本发明，另一种用于体外诊断疟疾的试剂盒包含如上所述的抗体，且需要时，包含能够使得所述抗体与来自可能存在于生物样品中

的 MSP-3 家族的蛋白质的抗原形成抗原/抗体复合物的试剂, 以及能够在体外检测可能形成的抗原/抗体复合物的试剂。

本发明还包括一种重组核苷酸序列, 其包含编码本发明的蛋白质或抗原性多肽的序列。本发明的具体的序列是包含编码至少两种 MSP-3-b 样基序和/或 MSP-3-c/d 样基序的核苷酸序列, 其中所述基序中的至少一个选自基序 SEQ ID No: 19 至 24 和 27 至 30 或其保守性变体的序列。这种重组核苷酸序列的第一个实例包含编码包含数个 MSP-3-b 样基序的融合蛋白的序列, 其中所述基序中的至少两个选自基序 SEQ ID No: 17 至 24 及其保守性变体。第二个实例是包含编码包含数个 MSP-3-b 样基序的融合蛋白的序列的重组核苷酸序列, 其中所述基序中的至少两个选自基序 SEQ ID No: 25 至 30 及其保守性变体。

另一个实例是编码至少两种 MSP-3-b-like 和/或 MSP-3-c/d 样基序的序列, 其中所述基序中的至少一个选自基序 SEQ ID No: 19 至 24 和 27 至 30 或其保守性变体, 并包含一种包含编码包含数个 MSP-3-b 样基序的融合蛋白的序列的重组核苷酸序列, 其中所述基序中的至少两个选自基序 SEQ ID No: 25 至 30。

本发明还涉及重组的克隆和/或表达载体, 其包含如上所述的核苷酸序列, 所述序列能够, 例如置于相对于宿主细胞是同源的或异源的启动子和调节元件的控制下, 以便在宿主细胞中表达。

上段中提及的表达载体可有利地用于制备用于抗恶性疟原虫的基因免疫接种的药物。

本发明还涉及核酸疫苗 (例如多核苷酸疫苗), 其包含本发明的核苷酸序列。

本发明还包括经上述表达载体转化的重组宿主细胞, 例如细菌、酵母、昆虫细胞、或哺乳动物细胞。

下文中的附图和实验数据举例阐述了本发明的一些方面和优越之处。

附图说明

图 1: 成簇位于 10 号染色体的同一区域的 9 个基因的组织结构。9 个可读框被非编码区域分隔开, 并编码一系列 (5'-3') 基因, 所述基因编码的蛋白质的第一个被命名为 GLURP, 其后在 1300 碱基对处是 MSP-3 (现命名为 MSP-3-1), 随后是其他 7 个基因, 命名为 MSP-3-2、MSP-3-3、MSP-3-4、MSP-3-5、MSP-3-6、MSP-3-7、MSP-3-8。

图 2: 来 MSP-3-1 的各种肽。保护作用与针对肽 MSP-3b、c 和 d 的抗体相关。

图 3、4 和 5: 体内研究。将特异性抗体被动转移入移植了恶性疟原虫感染的人类 RBC 的免疫缺陷小鼠的实验。

在体内被动转移的条件下证实, 针对 MSP 3-b 肽、MSP-3-d 肽和 GLURP-R0 区域的抗体都能够清除在免疫缺陷的 SCID 小鼠中建立的恶性疟原虫寄生虫血症。

图 6: 体内研究。确证结果。

以针对 MSP-3-b 表位并与 MSP-3-2 重组蛋白质交叉反应的人类重组抗体进行被动转移可清除恶性疟原虫 SCID 小鼠的寄生虫血症。

图 7: 采用覆盖区域 MSP-3-b、c、d 肽的长合成肽对人志愿者进行人工免疫接种, 用由此激发的抗体获得的结果。

在恶性疟原虫 SCID 小鼠模型中, 在体外和体内条件下均观察到同样的效果。

图 8: 比较总非洲 IgG 与调整到与总非洲 IgG 相同浓度的纯化抗 MSP-3-b 抗体之间的生物学效应。

仅观察到抗 MSP-3-b 抗体具有更强的且更完全的效应, 这突出说明其作为疫苗的潜力。

图 9: MSP-3 家族的核苷酸序列的 ClustalW 比对。

图 10: MSP-3 家族的肽序列的 ClustalW 比对。

图 11: MSP3 基因家族之间的序列比较。

这一比较说明, 具有生物学活性的抗体所针对的该家族成员之间的表位具有非常罕见的保守性, 这对于产生保护作用至关重要。

图 12: MSP-3-b 样基序。

图 13: MSP-3-c-d 样基序。

图 14: **A.** 针对 30 个得到保护的 OoDo 个体中的每一个的抗原的 IgG3 抗体应答谱 (IgG3 特异性应答比例的平均值和标准误)。 **B.** 具有低 IgG3 抗 MSP3 应答的 7 个得到保护的 OoDo 居民的 IgG3 应答谱 (低 IgG3 截断值被定义为那些低于平均值 95%置信区间界限以下的截断值, 即抗 MSP3b IgG3 比例 <2.30)。 **C.** 具有低 IgG3 抗 R0 应答的 15 个得到保护的 OoDo 居民的 IgG3 应答谱 (低 IgG3 截断值被定义为那些低于 IgG3 比例平均值 95%置信区间界限以下的截断值, 即抗 GLURP R0 IgG3 比例 <1.38)。 **D.** 1998 年具有高 IgG3 MSP3 应答的 7 个得到保护的个体在 5 年间的改变。 **E.** 1998 年具有高 IgG3 抗 GLURP R0 应答的 6 个得到保护的个体在 5 年间的改变。

图 15: 亲和纯化的抗体对来自 MSP-3 基因家族的各种构建体的 ADCI 活性。结果表示为相对于阳性对照的平均 SGI (特异性生长抑制指数), 阳性对照为免疫非洲人免疫球蛋白库 (PIAG), 其被用来被动转移至泰国儿童。用于亲和纯化的序列相应于 C-末端区域, 其是基因间最具有同源性的部分且是唯一非常具有保守性的部分, 在图 18 中, 以线条在 C-末端区域下方标示出所述序列。

结果说明, 所有特异于 6 种基因中的各种的各区域的抗体均在 ADCI 机制中具有很强的活性, 与非洲免疫球蛋白库差不多, 而通过被动转移至感染个体发现, 所述非洲免疫球蛋白库可有效清除恶性疟原虫。

图 16: 针对 MSP-3 家族各个成员的 C-末端区域进行亲和纯化的抗体与 MSP-3 家族其他成员的交叉反应性模式。GLURP、571 和 BSA 作为阴性对照。

结果说明, 针对该家族的一个成员的给定 C-末端区域进行亲和纯化的抗体与 MSP-3 家族的所有其他成员发生不同程度的交叉反应。最强的交叉反应模式由 MSP-3-4 产生, 其对所有其他成员显示出强阳性信号, 随后是 MSP-3-8。不过, 这一斑点印迹仅显示了 MSP-3 家族各个成员中的交叉反应表位。

图 17: 针对 MSP-3 家族各个成员的 C-末端区域进行亲和纯化的抗体与来自于 MSP-3 家族的 MSP-3-1 和 MSP-3-2 成员的肽的交叉反应性模式。肽是来自 MSP-3-1 和 MSP-3-2 的肽 a、b、c、d 和 f。重组 MSP-3 C 末端和 BSA 分别作为阳性和阴性对照。

结果说明, 针对该家族不同成员的 C-末端区域的抗体与 MSP-3-1 (特别是 MSP-3b 和 c) 的 C-末端的不同区域发生不同程度的反应, 且 MSP-3-f 发生最强的反应。与 MSP-3-2 的不同的肽的交叉反应性不如与 MSP-3-1 的肽那样强。最后, 与 MSP-3-1 CT (C 末端重组体) 发生非常强的交叉反应, 这同样提示交叉反应针对的不是任何个别的肽所限定的表位, 而最可能是针对由较长的 C 末端重组体所产生的构象表位。就此而言, 任何给定的亲和纯化的抗体与该家族的任何给定成员的交叉反应性的程度证明该家族的不同成员之间具有结构的同源性, 且存在交叉反应性表位, 包括那些因 3 维构象而产生的表位。对于 MSP-3-2 而言也是如此。

图 18: MSP-3 家族不同成员的示意图。下划线标示的是 C-末端区域, 其用于构建那些用于免疫分析的重组抗原。

图 19: 恶性疟原虫 MSP3 蛋白质的示意图以及设计 MSP3 重组蛋白质 (MSP3-NTHis 和 MSP3-CTHis) 和肽 (MSP3a、MSP3b、MSP3c、MSP3d、MSP3e 和 MSP3f)。MSP3 的 N-端部分在此被压缩表示 (由点划

线表示)。DG210 代表最初被鉴定为保护性抗体的靶位的 λ gt11 表达克隆 [Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. 1992]。数字所示为基于源自 3D7 株的序列的各个区域的氨基酸位置。

图 20: 来自象牙海岸的高免疫血清 (hyperimmune sera) (n=30) 中的针对 MSP3 的不同区域的总 IgG 应答, 所述高免疫血清被用来制备保护性 IgG, 以用于进行人体被动转移实验 [Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, et al. 1991]。如果测试血清的平均 O.D.与对照血清的平均 O.D. + 3 X 对照血清的标准差的比例 ≥ 1 , 则认为抗体反应为阳性。数字代表针对各个区域的阳性血清的平均抗体滴度 (以比例表示)。表格显示的是与 MSP3 的不同区域具有反应性的阳性血清 (根据总 IgG) 的百分比发生率 (Prevalence)。

图 21: 来自 Dielmo 村的血清 (n=48) 中的针对 MSP3 的不同区域的抗体的发生率和平均滴度。如果测试血清的平均 O.D.与对照血清的平均 O.D. + 3 X 对照血清的标准差的比例 ≥ 1 , 则认为抗体反应为阳性。数字代表针对各个区域的阳性血清的平均抗体滴度 (以比例表示)。表格显示的是与 MSP3 的不同区域具有反应性的阳性血清 (根据 IgG 同种型) 的百分比发生率 (Prevalence)。

图 22: 在 ADCI 分析中, 亲和纯化的人抗 MSP3 抗体对寄生虫生长的作用。组方图代表来自 2 个独立实验中的 % SGI 的平均值 (如文字部分所述) $\pm$ 标准误; $>30\%$ 的数值具有显著性。PIAG, 来自用于人类被动转移的象牙海岸成人血清库的阳性对照 IgG [Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, et al. 1991]。

图 23: 体内, 将亲和纯化的人抗 MSP3 抗体与人外周血单核细胞转移入 *P.f.*-HuRBC-BXN 小鼠。曲线显示的是注射抗 MSP3b 抗体 (灰色方块) 和抗 MSP3d 抗体 (白色圆环) 的小鼠的寄生虫血症的过程, 通过显微镜观察薄层血涂片而确定。箭头指示的是注射日, 首先注射人单核细胞 (HuMn), 然后注射单核细胞和抗 MSP3 抗体 (200 μ l, IFA 1:200)。

图 24: MSP3a、MSP3b、MSP3c。

图 25: MSP3d、MSP3e、MSP3f。

图26: 图片 (A): 位于恶性疟原虫10号染色体的32 kb的重叠群 (contig) (3D7株的1404403至1436403 bp) 的示意图, 示出了MSP3样ORF的相对位置。MSP3.1和MSP3.2分别是已知的编码裂殖子表面蛋白质MSP3 (Oeuvray, *et al.*, 1994) 和MSP6 (Trucco, *et al.*, 2001) 的基因。图片 (B): 具有相关的C-末端序列组织结构的MSP3蛋白质家族的氨基酸序列的ClustalW比对和Boxshade表示法。MSP3.5和MSP3.6与其他成员不具有C-末端序列相似性。黑色背景上的白色字母代表相同的残基, 而灰色背景上的黑色字母代表相似的残基。破折线代表使比对最优化的缺口。MSP3家族成员共同具有的模式为: N-末端信号肽 (点线框); MSP3蛋白质家族的特征标记序列 [1]; 富含谷氨酸的区域 [2]; 以及亮氨酸拉链结构域 [3]。以黑色突出显示的序列涉及的区域被鉴定为在MSP3.1中鉴定的保护性抗体的靶位。图片 (C): 是显示通过比较被编码的蛋白质序列而产生的不同MSP3样ORF之间的序列相似性的进化树。

图 27: 由 MSP3 样 ORF 编码的蛋白质序列的示意图。各个分子的N-末端区域具有 () – 信号肽和 () – 4-6 个氨基酸的特征标记基序。除MSP3.5 和 MSP3.6 以外的所有 MSP3 家族成员的 C-末端部分具有与MSP3.1 相似的序列组织结构。() – 和 () 代表在 MSP3.1 中鉴定的与保护性抗体的靶位共享序列相关性的区域。() – 和 () 分别代表富含谷氨酸的区域和推定的亮氨酸拉链结构域。() – 代表与 MSP3.1 具有相似性的区域。在不同成员中观察到的其他特征为: () – MSP3.1 中的七重复序列 (heptad repeats); 其他 ORF 中的与 MSP3.1 具有序列不一致性的区域: ()、() 和 () – 分别位于 MSP3.2、MSP3.7 和 MSP3.3 中。() – 代表 MSP3.4 和 MSP3.8 中的与 *var* 和 *eb1*-蛋白质家族中的 DBL 结构域具有相似性的区域及半胱氨酸残基的位置。() 和 () – 分别是 MSP3.4 和 MSP3.8 中的与 MSP3.1 无关的区域, 它们彼此具有相似性。() 和 () –

分别代表 MSP3.5 和 MSP3.6 中的区域及其他被遮蔽的区域，它们与其他 MSP3 样 ORF 不具有相似性。粗线代表 () – 覆盖在各个成员中鉴定到的独特区域的重组蛋白质，它们与其他恶性疟原虫蛋白质不具有序列相似性，和 () – 覆盖除 MSP3.5 和 MSP3.6 以外的所有成员中的相关 C-末端区域的重组蛋白质。

图28: 针对那些覆盖了在MSP3样ORF的各个成员中鉴定到的独特区域的重组蛋白质的亲和纯化的抗体的特异性。将2 μg 的纯化的His-tag重组蛋白质 (MSP3.1u,...MSP3.8u) 在硝化纤维素条上进行斑点印迹。如上图所示，针对一组所有独特区域重组蛋白质对来自高免疫血清的针对各独特区域重组蛋白质的亲和纯化的抗体 (抗MSP3.1u、抗MSP3.8u) 进行测试。抗体反应性模式显示，亲和纯化的抗体对重组蛋白质 (这些抗体是针对这些重组蛋白质进行亲和纯化的) 具有高特异性。

图29: MSP3样ORF的表达分析。图片A: RT-PCR分析转录产物。箭头指示了使用特异于各个ORF的引物组获得的cDNA扩增产物的大小。注意到MSP3.5的转录产物相对于其他家族成员的丰度较低。图片B: 检测恶性疟原虫 3D7血液期提取物中的由不同MSP3样ORF编码的蛋白质，通过Western印迹进行分析，使用了针对在各个ORF中鉴定到的独特的非交叉反应区域的亲和纯化的抗体。箭头指示了通过变性SDS-PAGE检测到的恶性疟原虫蛋白质的大小。数字代表分子量标志的位置。针对MSP3.5和MSP3.6的独特区域的亲和纯化的抗体在寄生虫提取物中没有检测到特异性蛋白质产物。图片C: IFA分析丙酮固定的血液期寄生虫的薄层涂片显示了裂殖子表面染色，使用的是与用于Western印迹分析的抗体相同的抗体。各个显微镜视野右下角的比例尺代表5 μm 。针对MSP3.5的独特区域的亲和纯化的抗体在IFA中没有与寄生虫蛋白质发生反应。

图30: 在来自塞内加尔疟疾疫区Dielmo村的高免疫血清库中观察到的针对MSP3蛋白质家族的不同成员的抗体亚型反应性模式。组方图代表减去针对BSA的反应性之后得到的O.D.450平均值。[NH₄ SCN]。

图31: 显示的是在NH₄SCN的浓度渐增条件下, 针对MSP3蛋白质家族成员的抗体结合亲和力。这里显示的是亲和纯化的抗体的两个实例, 图片A: 抗MSP3.4抗体对MSP3.1的反应性, 和图片B: 抗MSP3.7抗体对其自身的反应性。无NH₄SCN时的抗原抗体反应性的测定值被认为是100%, 存在渐增浓度的NH₄SCN的条件下获得反应性被表示为该100%的分数。由于抗体结合并非与渐增浓度的离液盐呈线性关系, 因此通过计算由图中阴影面积所代表的“各个曲线下的面积%”确定抗体结合亲和力。

图32: 通过人工免疫接种小鼠产生的抗体所显示的交叉反应性。以来自MSP3.1和MSP3.2的相关C末端重组蛋白质免疫接种各组5只Balb/C小鼠, 以Montanide作为佐剂。组方图显示的O.D.450值代表针对MSP3蛋白质家族的不同成员的抗MSP3.1和抗MSP3.2小鼠血清的反应性。误差条代表标准差值。

图33: 在ADCI分析中, 针对MSP3蛋白质家族的相关C-末端区域的人的亲和纯化的抗体对寄生虫生长的影响。组方图代表来自2个独立实验的% SGI (如文字部分所示) 平均值±标准误; >30%的值具有显著性。PIAG, 来自用于在人类进行被动转移的象牙海岸成人血清库的阳性对照IgG (Sabchareon, *et al.*, 1991)。

图34: (A) 恶性疟原虫 MSP6蛋白质和设计MSP6 C末端重组蛋白质和肽 (MSP6a, MSP6b, MSP6c, MSP6d, MSP6e和MSP6f) 的示意图。分子的N-端部分在此被压缩表示 (由点划线表示)。数字显示的是各个区域的氨基酸位置, 其基于来自3D7株的序列。(B) 不同的MSP6肽区域与它们的来自MSP3的相应区域的同源性比对。实心圆代表这两种相关的分子之间具有的氨基酸残基的相同性, 而垂直线显示的是其相似性 (采用Wilbur-Lipman算法进行成对比对, PAM250)。

图35: 来自象牙海岸的高免疫血清 (n=30) 中的针对MSP6的不同区域的抗体流行程度和滴度。如果测试血清的O.D平均值与对照血清的O.D

平均值 + 3 x 对照血清标准差之比 ≥ 1 ，则认为抗体反应性为阳性。数字代表抗体滴度，以各血清的比例表示，点划线代表等于1的基线比例。表格显示对MSP6的不同区域具有阳性IgG反应性的血清的百分比流行程度。

图36: ADCI分析测定的人类亲和纯化的抗MSP6抗体对寄生虫生长的作用。组方图代表来自3个独立实验的平均值% SGI (如蚊子部分所示) $\pm$ 标准误；数值 $> 30\%$ 被认为具有显著性。PIAG，来自用于在人类进行被动转移的象牙海岸成人血清库的阳性对照IgG。以通过PIAG观察到的作用作为100%，并与之相比调整亲和纯化的抗体产生的寄生虫抑制水平。NigG，来自从未暴露于疟疾的法国供者库的阴性对照IgG。抗RESA抗体亲和纯化自针对合成肽 (序列H-[EENVEHDA]₂-[EENV]₂-OH) 的高免疫血清 (象牙海岸) 库。

实施例

实施例 1: 通过 ADCI 机制在体外以针对基因产物的抗体在血液期杀死恶性疟原虫

2.A. 材料和方法: ADCI 分析

2.A.1. 介绍

抗体依赖性细胞抑制 (ADCI) 分析被设计用于分析在存在单核细胞的情况下，抗体抑制恶性疟原虫的体外生长的能力。研究显示，那些通过在人类进行被动转移而证实具有抗恶性疟原虫血液期保护作用的抗体，如果不能与血液单核细胞进行协作，就不能在体外抑制寄生虫。还发现，那些在体内不具有保护作用的抗体在 ADCI 分析中对恶性疟原虫的生长没有作用。因此，ADCI 作为一种体外分析，其结果反映的是在人类的体内条件下观察到的抗疟疾抗体的保护性作用。

能够与单核细胞协作的抗体显然应该是嗜细胞性的: IgG1 和 IgG3 同种型在 ADCI 中是有效的，而 IgG2、IgG4 和 IgM 是无效的。与此一致

的是，发现在来自被保护的个体的血清中，嗜细胞抗恶性疟原虫抗体是主要的，而在未被保护的患者中，所产生的针对寄生虫的抗体主要是非嗜细胞性的。

这些结果提示，ADCI 很可能参与以下连续的事件：在裂殖体破裂时，一些裂殖子表面成分与通过 Fc 片段结合于单核细胞的嗜细胞抗体之间的接触触发了可溶性介质的释放，这些介质弥散于培养基中并阻断周围红细胞内的寄生虫的分裂。

ADCI 方案包括的主要步骤为：

- (i). 以离子交换层析制备血清 IgG
- (ii). 自健康的血液供者分离单核细胞
- (iii). 制备恶性疟原虫寄生虫，包括同步化和富集裂殖体
- (iv). 在存在抗体和单核细胞的条件下培养寄生虫 96 小时
- (v). 通过显微镜观察和寄生虫计数分析抑制作用

2.A.2. 材料

制备 IgG

1. Tris 缓冲液: 0.025 M Tris-HCl, 0.035 M NaCl, pH 8.8。
2. 磷酸缓冲盐 (PBS), pH 7.4。
3. GF-05-三丙烯酰基过滤柱 (IBF, Biothecnics, Villeneuve La Garenne, France)。
4. DEAE-三丙烯酰基离子交换层析柱 (IBF)。
5. G25 过滤柱。
6. 用于蛋白质浓缩的 Amicon 滤膜和管 (分子量截断值: 50,000 Da)。
7. Sterile Millex 滤膜, 0.22 μm 孔径 (Millipore Continental Water Systems, Bedford MA)。
8. 配备紫外灯的分光光度计。

制备单核细胞

1. 自健康供者收集肝素化的血液，体积 20-40 mL。
2. Ficoll-Hypaque 密度梯度 (Pharmacia LKB Uppsala, Sweden)。
3. Hank 溶液，补充了 NaHCO_3 , pH 7.0。
4. RPMI 1640 培养基，补充了 35 mM Hepes 和 23 mM NaHCO_3 ；以矿泉水制备，4°C 存放。
5. 用于非特异性酯酶 (NSE) 染色所试剂：固定溶液、亚硝酸盐、染料、缓冲液和底物。
6. 96-孔无菌塑料板 (TPP, Switzerland)。
7. 冷却离心机。
8. CO_2 孵箱。
9. 倒置显微镜。

制备寄生虫

1. RPMI 1640 培养基 (见上)。
2. 10% Albumax 储存液；4°C 存放至 1 个月。
3. 5%山梨醇，用于寄生虫的同步化。
4. 原生质凝胶，用于富集裂殖体。
5. 用于薄层涂片的固定和染色的试剂：甲醇、伊红、亚甲基蓝。

2.A.3. 方法

制备 IgG

IgG 提取自人血清 (见注释 1)，如下所示：

1. 将血清按照 1 至 3 的比例稀释于 Tris 缓冲液。
2. 将稀释的血清以预先用 Tris 缓冲液平衡过的 GF-05 三丙烯酰基凝胶过滤柱进行过滤。确保血清与过滤凝胶的比例为 1 体积的未稀释血清比 4 体积的 GF-05 凝胶。
3. 合并含蛋白质的组分。

4. 加载于预先用 Tris 缓冲液平衡过的 DEAE-三丙烯酰基离子交换层析柱。确保血清与过滤凝胶的比例为 1 体积的未稀释血清比 4 体积的 DEAE 凝胶。

5. 收集 1 mL 体积的各组分。

6. 使用 280 nm 滤镜测量各个组分的光密度 (OD)。

7. 如下计算 IgG 浓度：

$$\text{IgG 浓度 (mg/mL)} = \frac{\text{OD 280 nm}}{1.4}$$

8. 合并含 IgG 的组分。

9. 使用 Amicon 滤膜浓缩 IgG。Amicon 滤膜先在蒸馏水中浸泡 1 小时然后使之适合特殊的管，所述管中加入 IgG 溶液。

10. 将管以 876g 离心 2 小时，4°C。这通常可产生 25 倍的浓缩物。

11. 以预先用 RPMI 培养基平衡过的 G25 柱进行最后一步凝胶过滤。

12. 收集 RPMI 中的 IgG 组分。

13. 使用 280 nm 滤镜测量各个组分的光密度 (OD)。

14. 计算 IgG 浓度。

15. 合并含 IgG 的组分。

16. 将 IgG 组分以 0.22 μm 孔径滤膜进行过滤除菌。

17. 将无菌 IgG 溶液在 4°C 存放至 1 个月 (或加入 Albumax 以存放更长的时间—但并不推荐)。

制备单核细胞

制备单核细胞的方法基于 Boyum 所述 (*Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1968, 21, 77-89)，步骤包括：

1. 以 Hank 溶液将肝素抗凝血稀释 3 倍。

2. 小心地将 2 体积的稀释血液加至 1 体积 Ficoll-Hypaque 上层 (每管最多 20 mL 的稀释血液)。
3. 以 560 g 离心 20 min, 20°C。
4. 将 Ficoll/血浆交界处的单个核细胞层取出。
5. 在单个核细胞悬液中加入 45 mL 的 Hank 溶液。
6. 1000 g 离心 15 min, 20°C。
7. 小心地将沉淀的细胞重悬于 45 mL 的 Hank 溶液中。
8. 1000 g 再次离心 15 min, 20°C。重复洗涤步骤 2 次。
9. 最后, 180 g 离心 6 min, 20°C, 以残留于上清液中的血小板。
10. 将单个核细胞重悬于 2 mL 的 RPMI 中。
11. 计算细胞悬液中的单个核细胞 (即淋巴细胞加上单核细胞) 的浓度: 将 20 μ L 的细胞悬液样品在 RPMI 中稀释 3 倍, 使用血球计数器 (例如 Malassez 型号) 计数细胞数。
12. 使用非特异性酯酶 (NSE) 染色技术测定单核细胞数:
 - (i). 在微量离心管 A 中, 将 40 μ L 单个核细胞悬液加至 40 μ L 的固定液中。
 - (ii). 在微量离心管 B 中, 按照以下次序混合 NSE 染色试剂: 60 μ L 亚硝酸盐、60 μ L 染料、180 μ L 缓冲液、和 30 μ L 底物。
 - (iii). 将微量离心管 B 中的混合物加至微量离心管 A 中的细胞中。
 - (iv). 取 20 μ L 染色细胞样品并测定单核细胞:淋巴细胞的比例: 单核细胞为棕色, 而淋巴细胞是未着色的。单核细胞的比例通常占全部单个核细胞的 10-20%。
13. 以 RPMI 将细胞悬液的浓度调整至每 100 μ L 中 2×10^5 单核细胞。
14. 将细胞悬液的样品加入 96-孔板中, 100 μ L/孔。

15. 在 37°C、5% CO₂ 温育 90 min。温育期间，单核细胞会粘附于塑料板上。

16. 去除未粘附的细胞，通过在每孔中加入 200 μL 的 RPMI 然后将其完全去除而洗涤单核细胞。

17. 重复洗涤步骤 3 次，以便去除所有未粘附细胞。

18. 至少 95% 的回收细胞为单核细胞。通过倒置显微镜观察以调节细胞的状态以及各孔中细胞分布的相对均质性 (见注释 2、3 和 4)。

制备寄生虫

恶性疟原虫株培养于 RPMI 1640，添加了 0.5% Albumax。

使用山梨醇处理将寄生虫同步化，方法如下：

1. 以矿泉水将山梨醇储存液稀释至 5%。
2. 1200 rpm 离心未同步化的寄生虫培养悬液 10 min，20°C。
3. 将沉淀重悬于 5% 山梨醇溶液中。这将导致裂殖体感染的 RBC 发生选择性裂解，而不会影响环形和幼滋养体。

如果需要，通过悬浮于原生质凝胶而富集裂殖体，方法如下：

1. 将含有未同步的寄生虫的培养物在 250 g 离心 10 min，20°C。
2. 将沉淀重悬，终浓度为 20% 红细胞 (RBC)、30% RPMI、50% 原生质凝胶。
3. 37°C 温育 30 min。感染了裂殖体的 RBC 会留在上清液中，而感染了幼滋养体和未感染的 RBC 会发生沉淀。
4. 通过在 20°C 以 250 g 离心 10 min 小心地收集上清液。
5. 制备来自沉淀细胞的薄层涂片，染色，并通过显微镜检查确定寄生虫血症。
6. 通常，采用这种方法可回收 ~ 70 % 寄生虫血症的同步化裂殖体感染的 RBC。

为了进行 ADCI 分析, 使用了同步化的早期裂殖体寄生虫。通常, 寄生虫血症为 0.5-1.0%, 而红细胞压积为 4%。

ADCI 分析

1. 末次洗涤后, 在每个含有单核细胞的孔中加入:
 - (i). 40 μ L 的 RPMI, 添加了 0.5% Albumax (培养基)。
 - (ii). 10 μ L 的待测试抗体溶液。通常使用的 IgG 的浓度为其血清原浓度 (来自高发病疫区的成人为~ 20 mg/mL, 对于疫区的儿童以及首次发病的患者为~ 12 mg/mL) 的 10%。(见注释 5)。
 - (iii). 50 μ L 的寄生虫培养物, 以 0.5%寄生虫血症和 4% 红细胞压积。
2. 对照孔的组成为:
 - (i). 单核细胞 (MN) 和寄生虫与自无症疾病史的供者的血清制备的正常 IgG (N IgG)。
 - (ii). 寄生虫与待测试 IgG, 无 MN。
3. 在烛罐 (candle-jar) (或低 O₂, 5% CO₂ 孵箱) 中将培养物在 37°C 维持 96 小时。
4. 48 和 72 小时后, 在各孔中加入 50 μ L 培养基。
5. 96 小时后去除上清液。制备来自各孔的薄层涂片, 染色, 通过显微镜检查确定寄生虫血症。为了保证相对精确的寄生虫计数, 应该计数至少 50,000 个红细胞 (RBC) 并计算感染的 RBC 的百分数 (见注释 6 和 7)。
6. 计算特异性生长抑制指数 (SGI), 这要考虑到可能由单核细胞或抗体单独引起的抑制:

$$SGI = 100 \times (1 - [\text{具有 MN 和 Ab 的寄生虫血症百分数} / \text{具有 Ab 的寄生虫血症百分数}] / [\text{具有 MN + N IgG 的寄生虫血症百分数} / \text{具有 N IgG 的寄生虫血症百分数}])$$

2.A.4. 注释

1. 自待测试血清制备 IgG 是一个必要的步骤，这是因为当使用未成分化的血清时，经常观察到非抗体依赖性的寄生虫生长抑制作用，这可能是因为氧化的脂质的缘故。

2. ADCI 中的单核细胞 (MN) 功能依赖于多种因素，例如用于制备 RPMI 1640 的水。高纯度的水，如 Millipore 水，尽管足以进行寄生虫培养，但造成粘附于塑料孔后的 MN 的回收数量产率低下。另一方面，含有微量矿物质的水，如商品化的 Volvic 水或玻璃蒸馏水 (glass-distilled water)，可稳定提供良好的单核细胞功能。

3. 通过在进行单个核细胞温育之前，以纤连蛋白包被培养孔，即以来自 MN 供者的自体血浆包被，继以 RPMI 1640 洗涤，可获得改善的单核细胞粘附性。

4. 来自病毒 (如流感) 感染个体的经常能够诱导非 IgG 依赖性的寄生虫生长抑制作用。这种非特异性抑制作用可造成在 ADCI 中无法观察到 IgG 依赖性的抑制作用。因此，应该避免使用怀疑具有病毒感染或在过去的 8 天中出现发热的 MN 供者。如果 MN 单独的直接抑制作用大于 50%，则 ADCI 的结果是不可靠的。在含有异源性血清例如 FCS 的培养基中制备 MN，导致 MN 发生分化，进行性转化为巨噬细胞，后者已经丧失了对 ADCI 的促进作用。

5. 如果需要，可以在 ADCI 中用人 MN 测试鼠 IgG。IgG2a 同种型能够结合存在于单核细胞上的人的 Fc γ 受体 II，其被发现参与了 ADCI 机制。

6. ADCI 分析的一种可能的变化是评价针对裂殖子表面抗原的保护性嗜细胞抗体 (高发病疫区的成人) 与识别相同抗原但由于不结合 Fc γ 受体而不能触发单核细胞激活的非保护性抗体 (疫区的儿童以及首次发病的患者) 之间的竞争性作用。因此，针对“关键”抗原的非嗜细

胞性 Ig 可阻断保护性抗体的 ADCI 作用。使用的各个 IgG 组分的浓度应该是其血清中的原浓度的 10%。

7. 可以对 ADCI 分析方案进行改动并作为两步 ADCI 而进行, 其中具有单核细胞的短期活化, 方法如下:

- (i). 将 MN 与测试 Ig 和感染了同步化的成熟裂殖体的 RBC (5-10% 寄生虫血症) 温育 12-18 小时。在这种第一步培养过程中, 感染的 RBC 发生破裂并释放裂殖子。
- (ii). 自各个孔收集上清液并将其在 700 g 进行离心。
- (iii). 将上清液分配至 96-孔中, 100 μ L/孔。
- (iv). 在各个孔中加入 100 μ L 的恶性疟原虫同步化培养物, 所述培养物含有新鲜培养基, 0.5-1% 寄生虫血症, 5% 红细胞压积 (特别小心地将用于这种第二步培养的 RBC 制备物中的白细胞污染物降至最低)。
- (v). 在培养的第 36 小时, 在各个孔中加入 1 mCi 的 ^3H 次黄嘌呤。
- (vi). 在培养的第 48 小时, 收集细胞并通过在液体闪烁计数器中计数而估计 ^3H 摄取。

2.B. 结果

ADCI 条件		抗体	体积	MN(-)	MN(+)	SGI %	Adj SGII %	直接
ADCI 02/03	17/1/03	RPMI	10 l	7,8	7,1	0%		0%
寄生虫株	3D7	透析的 NIG	1	7,5	6,3	8%		4%
Mn 制备物	粘附	PIAG (IFA 35,000) Ali	10 l	11,8	5	53%	100%	-51%
初始制备物 (%)	0.5%非同步于 AB+ RBC 中	抗 MSP3.1 CT (MSP3 Simon)	10 l	11,8	5	53%	100%	-51%
最终制备物 (%)	7.8%	抗 MSP3.4 CT	10 l	12,6	5,1	56%	104%	-62%
ADCI 的过程	72 h		15 l	9,4	5	42%	78%	-21%
MN 抑制 %	9%	抗 MSP3.7 CT	10 l	9,9	5	45%	83%	-27%
MN 供者	Frozen cyto 18/10/02		15 l	11,4	10	4%	7%	-46%
ADCI	标准	抗 MSP3.1 CT (原 MSP3)	10 l	11	4,6	54%	101%	-41%
			15 l	11,3	4,6	55%	103%	-45%
板 1		抗 MSP3.2 CT (MSP6)	10 l	12,5	3,4	70%	131%	-60%
所有抗体均被调整			15 l	9,8	4,5	50%	93%	-26%
至 IFA 滴度为 1:200		抗 MSP3.8 CT	10 l	12	4,4	60%	112%	-54%
			15 l	8,2	7,7	-3%	-6%	-5%
		抗 MSP3.3 CT	10 l	9,1	4,1	51%	94%	-17%
			15 l	9,1	4,5	46%	85%	-17%

表 1:

图 18 指出了用于产生抗体的 C-末端区域，相应于各个蛋白质下方的水平线。已经使用 PTCR-His 载体将它们克隆入大肠杆菌中。

实施例 2: 通过在小鼠中进行抗体被动转移的体内分析

通过将特异性抗体被动转移入感染了恶性疟原虫的移植了人 RBC 的免疫缺陷小鼠的实验, 在体内条件下证实了实施例 1 的体外结果。

用于进行本实施例的实验的材料和方法描述于 (Brahimi, Perignon et al. 1993; Badell, Oeuvray et al. 2000)。具体而言, 获得抗体的方法见 Brahimi *et al* 所述。

鉴于处理这种动物模型的复杂性, 除发现针对 MSP-3-b 肽、MSP-3-d 肽和 GLURP-R0 区域的抗体在体内的被动转移条件下能够清除在免疫缺陷 SCID 小鼠中所建立的恶性疟原虫血症以外, 其他所有抗体目前均不能进行测试 (图 3、4 和 5)。可以看出, 抗 MSP-3-b 和抗 MSP-3-d 抗体的清除作用特别强, 反之, 由抗 GLURP 抗体诱导的清除作用, 经调整至相同抗体浓度后, 则作用较小: 以抗 GLURP 抗体进行转移后寄生虫清除的时间大约是抗 MSP-3 抗体的 2 倍。同样, 基于在此所述的原因, 在此详细描述 6 种基因间的交叉反应网络提示, 针对其他基因的抗体如果被转移入感染了恶性疟原虫的小鼠中, 非常可能具有相同的生物学作用。最后, 通过使用一种人的重组抗体进一步证实了这种体内作用, 该重组抗体针对的是 MSP-3-b 表位 (图 6)、与 MSP-3-2 重组蛋白质具有交叉反应性、且其经被动转移后能够清除恶性疟原虫 SCID 小鼠中的寄生虫血症。使用覆盖区域 MSP-3-b、c、d 的长合成肽对人类志愿者进行人工免疫接种所激发的抗体也得到了基本相似的结果, 其在体外条件下以及在恶性疟原虫 SCID 小鼠模型中的体内条件下, 显示出相同的效果 (图 7)。

实施例 3: 在猴子中进行免疫接种实验

在体外和体内条件下收集到的保护性数据得到了在夜猴 (aotus monkey) 上独立进行的实验的证实, 实验显示, 以重组形式的 MSP-3-1 并以 Freund 完全佐剂作为佐剂免疫接种夜猴, 产生了在 ADCI 机制中有有效的抗体, 且当以烈性恶性疟原虫血液期接种对所述猴子进行攻击时, 所述猴子能够控制并清除其恶性疟原虫寄生虫血症, 而对照猴子则不能。

实施例 4: 比较总非洲人 IgG 与纯化的抗 MSP-3-b 抗体所产生的生物学作用

比较了总非洲人 IgG 与纯化的抗 MSP-3-b 抗体所产生的生物学作用, 其中抗 MSP-3-b 抗体的浓度被调整至与总非洲人 IgG 相同的浓度, 结果显示抗 MSP-3-b 抗体单独具有更强和更完全的作用, 这进一步说明其作为疫苗的前景。在先前研究以及本研究中, 本发明人观察到针对 MSP-3-b 肽的亲合纯化的抗体较总非洲人 IgG (前者是自后者提取的) 明显具有更快和更强的作用。观察到的这一结果是非常有趣的, 这是由于恶性疟原虫由将近 6000 种不同的蛋白质组成, 而肽 MSP-3-b 仅仅是其中一种蛋白质的一个小区域, 可以计算出抗 MSP-3-b 抗体可能还不到因暴露于该寄生虫所产生的总抗体的 1/10,000。

以总 IgG 或以抗 MSP-3-b 抗体进行了进一步的研究, 图 8 对此进行了概括。值得注意的是, 在这些实验中, 抗 MSP-3-b 抗体的量在总 IgG 或在纯化制备物中是完全相同的。这些实验所对应的是以抗 MSP-3-b 抗体处理的 6 只小鼠的平均值 $\pm$ SD 和以总非洲人的纯化的 IgG 处理的 6 只小鼠的平均值 $\pm$ SD, 其清楚地证实存在:

- 抗 MSP-3-b 抗体具有更快的作用,
- 抗 MSP-3-b 抗体具有更完全的作用, 这是因为其使得小鼠中的寄生虫血症被完全清除, 而免疫 IgG 使其降低但没有产生消除作用, 以相

同的制备物注射于人类志愿者也是如此 (且在具有慢性低度寄生虫血症的非洲成人供者中的情况也是如此)。

这一观察结果提示在免疫的非洲人 IgG 中存在其他抗体, 这些抗体能够竞争或阻断抗 MSP-3 抗体的抑制作用。不同抗体之间的这种负相互作用使人联想到例如由 Blackman 及同事所报道的有关抗 MSP-1 抗体的情况。这也可能与针对其他裂殖子表面抗原的非嗜细胞性抗体的干扰有关, 所述非嗜细胞性抗体可能例如通过空间位阻而间接地降低抗 MSP-3 抗体与 MSP-3 抗原的接近。

总之, 这一结果对于疫苗的研发具有非常重要的启示: 可以这样认为, 其说明以选定的疟疾抗原进行免疫接种引发的保护性应答可能较暴露于所有疟疾蛋白质或这些蛋白质的至少一部分所产生的保护性应答更加强烈。

换言之, 以被鉴定为保护机制的靶位的分子进行免疫接种所产生的保护作用可较自然感染所产生的保护作用更强, 而自然感染已知是针对寄生虫在人类中的无性血液期的最强的保护作用。因此, 这对于开发未来的、高效的疟疾疫苗是非常有前途的。

实施例 5: MSP-3 家族的表位保守性

用于进行本实施例的实验的材料和方法描述于 (Brahimi, Perignon et al. 1993; Badell, Oeuvray et al. 2000)。具体而言, 获得抗体的方法见 Brahimi et al 所述。

由于该基因家族的成员之间具有结构相似性, 因而在相应的蛋白质之间存在免疫学交叉反应性, 这已经得到证实: 针对各个基因的产物的亲和纯化的人类抗体能够与所有其他基因产物发生反应。

这些结果说明, 针对 MSP-3 家族的一种单一蛋白质诱导的抗体也与其他抗原反应, 如免疫印迹 (图 16 和 17) 和 ELISA (以下表 2) 所示。

	MSP3.1 CT	MSP3.2 CT	MSP3.3 CT	MSP3.4 CT	MSP3.7 CT	MSP3.8 CT	571-His	BSA
抗 <i>MSP3.1</i> CT	100	6	33	4	35	23	3	4
抗 <i>MSP3.2</i> CT	54	100	22	4	39	37	4	4
抗 <i>MSP3.3</i> CT	117	45	100	5	100	47	5	5
抗 <i>MSP3.4</i> CT	216	44	130	100	147	103	10	10
抗 <i>MSP3.7</i> CT	32	4	3	3	100	5	4	4
抗 <i>MSP3.8</i> CT	73	23	26	8	53	100	6	5

表 2: 针对 7 种基因产物的抗体均能够有效地在体外条件下通过单核细胞依赖性的抗体介导的 ADCI 机制介导在血液期杀死恶性疟原虫。

结果说明，针对这些区域中的每一个区域的抗体均同样有效地在体外条件下实现对恶性疟原虫红内期的生长抑制。

这一研究仍在进行中，其说明针对一种基因产物的亲和纯化的抗体可与其他基因产物相互发生交叉反应，反之亦然，ADCI 的结果 (实施例 1) 也间接说明了这一点。

其在免疫学和疫苗研发层面的实际意义在于，以该基因家族的任一成员进行免疫接种将诱导产生对同一基因产物和针对所有其他基因产物具有反应性的抗体。

因此，这是一类非常特殊的多基因家族，其中，不同于迄今发现的多基因家族通常具有的表位多态性这一特征，其主要特征在于表位保守性，这样，万一一种特定的基因发生缺失、突变，该家族的另一种或所有其他成员均可顶替其抗原性功能。此外，所有基因均同时表达于一种给定的寄生虫。

本发明人认为这不仅是一个优选的的疫苗家族，也是寄生虫为保证其存活而产生的一种机制。这种寄生虫只能在不杀死宿主的条件下才能存活：通过诱导以 ADCI 机制降低寄生虫血症的抗体，寄生虫保证免疫

宿主产生足够程度的保护性，且由此保证其自身的存活。该基因家族所具有的表位重复性保证了存在一种以上的基因产物能够实现这一重要的任务。

实施例 6: 以 MSP-3-2 肽在 ADCI 中获得的结果

以 MSP-3-2 肽 a, b, c, d, e 和 F 在 ADCI 中获得的结果与以来自 MSP-3-1 的相同的肽获得的结果相同，即针对肽 MSP-3-2 b, c, d 和 e 抗体具有 ADCI 活性，而针对肽 MSP-3-2 a 和 f 的抗体则不具有。

实施例 7: 纵向临床研究和寄生虫学随诊研究说明针对 MSP3 和 GLURP 的应答之间具有互补性

7.A. 材料和方法

7.A.1. 研究地区、人群和临床观察

OoDo 村是缅甸的再定居的丛林地区，具有以干热、季风和干爽季节为特征的热带气候。在这一地区，疟疾具有稳定性和随季节而变化的高发病性，感染主要为恶性疟原虫 (98%)，而间日疟原虫可能是其余 2% 的原因。疟疾发病的诊断要满足同时存在 4 个标准：i)- 校正后的腋窝温度 $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ ，ii)- 不存在其他临床疾病，iii)- 厚层血膜中存在无性恶性疟原虫形式，和 iv)- 氯奎治疗后出现临床改善和寄生虫学检查的改善。如果两次发热的间隔 ≥ 72 小时，则认为这是两次不同的疟疾发作。前 33 个月的随诊结果最近已经发表 (Soe, Khin Saw et al. 2001)。对同一研究人群继续随诊一年，直至 1998 年 12 月 31 日，采用的是相同的方案。在 1998 年 9 月抽取静脉血样品，自 1998 年 1 月 1 日至 12 月 31 日所记录的疟疾发作率被用于分析与临床保护的关系。

7.A.2. 血液采样和寄生虫学研究

通过对指血的厚层和薄层涂片进行每月一次的全面检查而监视疟疾感染的情况。如果在 Giemsa 染色的厚层涂片中的 200 个油镜视野内没

有观察到寄生虫，该涂片即被认为是阴性。对于发热病例，要检查氯奎治疗前后的两张指血涂片。以真空采血器收集静脉血样品，无菌分装血清，储存于 -20°C 直至测试。样品取自从一大组 292 个居民中选出的 116 个村民的代表性亚组，用于寄生虫分析的数据的超过 60%的每月一次的血片均来自这些村民。

7.A.3. 抗原

三种重组 GLURP 抗原来自恶性疟原虫 F32 的 N-末端非重复区域 R0 (GLURP₂₇₋₅₀₀)、中央重复区域 R1 (GLURP₄₈₉₋₇₀₅)、和 C-末端重复区域 R2 (GLURP₇₀₅₋₁₁₇₈) (Oeuvray, Theisen et al. 2000)。MSP1 的 C-末端 19-kDa 片段，即 MSP1₁₉，来自 Wellcome 株 (MSP1-W-19)，其作为重组 GST 融合蛋白质在大肠杆菌中制备，由 Dr. A. Holder (UK) 惠赠。使用前通过酶性裂解和随后的亲和层析去除 GST-tag。MSP3b 合成肽 (184-AKEASSYDYILGWEFGGGVPEHKKEEN-210, SEQ ID No:5) 含有 MSP3b B 细胞表位，其与在 ADCI 中有效的人抗体反应 (Oeuvray, Bouharoun-Tayoun et al. 1994)。

7.A.4. 抗体分析

通过酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定针对三种源自恶性疟原虫的抗原的抗体的水平，方法见 (Oeuvray, Theisen et al. 2000)。简言之，以重组蛋白质或合成肽于 4°C 过夜包被微滴定板 (Maxisorb, Nunc, Denmark)，条件如下：0.5 $\mu\text{g/ml}$ (R0 和 R2)，1 $\mu\text{g/ml}$ (R1 和 MSP1) 和 5 $\mu\text{g/ml}$ (MSP3b)。对于 GLURP 抗原，使用 0.05 M Na_2CO_3 , pH 9.6 作为包被缓冲液，对于 MSP1 和 MSP3，使用磷酸缓冲盐 (PBS) pH 7.4 作为包被缓冲液。次日以 PBS 加 0.05% Tween 20 (PBST) 洗涤板，并以溶于 PBS 的 2.5%脱脂奶封闭 2 小时。稀释于含 1.25 % (w/v) 脱脂奶的 PBST 中的血清被加至两个复孔中，室温温育 1 小时。各抗原使用不同稀释度的血清：GLURP 为 1:200，MSP1 为 1:100，而 MSP3 为 1:20。这些稀释度是基于预试验而选定的，这些预试验揭示了对照样品和测试样品之间

的 10 倍以上的差异。以 1:3000 稀释的过氧化物酶缀合的山羊抗人免疫球蛋白 (Caltag Laboratories) 检测结合的抗体。通过在柠檬酸缓冲液 pH 5 中的 O-苯二胺 (Sigma, St. Louis, Mo.) 和 H_2O_2 温育 30 min 进行显色。通过平板读取器 (Titertek Multiskan MCC 1340) 测定 492 nm 处的光密度 (OD)。各温育步骤之间以 PBST 成分洗涤平板。所有 ELISA 测试均包括 6 个对照血清, 随机选自从未暴露于疟疾的 100 个法国人血液供者。

为了确定 IgG1-4 亚型, 使用了单克隆小鼠抗人亚型 (克隆 NL16=IgG1 (Boehringer®)、HP6002=IgG2 (Sigma®)、Zg4=IgG3、而 RJ4=IgG4 (均来自 Immunotech®))。这些抗体分别按照 1:2,000、1:10,000、1:10,000、和 1:1,000 稀释于含 1.25% (w/v) 脱脂奶的 PBST 中, 并在室温温育 1 小时。缀合了过氧化物酶的山羊抗小鼠 IgG (Caltag Laboratories®) 以 1:3000 稀释于含 1.25% (w/v) 脱脂奶的 PBST 中, 加入该抗体并温育 1 小时。如上所述对结合的标记抗体进行观察。各个同种型特异性单克隆抗体 (MAb) 的稀释度是预先确定的, 这些稀释度可鉴别人的不同 Ig 亚型, 即各亚型之间不产生交叉反应 (Oeuvray, Theisen et al. 2000)。总 IgG 以及亚型抗体水平的结果被表示为抗体应答的比例, 这是通过将测试 OD 平均值除以同时进行实验的 6 个正常对照的平均值 + 3 SD 而计算的。比例 ≥ 1 的样品被认为是阳性的。

7.A.5. 统计学分析

采用 Mann-Whitney 的 U-检验和 Spearman 等级相关系数来计算 P 值。以 JMP®软件测试 1998 年间疟疾发病与抗体水平 (以比例表示) 之间的关联, 使用了 Poisson 回归模型 (其中对混杂因素例如年龄、性别、在村中度过的时间以及传播等进行了控制) 或逻辑回归分析 (有或没有发生疟疾发作)。

7.B. 结果

7.B.1. 研究人群中的恶性疟原虫感染

本研究的所有 116 个对象均来自东南亚缅甸的 OoDo 村, 该村是疟疾的高发病疫区 (Soe, Khin Saw et al. 2001)。恶性疟原虫血症的流行程度在 1998 年 1 月至 7 月间在 40%附近波动, 在 8 月至 12 月间降至 20%附近。临床疟疾的发病率按照该研究人群中每月发作的平均数而计算并以百分数表示, 其在全年的变化相当显著, 在 6 月达到高峰。尚未确定 OoDo 的感染性接种率, 不过, Tun-Lin, W et al (Tun-Lin, Thu et al. 1995) 发现一个村子中每人每年有 13.7 次感染性叮咬, 该村子位于 OoDo 村以东 15 km。这一发现与根据文献 (Beier, Killeen et al. 1999) 的方法计算出的每人每年 11 次感染性叮咬的数字十分符合。绝大多数感染 (98%) 是恶性疟原虫感染 (Soe, Khin Saw et al. 2001)。在为期 12 个月的临床观察期间, 116 个村民中的 86 例 (74%) 具有至少一次如材料和方法部分所定义的疟疾发作, 且这些个体被认为对疟疾易感。在相同的 12 个月期间, 村民中有 30 人 (26%) 没有出现临床疟疾发作, 这些个体被认为是在临床上被保护的。

7.B.2. 抗体对源自恶性疟原虫的 MSP3、GLURP、和 MSP1 抗原的识别

测定了 1998 年 9 月期间收集的 116 份血清中的针对 MSP3b₁₈₄₋₂₁₀ 肽 (MSP3b) 和代表 GLURP₂₇₋₅₀₀ (R0)、GLURP₄₈₉₋₇₀₅ (R1)、GLURP₇₀₅₋₁₁₇₉ (R2)、和 MSP1-19-kDa C-末端区域的 4 种重组蛋白质的 IgG 和 IgG 亚型的水平。R2 是被 IgG 抗体识别频率最高的抗原 (67.2%), 随后是 R1、MSP3b 和 MSP1 (均为 62%), 以及 R0 (58.6%)。最高的 OD 值是针对 R0 和 R2 产生的, 而 MSP3b 产生较低的 OD 值。针对所有三种 GLURP 区域和 MSP1 的 IgG 水平均与年龄显著相关 (R0, R1, R2 和 MSP1 的 Spearman 等级相关系数分别为 $R=0.51, 0.26, 0.41$ 和 $0.43, P<0.05$), 而针对 MSP3 的 IgG 应答与年龄无关 ($R=0.16, P=0.17$)。至于亚型应答, 针对 MSP1 的 IgG1 和 IgG4、针对 MSP3 的 IgG2、针对 R0 的 IgG1 和 IgG3、针对 R1 的 IgG2 和 IgG3、以及针对 R2 的 IgG4 均与年龄显著相

关 (表 3)。对于任何一种测试抗原，阳性抗体应答的水平或流行程度在性别间均没有不同。

抗原	IgG 亚型	<i>P</i>	<i>R</i>
MSP1	IgG1	0.0002	0.344
	IgG4	0.0009	0.309
MSP3	IgG2	0.0090	0.242
GLURP 抗原			
R0	IgG1	0.0220	0.213
	IgG3	0.0040	0.268
R1	IgG2	0.0040	0.268
	IgG3	0.0008	0.313
R2	IgG4	0.0140	0.231

表 3. 年龄与针对各种测试抗原的亚型抗体应答水平之间的关系。*P* 和 *R* 值是通过 Sperman 等级相关系数而计算的。

7.B.3. 抗体应答和临床保护

观察到针对三种不同抗原的 IgG 亚型应答和保护性存在显著的不同 (表 4)。例如，针对 MSP1 的 C-末端 19-kDa 片段的 IgG 应答几乎完全是 IgG1 亚型，其在被保护组中的中位数是易感组的 8.6 倍，而被保护个体中针对 MSP3b 表位的主导性 IgG3 抗体的中位数是易感个体中的 6.5 倍。尽管不是那么显著，但是观察到针对 GLURP 的不同区域的嗜细胞 IgG 亚型应答、针对非重复 R0 区域的主导性 IgG1 抗体、以及针对 R2 重复区域的主导性 IgG3 抗体，也具有相似的差异性。

抗原	IgG 亚型	被保护组 (n=30)	易感组 (n=86)	P 值	差异倍数
MSP1	IgG1	9.5 (0.8-25.03)	1.1 (0.5-8.22)	.003 #	8.6
	IgG2	0.9 (0.8-1.26)	0.9 (0.8-1.09)	>.05	
	IgG3	0.9 (0.1-2.63)	0.4 (0.0-0.81)	>.05	
	IgG4	1.2 (0.8-3.01)	1.0 (0.7-1.47)	.01	
MSP3	IgG1	1.4 (0.8-2.4)	0.7 (0.4-7.0)	<.001*	2.0
	IgG2	1.1 (0.9-1.57)	0.8 (0.7-1.0)	>.05	
	IgG3	6.5 (2.5-14.03)	1.0 (0.6-1.49)	<.001*	6.5
	IgG4	1.3 (1.0-1.82)	1.0 (0.9-1.35)	<.001*	1.3
R0	IgG1	3.9 (2.4-7.62)	1.8 (1.0-3.15)	<.001*	2.2
	IgG2	0.9 (0.4-2.5)	0.8 (0.4-1.33)	>.05	
	IgG3	1.3 (0.6-3.76)	0.9 (0.3-1.44)	.019	
	IgG4	0.2 (0.2-2.05)	0.6 (0.2-1.07)	>.05	
R1	IgG1	0.3 (0.1-0.9)	0.2 (0.1-0.4)	>.05	
	IgG2	0.9 (0.4-1.64)	0.6 (0.4-0.91)	>.05	
	IgG3	1.2 (0.4-2.64)	0.5 (0.2-0.91)	.039	
	IgG4	0.2 (0.2-0.52)	0.7 (0.2-0.94)	.021	
R2	IgG1	2.0 (0.9-5.4)	1.1 (0.3-3.11)	.01	
	IgG2	2.0 (1.0-4.02)	0.9 (0.2-1.73)	<.001*	2.2
	IgG3	6.4 (1.7-12.01)	0.9 (0.3-2.83)	<.001*	7.1
	IgG4	1.0 (0.6-1.2)	0.6 (0.4-0.85)	.003	

表 4. 在 OoDo 村民中观察到的针对 MSP1、MSP3 和 GLURP 抗原的 IgG 亚型抗体的中位水平 (以及四分位距), 这些村民经过 1 年的积极和连续的随诊被认为对于恶性疟原虫疟疾发作是得到保护的或者是易感的。鉴于进行的统计学检验的数量, 施加了 Bonferroni 校正因子以确定显著性水平, 只有 P 值 $< .0025$ 才被视为具有限制性 (*). 自非参数 Mann-Whitney U 检验确定 P 值。差异倍数代表来自两组的中位数的比例。# 代表具有边缘差异的数值。

由于针对 GLURP 和 MSP1 的抗体滴度作为年龄的函数而增加, 对村民的临床状态与不同抗体的相关性进行了重复检测, 采用的是逻辑回归模型, 并将年龄和所有抗体应答 (log 转换) 视为解释性变量。当在该模型中检验这些参数, 且特别是当对年龄进行控制时, 所有抗体应答中被认为是最强的疟疾保护性预测因素是针对 MSP3b (F 比例 = 67.5; $P < 0.0001$) 和针对 GLURP-R0 (F 比例 = 23.1; $P < 0.0001$) 的 IgG3 水平的升高。其他抗体与保护作用的相关性不显著。与此不同, 该分析提示针对 R0 (F 比例 = 4.4; $P = 0.038$) 和 R1 (F 比例 = 3.9; $P = 0.051$) 的 IgG4 水平随疟疾发作的次数而升高, 即所述抗体在某种意义上代表了对疟疾的易感性。

7.B.4. 被保护的村民中的 IgG3 应答的抗原特异性

图 14A 所示为针对 OoDo 的不同血液期抗原的 IgG3 抗体应答的一般模式。大多数抗原特异性抗体应答的数值范围很大, 这说明可能存在不同亚组的“应答者”。那些得到保护而免于临床疟疾的村民的血清并不都具有针对 MSP3b 和 GLURP-R0 的高 IgG3 值。一些个体针对这两种抗原之一的 IgG3 反应性出乎预料得低。为试图了解这些村民是如何得到保护而免于疟疾攻击的, 鉴定了两个亚组, 其特征在于: a)- 针对 MSP3 的低 IgG3 应答 (30 例中有 7 例) 或 b)- 针对 R0 的低 IgG3 应答 (30 例中有 15 例)。评估了针对其他三种抗原的 IgG3 抗体水平 (图 14B)。这 7 个对 MSP3b 具有低 IgG3 应答 (IgG3 比例 = $1.26 \pm .22$) 的被保护的个体 (平均年龄 ± 1 标准差 = 33.9 ± 7.0 岁) 被发现对 R0 (IgG3 比例 = 9.09 ± 3.41) 和对 R2 (IgG3 比例 = 8.36 ± 5.86) 具有强 IgG3 应答。在第二亚组的 15 个其他个体 (24.7 ± 4.3 岁) 中, 尽管对 GLURP-R0 具有低 IgG3 应答 (IgG3 比例 = $0.55 \pm .08$), 但同样得到了保护, 在这些个体中发现了相反的情况 (图 14C): 观察到了对 MSP3b 的高 IgG3 应答 (IgG3 比例 = 10.45 ± 2.07) 和较其稍低一些的对 GLURP-R2 的应答 (IgG3 比例 = $4.43 \pm .80$)。仅应答于一种抗原的抗体的滴度倾向于高于应答于两种抗原的滴度 (表

4)。在 OoDo 村中度过的年数在两组对 MSP3 (居住 20.43 ± 4.70 年) 和 R0 (居住 18.7 ± 10.6 年) 的低应答者之间没有明显的不同。

在 30 个被认为在 1998 年得到保护的个体中有 13 个在 1993 年也取得过血清样品, 因此可用于比较间隔 5 年前后的抗 MSP3 和抗 R0 IgG1 和 IgG3 抗体的相对水平。如图 14D 和 14E 所示, 针对这两种抗原的特异性 IgG1 抗体的水平没有可检测到的明显变化。相反, 针对 MSP3 和 GLURP 的 IgG3 抗体水平从 1993 年至 1998 年是升高的。在一个亚组的 7 个个体中, 针对 MSP3 的 IgG3 在 1998 年是升高的 (Fig 14D), 其差异相当于 1.67 倍的升高 ($P=.11$)。在一个亚组的 6 个个体中, 针对 R0 的 IgG3 在 1998 年是升高的 (Fig 14E), 其差异相当于更为显著的、3.93 倍的升高 ($P=.05$)。在 1998 年具有针对 MSP3 的高 IgG3 应答的这 6 个个体在 5 年前同样具有高滴度, 这提示他们在 1993 年便已经通过持久的抗 MSP3 的 IgG3 应答而得到保护, 当时他们的年龄为 18.2 ± 9.8 岁。相反, 在 1998 年可检测到对 GLURP 具有强抗 R0 IgG3 应答的 7 个个体, 在 5 年前具有明显较低的抗 R0 IgG3 应答 ($P=0.0157$), 当时他们的年龄为 23.7 ± 6.9 岁。因此, 在 1998 年通过针对 R0 的 IgG3 而得到保护的这 7 个个体发生了巨大的变化, 而他们 5 年前的保护作用可能与针对 MSP3 的 IgG3 有关。

7.C. 讨论

本研究首次说明在抗原特异性抗体应答与保护免于遭受东南亚临床疟疾之间存在关联。针对 GLURP 和 MSP3 的阳性抗体应答的流行程度在 OoDo 很高, 在 58.6 % (R0) 至 67.2% (R2) 的范围内。与这一观察相一致的是, 发现了 GLURP 和 MSP3 中的 B 细胞表位在恶性疟原虫实验室株和来自非洲和亚洲的野生分离株中是高度保守的 (Huber, Felger et al. 1997),(McColl and Anders 1997; de Stricker, Vuust et al. 2000)。针对 MSP1-W-19 的抗体的流行程度也是高的, 几乎是冈比亚和塞拉利昂

(Egan, Morris et al. 1996) 和加纳 (Dodoo, Theander et al. 1999) 的两倍, 提示在 OoDo 流行的可能是与 Wellcome 株有关的株。

最高的 ELISA 滴度针对的是重组 GLURP R0 区域和 R2 区域以及 MSP1。GLURP-R0、-R1、-R2 和 MSP1 ELISA 滴度之间的差异很可能反映了血清抗体反应性的差异。相反, MSP3-ELISA 给出相对低的信号, 不过这种不同之处可能至少部分是由于使用了短合成肽, 其仅限定一个或有限的表位, 而对于重组蛋白质如 GLURP 和 MSP1, 已知其限定了多个表位 (Theisen, Soe et al. 2000)。

针对所有 GLURP 区域和 MSP1 的 IgG 的水平与年龄显著相关 ($P < 0.05$), 而与此相反的是, 针对 MSP3 的 IgG 应答被发现与年龄无关。关于 IgG 亚型应答, 也发现其中一些明显与年龄有关, 这些变化可能反映了暴露于疟疾寄生虫的过程以及免疫系统随时间逐渐成熟的过程。

与生活在 OoDo 的未得到保护的个体相比, 得到保护的个体中的针对 R0 和 MSP3 的 IgG3 的水平升高具有统计学的显著性。这些结果与 Dodoo et al. (Dodoo, Theisen et al. 2000) 的结果一致, Dodoo 发现针对 R0 和 R2 的嗜细胞抗体应答是加纳儿童中获得保护作用的强预示因素, 这些结果还与 Oeuvray et al. 的结果一致, Oeuvray 发现在西非的 Dielmo 地区, 针对 GLURP-R0 和 R2 的 IgG3 升高与保护作用之间存在稳定的关联 (Oeuvray, Theisen et al. 2000)。相似地, 此前已经发现 MSP3 特异性 IgG3 应答与 Dielmo 的抗临床疟疾的保护作用相关。总之, 这些结果提示, 针对相同的关键表位的相同亚型的 IgG 应答参与了在生活在疟疾疫区的非洲和亚洲人群中逐渐产生抗恶性疟原虫疟疾的保护作用。此外, 本研究发现, 在针对 R0 和 R1 的非嗜细胞抗体水平与临床保护之间存在显著的负相关。因此, 在一方面, 嗜细胞 IgG 亚型应答与保护作用之间存在正相关, 而另一方面, 具有相同的表位特异性的非嗜细胞亚型应答与保护作用之间存在负相关。与这种流行病学结果相一致的是, 在体外

发现，非嗜细胞抗体能够抑制针对相同抗原性靶位的嗜细胞抗体在裂殖子与人类单核细胞之间的桥梁作用，并由此降低后者通过 ADCI 机制控制寄生虫增殖的能力 (Bouharoun-Tayoun and Druilhe 1992)。

尽管大多数得到保护的 OoDo 居民具有针对 MSP3 和 GLURP 的高 IgG3 应答，但一些针对这些抗原之一仅具有低 IgG3 应答或甚至不具有 IgG3 应答的个体似乎同样获得了保护。本发明人发现，所有具有低 GLURP-R0 特异性 IgG3 应答而获得保护的个体具有显著升高的特异性抗 MSP3 的 IgG3 抗体水平，且反之亦然。这一发现提示，针对 GLURP 和 MSP3 的抗体可以互补的方式来控制免疫个体体内的寄生虫的增殖。考虑到这些抗体在 ADCI 机制中的作用，这一认识是合理的。实际上，只有同时评价多种抗原才能揭示这种互补作用。这一发现有利于同时测试多种抗原的互补作用以及可能的拮抗作用，以便设计组合疫苗。

总之，本研究发现，(1)- MSP3 和 GLURP 抗原中最为保守的关键表位是全世界地理位置上相距遥远的疫区的保护性抗体的靶位。(2)- 针对 MSP3 和 GLURP-R0 的 IgG3 抗体是免于遭受非洲同时也是亚洲的临床疟疾的保护作用的最强预示因素。(3)- 在非洲以及亚洲，达到带虫免疫需要产生针对关键抗原 (即 MSP3b 和 GLURP，其均诱导在 ADCI 中具有活性的抗体) 的嗜细胞抗体亚型。(4)- 这两种抗原之间似乎存在互补作用。对于抗疟疾发作的风险而言，IgG3 应答可能具有相似的作用，条件是当针对其他抗原的应答是低的或几乎缺乏时，仍存在针对一种抗原的应答。(5) - 对给定抗原的不同 B 细胞靶位的应答似乎独立地产生，且识别的水平可随时间而改变。

针对迄今为止鉴定到的 ADCI 的两种主要靶位的应答的互补性为将这两种抗原在混合疫苗配制品中进行组合提供了第一个理论基础。此外，以混合疫苗在临床前动物模型上进行的免疫原性研究，通过显示具有针对各个分子的、均衡相称的应答的改善的免疫原性，进一步支持这一抗原组合。

实施例 8: 鉴别由生物学活性抗体所针对的恶性疟原虫 MSP3 的保守区域以改善疫苗设计

本实施例中, MSP3 指的是 MSP3-1。

裂殖子表面蛋白-3 (MSP3) 是抗体依赖性细胞抑制 (ADCI) 的靶位, ADCI 是在对恶性疟原虫疟疾具有免疫力的人中观察到的一种保护机制。从该分子具有高度保守性的 C-末端一侧选择了 6 种重叠的肽来表征免疫应答。这 6 种肽的每一种均具有至少一种非交叉反应性 B 细胞表位。不过, 在疫区的居民中观察到在水平和 IgG 亚型分布这两方面模式均不同的抗体应答。针对每一种肽的亲纯化的抗体就其在 ADCI 分析中介导杀死寄生虫的功能方面是不同的: 这 6 种重叠肽中的 3 种具有明显的寄生虫生长抑止作用。通过将抗 MSP3 抗体体内被动转移至感染了恶性疟原虫的免疫缺陷 BXN 小鼠模型进一步证实了这一结果。在这 3 种被研究的肽的每一种中均鉴定到了 T 辅助细胞表位。因此, 抗原性和功能性分析共同将 MSP3 的一个 70 个氨基酸的保守结构域鉴定为生物学活性抗体的表位, 准备及其纳入将来的基于 MSP3 的疫苗构建体中。

疟疾寄生虫的血液期增殖是导致人出现疟疾急性症状的原因。流行病学观察已经发现, 居住于疫区的成年人虽然不断被感染并经常携带寄生虫, 但能够控制其寄生虫血症, 且相对于儿童而言具有明显的临床抵抗力 (Baird J K, Jones TR, Danudirgo EW, et al, 1991)。要获得这种水平的抗病免疫力, 需要反复的感染和持续暴露于寄生虫 (McGregor IA, Wilson, RJM., 1989)。天然获得的抗病免疫状态是一种被称为带虫免疫的现象 (Sergent E, Parrot L., 1935) 而并非消除性免疫, 其特征慢在于慢性低度寄生虫血症而无临床症状。

被动转移来自临床免疫个体的血清免疫球蛋白 (IgG) 被证明能够控制那些因暴露于地理上不同的寄生虫株而不被保护的个体的疾病和寄生

虫血症的水平 (Cohen S, McGregor IA, Carrington S., 1961; Edozien JC, Gilles HM, Udeozo IO., 1962; Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, et al., 1991)。我们此前发现, 保护性 IgG 对于寄生虫的侵袭和红细胞内生长没有重要的直接作用, 但可与血液中的单核细胞联合起作用, 通过抗体依赖性细胞抑制 (ADCI) 机制而抑制寄生虫的发展 (Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P., 1990)。保护性 IgG 的嗜细胞特性已经得到确认 (Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P., 1992; Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P, 1992), 其他的独立研究也已经证实这些抗体在抗疟疾保护作用中的重要性 (Oeuvray C, Theisen M, Rogier C, Trape JF, Jepsen S, Druilhe P., 2000; Groux H, Gysin J., 1990)。

我们采用 ADCI 作为功能性分析来搜索这些保护性抗体的靶位, 由此, 我们将 MSP3 鉴定为一种这样的靶位 (Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Gras-Masse H, et al, 1994)。MSP3 与裂殖子表面分子可能是通过卷曲螺旋结构相结合, 预测此类结构是由七重复序列和 C-末端亮氨酸拉链结构域形成的 (Mills KE, Pearce JA, Crabb BS, Cowman AF., 2002)。组成该分子的 N-端部分的区域在不同株之间具有多态性。相反, 该分子的 C-末端部分在所测试的各种寄生虫分离株之间是高度保守的 (McColl DJ, Anders RF., 1997; Huber W, Felger I, Matile H, Lipps HJ, Steiger S, Beck H., 1997), 且此前通过采用功能性 ADCI 分析筛选恶性疟原虫表达文库所鉴定到的区域正是这个区域 (Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Gras-Masse H, et al, 1994)。以往对 MSP3 的研究仅仅集中在 C-末端部分的 27 个氨基酸的区域 (相应于 3D7 株的 184-210 位氨基酸, MSP3b), 以前已经将其鉴定为高免疫血清中保护性抗体应答的靶位 (Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Gras-Masse H, et al, 1994)。

我们决定进一步表征该分子的 C-末端部分中其他区域的抗原性。我们设计了 6 种重叠肽 (MSP3a、MSP3b、MSP3c、MSP3d、MSP3e 和

MSP3f) (图 24 和 25), 其各自代表该分子的保守性 C-末端部分的不同区域。使用它们来分析来自塞内加尔疫区村庄 Dielmo 的个体中的天然产生的免疫应答, 以及它们与抗疟疾攻击的保护作用的潜在关系。在体外条件下的 ADCI 分析中评价了特异于各个区域的人抗体的功能性作用, 且通过在植入了感染恶性疟原虫的人 RBC 的免疫缺陷小鼠模型中进行体内被动转移而进一步证实了这种作用 [Badell E, Oeuvray C, Moreno A, et al, Med 2000; and Moreno A, Badell E, van Rooijen N, Druilhe P. Chemother 2001]。

采用这一方法, 我们将 MSP3 的一个 70 个氨基酸的区域鉴定为天然产生的保护性抗体应答的靶位。

8A – 材料与方法

抗原

MSP3 重组蛋白质构建体和肽是基于恶性疟原虫 3D7 株序列而设计的 (NCBI protein_id="NP_700818.1")。按照先前所述 [Theisen M, Vuust J, Gottschau A, Jespen S, Hogh B. 1995] 纯化了两种重组的标记了六组氨酸的蛋白质, MSP3-NTHis₂₁₋₁₈₄ 和 MSP3-CTHis₁₉₁₋₃₅₄。6 种肽 MSP3a₁₆₇₋₁₉₁、MSP3b₁₈₄₋₂₁₀、MSP3c₂₀₃₋₂₃₀、MSP3d₂₁₁₋₂₅₂、MSP3e₂₇₅₋₃₀₇ 和 MSP3f₃₀₂₋₃₅₄ 相应于 MSP3 C-末端区域的保守区域。一个小区域 (氨基酸 253-274; 72%谷氨酸) 被排除在该分析以外, 这是由于富含谷氨酸的抗原决定簇在多种不同的恶性疟原虫抗原中具有交叉反应性 [Mattei D, Berzins K, Wahlgren M, et al, 1989]。根据标准的肽合成方法合成这些肽 [Roggero MA, Servis C, Corradin G. 1997]。

人血清和淋巴细胞样品

我们依赖于来自象牙海岸的 30 个高免疫个体的血清对特异于各个 MSP3 区域的抗体进行亲和纯化, 这些血清以前曾经在泰国疟疾患者中

被用于进行被动转移实验，并发现其能够有效地控制所述患者的疾病和寄生虫血症 [Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, et al. 1991]。

我们依赖于来自西非塞内加尔 Dielmo 村的 48 名常住居民的血浆样品进行免疫流行病学研究，这些居民曾不同程度地暴露于疟疾（年龄在 3.5 至 53.4 岁之间；平均年龄 = 13.1 ± 1.8 岁；在 730 天的随诊期间平均有 707 天居住在村内）。该地区的疟疾传播情况严重且为全年性（ ≈ 200 次感染性蚊子叮咬/人/年），2 年期间，疟疾发作的平均数量为每人 2.4 ± 5.4 次。在随后的 2 年中，19 名个体没有疟疾发作（平均年龄 15.7 ± 3.1 岁），而 29 名个体具有至少一次疟疾发作（平均年龄 11.4 ± 2.2 岁）。医生每天对全部 Dielmo 居民的发热情况进行积极随诊，并根据文献所述对那些因疟疾引起的发热做出准确诊断 [Trape JF, Rogier C, Konate L, et al, 1994]。这使得在本研究为期 2 年的随诊过程中，个体被清楚地区分为“被保护的”（无疟疾发作）或“未被保护的”（ ≥ 1 次疟疾发作），由此我们能够调查这些个体中针对 MSP3 的不同区域的 IgG 同种型应答的模式。这一组在有疟疾发作或无疟疾发作的年龄分布方面是全村的代表。

来自 Dielmo 居民的单个核细胞被在 4 小时内带回达喀尔的实验室，并用于针对 MSP3a、MSP3b 和 MSP3c 的 T 细胞增殖和 IFN- γ ，方法如文献所述 [Behr C, Sarthou JL, Rogier C, et al, 1992; and Bottius E, BenMohamed L, Brahimi K, et al, 1996]。简言之，对细胞的增殖应答的评价在 96 孔圆底培养板 (Nuncclon®) 设置 4 个复孔，将细胞在 37°C、5% CO₂、存在各种肽（使用的浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ ）的条件下培养 6 天，随后加入 1 μCi 的 [³H] TdR 过夜，使用液体闪烁计数器计算掺入的放射性。未刺激的培养物作为阴性对照，PPD 和 PHA 作为阳性对照。以捕获 ELISA 分析测定来自 4 个复孔的合并上清液中的 IFN- γ 浓度，实验以双份进行，分别使用抗人 IFN- γ mAb 350B10G6 和生物素标记的 mAb 67F12A8 (Biosource) 进行包被和显色，按照生产商的说明进行。显色反应使用链霉抗生物素-HRP 和 TMB 发色团，在 450 nm 测定光密度。考

虑到实际的因素，主要是自每个供者所能得到的细胞数，对用于抗体分析的其他3种肽没有进行T细胞分析。以来自61个居民(29个女性，32个男性，平均年龄27.31岁)的样品进行淋巴增殖研究，研究了其中31个居民的IFN- γ 分泌(19个女性，12个男性，平均年龄33.94岁)。发现这3种肽在16个未暴露于疟疾的对照供者的PBMC中不诱导明显的应答(数据未显示)，这说明它们不具有促有丝分裂或超抗原作用。

酶联免疫吸附试验(ELISA)

按照先前所述进行本试验以检测总IgG个亚型[Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. 1992; and Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. 1992]。根据对非洲人同种抗免疫球蛋白(allotypes)的亲合力和反应性选择单克隆小鼠抗人亚型IgG1至IgG4{克隆NL16(Boehringer)、HP6002(Sigma)、Zg4(Immunotech)、和RJ4(Immunotech)}，并用作第二抗体，分别按照1/2000, 1/5000, 1/5000, 和1/1000进行稀释。

通过用针对测试抗原的OD值减去针对对照蛋白质(BSA; 0.25 μ g/孔)的OD值得到各血清的特异性反应性。为计算抗体应答的显著性域值，自从未暴露于疟疾的个体中随机选择一组8份血清，针对各抗原进行测试，用作对照。结果以来自测试血清的平均OD与对照血清的平均OD + 3X对照血清的标准差之间的比例表示。比例>1的血清被认为是阳性。

抗体的亲和纯化

由于ADCI分析需要抗体与Fc- γ RII受体的协作[Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. 1990]，因此首先针对不同的MSP3肽和重组体对来自象牙海岸的一组30份高免疫血清进行IgG分布的筛选。选择血清用于对针对任何给定的MSP3构建体的抗体进行亲和纯化，依据的是针对该区域具有高反应性而对邻近的肽具

有最小的反应性且具有高含量的嗜细胞 IgG 抗体 (IgG1+IgG3)。使用独立的血清库 (每一个由 5 至 7 份个体血清样品构成) 来亲和纯化针对 MSP3 的不同区域的抗体。所使用的血清库的嗜细胞与非嗜细胞 IgG 亚型的比例 (IgG1+IgG3/IgG2+IgG4) 为 9.56 (MSP3NT)、4.25 (MSP3CT)、1.29 (MSP3a)、3.86 (MSP3b)、1.29 (MSP3c)、4.58 (MSP3d)、1.59 (MSP3e) 和 3.68 (MSP3f)。先前的研究发现, 在亲和纯化的抗体中观察到的嗜细胞抗体的模式与用于亲和纯化的血清库的模式相似。

按照先前文献所述进行亲和纯化 [Brahimi K, Perignon JL, Bossus M, Gras H, Tartar A, Druilhe P. 1993], 使用 2.5% 聚苯乙烯珠 (平均直径 10 μ m, Polysciences, Ltd.) 的水性悬液包被肽或重组蛋白质。使用 0.2 M 甘氨酸 pH 2.5 洗脱特异性抗体, 并立即用 2M 的 Tris 水溶液中和至 pH 7.0。以 PBS 继以 RPMI 对亲和纯化的抗体进行充分透析, 并以 Centricon 浓缩器 (Millipore) 进行浓缩, 滤膜滤过除菌, 加入 1% albumax (Gibco, BRL) 后存放于 4°C。

使用浓度为 10 μ g/ml 的亲和纯化的抗体进行 ELISA 以确定其特异性和同种型分布。

免疫荧光分析 (IFA)

由于抗体识别天然寄生虫蛋白质的能力是生物学分析的关键因素, 因此采用 IFA 来调整亲和纯化的抗体的浓度。按照先前文献所述 [Druilhe P, Khusmith S. 1987], 在风干的丙酮固定的恶性疟原虫成熟裂殖体薄层涂片上进行 IFA, 以评价亲和纯化的抗体与寄生虫蛋白质的结合活性。各个抗体的有效浓度被调整至 1/200 IFA 终点滴度用于功能性分析。

抗体的体外功能性分析

采用实验室维持株 3D7 和 UPA (Uganda Palo-Alto), 如先前文献所述 [Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. 1990], 按双份进行抗体依赖性单核细胞介导的 ADCI 分析。如先前文献所述 [Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. 1990] 制备来自健康的、未暴露于疟疾的供者的单核细胞。调整亲和纯化的抗体的浓度以产生 1/200 IFA 终点滴度, 在 90 μ l 完全培养基中加入 10 μ l 上述抗体, 即使用的最终滴度是 ADCI 分析中的 1/20。培养 96 小时后, 通过在来自各孔的以 Giemsa 染色的薄层涂片中镜检 $\geq 50,000$ 个红细胞而确定寄生虫血症。单核细胞依赖性寄生虫抑制被表示为特异性生长抑制指数 (SGI): $SGI = 1 - \{(\text{加入单核细胞和测试 IgG 的寄生虫血症百分数} / \text{加入测试 IgG 的寄生虫血症百分数}) / (\text{加入单核细胞和正常 IgG 的寄生虫血症百分数} / \text{加入正常 IgG 的寄生虫血症百分数})\} \times 100$ 。尽管计算 SGI 考虑到了可能存在单核细胞直接抗寄生虫的作用, 但由于仅仅在 10-15% 的单核细胞制剂中观察到这种情况, 因此我们没有将具有直接抗寄生虫作用的单核细胞制剂作为一种额外的安全措施。

对感染了恶性疟原虫的免疫缺陷小鼠进行被动免疫接种

使用 *P.f.*-HuRBC-BXN 小鼠模型来评价针对恶性疟原虫的不同的血液期抗原的抗体的作用在先前的文献中已有详述 [Badell E, Oeuvray C, Moreno A, et al, 2000]。以含有二氯亚甲基二磷酸酯 (Cl_2MDP) (Roche Diagnostics Mannheim, Germany) 和抗分叶核中性粒细胞 (PMN) 单克隆抗体 NIMP-R14 (NIMR, London, UK) 的脂质体处理无病原体条件下饲养的 6-8 周龄雄性 Beige-Xid-Nude (BXN) 小鼠 (Charles River Laboratories) 以降低其天然免疫应答。在第 0 天经 IP 注射感染了恶性疟原虫的人红细胞并以 4 天的时间间隔注射未感染的红细胞。以显微镜检查监测血液的寄生虫血症。给出现稳定的寄生虫血症 (范围在 0.1-1%) 的小鼠 IP 植入 3×10^6 个经 CD14^+ 磁珠主动选择的人外周血单核细胞 (MACS, Miltenyi

Biotech), 24 小时后植入 3×10^6 单核细胞以及 200 μl 的上述 1/200 IFA 终点滴度的针对 MSP3 的亲纯化抗体。非特异性酯酶染色 [Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. 1990] 显示 >98% 的 CD14⁺ 细胞由单核细胞构成。

统计学分析

采用 Mann-Whitney U 检验进行单变量分析。Fisher 精确检验用于列联表分析。疟疾发作的风险与抗体水平之间的关联通过 JMP® 软件进行测试, 使用逐步回归模型, 其中对年龄的混杂作用进行了控制。在回归模型中使用方差分析。对无效假设的检验基于以 F 表示的方差比, 而来自无效假设的偏差用于给超过一致性 (unity) 的 F 赋值。

8B – 结果

由 6 种 MSP3 C-末端肽的每一种所定义的非交叉反应性 B 细胞表位在来自象牙海岸的一组 30 份高免疫血清中测定针对不同 MSP3 C-末端区域的 IgG 应答。如图 20 所示, 针对各个区域的 IgG 水平和流行程度是不同的, 但针对各个 C-末端肽均检测到抗体应答。

自特异于各个肽的选定的高免疫血清中亲和纯化抗体, 并研究这些抗体对其他肽的反应性。这样可以亲和纯化出对各个肽具有特异性而与其他区域不具有交叉反应性的抗体 (表 5)。这些发现说明, 覆盖 MSP3 C-末端的肽中的每一种均定义了至少一个与其他区域不具有共同抗原决定簇的 B 细胞表位。还发现每一种亲和纯化的抗体在对恶性疟原虫的无性血液期的免疫荧光分析中均是阳性的, 说明抗肽抗体对天然的寄生虫蛋白质具有反应性 (数据未显示)。

针对不同 MSP3 肽的 IgG 应答的不同同种型模式

我们分析了来自塞内加尔的疫区 Dielmo 村的 48 名 3 至 53 岁的个体的血浆，以研究针对由这些肽所定义的 MSP3 的 C-末端部分的不同区域的 IgG 同种型应答的分布和模式。

如图 21 所示，针对各个肽的抗体应答的水平和 IgG 同种型的模式均是不同的。针对 MSP3 的各个区域的应答者的流行程度是不同的 (IgG1 为 6.25%至 60.41%，IgG3 为 4.16%至 47.91%，IgG2 为 0%至 10.41%，而 IgG4 为 0%至 12.5%)。我们发现针对 MSP3a 和 MSP3e 的抗体的流行程度较低，且如果存在也仅能检测到低水平。针对 MSP3b、MSP3c、MSP3d 和 MSP3f 的抗体最为流行，且主要是嗜细胞亚型。在嗜细胞同种型中，IgG3 反应性被发现在针对 MSP3b、MSP3c 和 MSP3d 方面具有主导性。相反，针对 MSP3f，则是 IgG1 反应性较 IgG3 更加强且流行程度更高。这提示针对 MSP3 的任何区域所引发的抗体应答不依赖于针对其他区域的应答。

先前已经发现嗜细胞 IgG 应答在抗疟疾的保护作用中具有重要作用 [Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. 1992; Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. 1992; Oeuvray C, Theisen M, Rogier C, Trape JF, Jepsen S, Druilhe P. 2000; Groux H, Gysin J. 1990]。我们进一步研究了每天所监测的临床保护作用与所观察到的针对各个肽的同种型应答模式之间的关联。在本研究中，“保护作用”被定义为在进行血浆取样后的 2 年中不出现任何临床疟疾发作。相对于未得到保护的个体，在得到保护的个体中观察到存在更高的针对 MSP3b、MSP3c 和 MSP3d 的 IgG3 滴度。发现在针对 MSP3b 以及 MSP3d 的 IgG3 抗体水平与抗疟疾发作的保护作用之间存在关联（‘p’分别为 0.037 和 0.057）。对于 MSP3c，这种关联没有达到统计学上的显著性，不过，无疟疾发作的个体中的抗 MSP3c IgG3 抗体是有发作者的两倍。IgG1 水平与抗疟疾发作的保护作用之间的关联在 MSP3d ($p=0.025$) 具有显著性，在 MSP3b 也观察到了相似的趋势 ($p=0.328$)，但在 MSP3c 没有。针对 MSP3f 的 IgG1 和 IgG3 应答均未发现与保护作用

相关。仅检测到低水平的针对 MSP3 不同区域的 IgG2 和 IgG4 抗体应答，且未发现其与保护作用相关。

下一步，进行多变量逐步回归分析以控制年龄，抗体应答（分为“应答者”或“非应答者”）和出现疟疾发作（分为“被保护的”或“未被保护的”）均采用二分变量。针对 6 种肽中的 3 种观察到保护作用与 IgG3 抗肽应答之间具有显著的关联：MSP3b (F 比例 = 4.98, $p=0.025$)、MSP3c (F 比例 = 3.02, $p=0.082$) 和 MSP3d (F 比例 = 6.57, $p=0.01$)，而针对其他 3 种肽则没有。

天然产生的针对 MSP3b、MSP3c 和 MSP3d 的抗体在功能性体外 ADCI 分析中的寄生虫生长抑止作用

为了评价天然产生的针对 MSP3 的不同区域的人抗体在 ADCI 分析中的功能，将各种亲和纯化的抗体的浓度调整至针对天然寄生虫蛋白质可产生相同的反应性的浓度。结果 (图 22) 显示，由针对重组蛋白质 MSP3NT 和 MSP3CT 的抗体所引发的寄生虫抑制水平与在非洲人 IgG 库 (PIAG) 所观察到的水平相当，PIAG 先前已经用于在人类进行被动转移实验 [Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, et al. 1991]。

针对 MSP3b、MSP3c 和 MSP3d 的亲合纯化的抗体被发现在 ADCI 中产生强烈的单核细胞介导的抗寄生虫活性，该活性与针对 MSP3CT 的抗体和 PIAG 相当，不过，未发现抗 MSP3a 和抗 MSP3f 抗体具有寄生虫抑制活性 (图 22)。抗 MSP3e 抗体仅显示出临界的抗寄生虫活性，即略微高于显著性的域值水平。在 4 个独立的 ADCI 分析中，结果具有可重复性。在 24 至 96 小时，上述任何抗体在所使用的浓度均未记录到抑制裂殖子侵袭的作用。

抗 MSP3b 和抗 MSP3d 抗体在人源化小鼠模型中强烈降低恶性疟原虫寄生虫血症

在体外 ADCI 分析中观察到, 抗 MSP3b、MSP3c 和 MSP3d 抗体对抑制寄生虫生长很有效, 使用 *P.f.*-HuRBC-BXN 小鼠模型在体内对其进一步评价。最近已经证实了这种新的小鼠模型在对人类抗体和抗疟疾药物对恶性疟原虫血液期生长的作用进行体内研究中的价值 [Badell E, Oeuvray C, Moreno A, et al, 2000; and Moreno A, Badell E, van Rooijen N, Druilhe P. 2001]。不过, 由于处理这种新的模型有难度, 因此只有那些在体外条件下被发现具有明显的抗寄生虫作用的抗体才被用于被动转移实验进行体内评价。将针对 MSP3d 的抗体与针对 MSP3b 的抗体相比较, 后者在此用作阳性对照, 其抗寄生虫作用先前已经得到证实 [Badell E, Oeuvray C, Moreno A, et al, 2000]。

如图 23 所示, 寄生虫血症升高并在接下去的 3 周中达到平台。在第 22 天单独注射外周血单核细胞不影响寄生虫生长, 这与先前的发现一致 [Badell E, Oeuvray C, Moreno A, et al, 2000]。在第 23 天注射亲和纯化的抗 MSP3 人抗体导致寄生虫血症显著降低。被动转移抗 MSP3b 抗体导致寄生虫被清除。被动转移抗 MSP3d 导致降低超过 95% (图 23)。因此, 在这种小鼠模型中进行的体内被动转移的结果证实了体外研究的结果, 并进一步确认了针对被 MSP3b 和 MSP3d 肽所覆盖的 70 个氨基酸区域的天然产生的抗体的功能性抗寄生虫活性。

暴露于疟疾的个体中的针对 MSP3 肽的 T 细胞应答

由于受到场地的实际限制, 仅能够研究针对来自塞内加尔 Dielmo 村居民的 6 种 C-末端肽中的 3 种 (MSP3a、MSP3b and MSP3c) 的 T 淋巴细胞应答。使用来自 61 个居民 (年龄 1 至 84 岁, 平均年龄 27.34 岁) 的外周血淋巴细胞确定的增殖应答显示, 针对 MSP3a 的 T 辅助细胞应答者的流行程度为 16.4%, 针对 MSP3b 为 28%, 针对 MSP3c 为 21.3%。在这些个体中的 31 个个体中监测到的 IFN- γ 分泌显示, 针对 MSP3a 的 IFN- γ 应答者的流行程度为 42%, 针对 MSP3b 为 55%, 针对 MSP3c 为

61.3%。这些结果提示，所测试的 3 种 MSP3 肽的每一种均定义了至少一种 T 细胞表位。此外，IFN- γ 分泌提示至少有一些应答细胞属于 Th1-样类型。

8C – 讨论

为寻找疟疾疫苗候选物，我们集中研究了由最有效的免疫力所针对的抗原，所谓最有效的免疫力指的是生活于高发病地区的个体经过多年而获得的免疫力。我们已经说明了这种非消除性免疫 ("带虫免疫") 是由通过单核细胞参与其中的间接机制 (ADCI) 而具有活性的 IgG 介导的。在第二步，采用 ADCI 将 MSP3 鉴定为保护性 IgG 的靶位 [Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Gras-Masse H, et al, 1994]。本研究的目的在于表征位于 MSP3 的保守 C-末端内的抗原，并评价相应的抗体的功能和生物学活性。

实际上，该分子的 C-末端一侧 (开始于第三个七重复序列) 在迄今所测试的不同分离株中是高度保守的 [McColl DJ, Anders RF. 1997; and Huber W, Felger I, Matile H, Lipps HJ, Steiger S, Beck H. 1997]，而 MSP3 的 N-末端一侧显示出总体上的二态性 (dimorphism) (3D7-样和 K1-样) [McColl DJ, Anders RF. 1997; and Huber W, Felger I, Matile H, Lipps HJ, Steiger S, Beck H. 1997]。因此，我们决定集中研究 C-末端区域，因为其中的一部分 (DG210, 图 19) 在我们的初步筛选中被鉴定为保护性人类抗体的靶位 [Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Gras-Masse H, et al, 1994]，且其次，也因为抗原保守性是成功研发疟疾疫苗的关键标准。

使用覆盖 MSP3 的保守性 C-末端一侧的 6 种重叠的合成肽，我们发现针对各个区域的抗体模式在流行程度、滴度、同种型分布、与临床保护作用的关联、以及体外和体内的抗寄生虫活性等方面差别显著。针对 MSP3a 和 MSP3e 的抗体滴度与其余 4 种肽相比是低的。针对 MSP3b、MSP3c、MSP3d 和 MSP3f 的应答主要由嗜细胞 IgG 亚型构成，不过，

针对 MSP3f 主要是 IgG1 同种型, 而针对其他的则主要是 IgG3。已经有报道, 对于恶性疟原虫的另一种裂殖子表面蛋白质 MSP-1, 针对一种蛋白质的不同区域的亚型应答也存在相似的差别 [Cavanagh DR, Dobano C, Elhassan IM, et al, 2001]。这些发现提示, 在针对 MSP3 C-末端的不同区域的抗体应答的成熟过程中发生的 IgG 类别转换受到独立地调节。调节抗体成熟的因子还不十分清楚, 但可能受到抗原的性质连同来自 T 细胞的接触依赖性信号特别是 T 细胞所分泌的细胞因子的影响 [Stavnezer J. 1996]。不过, 最近的发现提示疟疾抗原的性质可能是决定抗体亚型的主要因素 [Garraud O, Perraut R, Diouf A, et al, 2002], 本研究的结果似乎也是如此。

由于能够得到非常详细的临床资料, 而这些资料是塞内加尔 Dielmo 村的主要特征性构成, 因此我们得以研究亚型分布与抗疟疾发作的保护作用之间的关联。考虑到年龄的混杂影响, 我们发现针对 MSP3b、MSP3c 和 MSP3d 的 IgG3 应答与抗疟疾发作的保护作用明显相关。这些结果与更大样本的独立研究相一致 [Soe S, Theisen M, Roussilhon C, Aye KS, Druilhe P. 2003; and Oeuray, C., et al, in preparation], 这些研究已经发现针对 MSP3b 的 IgG3 应答与抗疟疾发作的保护作用之间存在关联。对于其他裂殖子表面疫苗候选物, 已经有报道认为在各种人种和不同的疟疾传播条件下, MSP2 倾向于 (skewing towards) IgG3 抗体应答 [Taylor RR, Smith DB, Robinson VJ, McBride JS, Riley EM. 1995; and Rzepczyk CM, Hale K, Woodroffe N, et al, 1997], 且可能与抗疟疾临床免疫相互关联 [Taylor RR, Allen SJ, Greenwood BM, Riley EM. 1998]。相似地, 针对 MSP1 的具有多态性的“2 区 (block 2)”区域的抗体应答也倾向于 IgG3 亚型, 该“2 区”区域已经被鉴定为抗临床疟疾免疫的靶位 [Polley SD, Tetteh KK, Cavanagh DR, et al, 2003]。不过, 至少在后一种情况中, 这些抗体的作用机制还不清楚, 这是因为, 通常认为具有生物学活性的抗

MSP1 抗体针对的是该抗原的 C-末端部分 [Egan AF, Burghaus P, Druilhe P, Holder AA, Riley EM. 1999]。

相反，在我们的研究中所使用的功能性体外 ADCI 分析提供了关于针对各个区域的抗体的抗寄生虫性生物学活性的信息。由于是在允许进行比较的条件下进行的，因此它们证实了针对 MSP3 的不同区域的抗体之间的重要差别。有趣的是，非常不同的方法得到了相似的结论，即体外的 ADCI 分析指出，与免疫流行病学研究所发现的完全相同的肽 (MSP3b、MSP3c and MSP3d) 具有重要性。针对 MSP3a 和 MSP3f 的抗体缺乏作用的原因仍有待于阐明。对于 MSP3f，可能是抗体无法接近位于裂殖子表面的表位，这是由于该亮氨酸拉链结构域与其他分子形成卷曲螺旋相互作用 [Mills KE, Pearce JA, Crabb BS, Cowman AF. 2002; and McColl DJ, Anders RF. 1997]。

体外研究结果的可靠程度也可在体内条件下进行证实 [Badell E, Oeuvray C, Moreno A, et al, 2000]。经被动转移入感染了恶性疟原虫的植入了人单核细胞并具有持续稳定寄生虫血症的小鼠后，发现抗 MSP3b 和抗 MSP3d 抗体可有效地降低恶性疟原虫的寄生虫负荷。

最近发现以 Freund 佐剂中的全长 MSP3 进行免疫的夜猴 (*Aotus nancymai*) 中产生了抗恶性疟原虫攻击的保护作用 [Hisaeda H, Saul A, Reece JJ, et al, Merozoite 2002]，这证实了 MSP3 作为疫苗的潜力。这一发现与我们的流行病学和生物学结果相一致。不过，本研究还为设计未来的疫苗构建体提供了来自人类免疫应答分析的额外的信息。实际上，MSP3 的 N-末端尽管能够诱导在 ADCI 中具有功能活性的抗体，但由于其具有的多态性，因此其价值是有争议的。此外，其含有的充分可能使得免疫应答偏离重要的保守性区域。在 C-末端部分内，也发现区域 MSP3e-f 的价值较低，原因在于针对 MSP3e 的抗体应答的流行程度和水平均低，而抗 MSP3f 抗体缺乏生物学活性。所研究的 a、b、c 这 3 种肽中的每一种被证实在疫区人群中定义的是非交叉反应性 T 细胞表位。采

用本研究中定义的构建体最近进行的疫苗试验证实了这一发现，并指出肽“d”是一种额外的 T 细胞表位区域 (Audran et al, submitted)。

总之，免疫流行病学研究结合功能性分析使得我们定义了该分子的一个 70 个氨基酸的区域。我们发现，在天然暴露于疟疾的人中产生了针对覆盖 MSP3b 至 MSP3d 的这一区域的具有抗寄生虫作用的抗体。这对于合理地设计出将来用于临床试验的源自 MSP3 的亚单位疫苗构建体而言具有重要的价值。

表 5：由 ELISA 确定的亲和纯化的人抗 MSP3 抗体的特异性

	MSP3a	MSP3b	MSP3c	MSP3d	MSP3e	MSP3f
anti-MSP3a	0.78	0.09	0.08	0.08	0.09	0.08
anti-MSP3b	0.05	1.11	0.09	0.08	0.09	0.07
anti-MSP3c	0.07	0.10	1.04	0.09	0.09	0.08
anti-MSP3d	0.10	0.08	0.16	1.01	0.09	0.09
anti-MSP3e	0.08	0.08	0.08	0.08	0.95	0.10
anti-MSP3f	0.07	0.07	0.08	0.08	0.10	0.92

所示为来自双份孔的 O.D.₄₅₀ 平均值。所有的肽均在相同的包被条件下使用。阴影代表阳性反应性。

实施例 9: 恶性疟原虫的裂殖子表面抗原家族确保寄生虫的存活

在表达于恶性疟原虫裂殖子表面的分子中，裂殖子表面蛋白质3 (MSP3) 是通过使用体外ADCI分析对全基因组表达产物进行筛选而鉴定的一种新的疫苗候选物，ADCI分析所基于的是被认为是对人类疟疾保护作用至关重要的防御机制 (Oeuvray, *et al.*, 1994)。抗MSP3抗体通过触发释放寄生虫抑制性单核因子 (parasitostatic monokines) 而抑制寄生虫的生长 (Bouharoun-Tayoun, *et al.*, 1995)。在一些野生情况中，IgG3抗MSP3抗体与获得性疟疾免疫状态之间具有很强的关联 (Soe, *et al.*, 2004; Singh, *et al.*, 2004)。在36个志愿者中进行疫苗试验导致在人类诱导产生了在体外和体内条件下均能够触发杀死恶性疟原虫的抗体 (Druilhe, *et al.*, *manuscript under preparation*)。

对恶性疟原虫基因组数据的分析最近鉴定了一种新的MSP3多基因家族，其成员与MSP3具有结构同源性 (Cowman & Crabb, 2002)。已经报道了在间日疟原虫和诺氏疟原虫中鉴定到的MSP3的同源物由若干相关的分子组成 (Galinski, *et al.*, 2001; David, *et al.*, 1985)。在恶性疟原虫中，MSP3样分子的同源性涉及存在于所有相关分子中的N末端特征标记肽、这些分子的C-末端区域的总体组织结构以及具有高度同源性的亚结构域，已经发现它们在MSP3中构成了嗜细胞抗体的靶位，嗜细胞抗体与野外所保护作用相关并介导在体外和体内杀死寄生虫 (Singh, *et al.*, 2004)。

鉴于MSP3作为疫苗的潜力，特别是在临床疫苗试验中获得的令人振奋的结果，我们决定详细研究该家族的其他成员的基因表达、这些基因所编码的蛋白质的定位、抗原性相关性程度、它们的序列的保守性、以及抗寄生虫生长的抗体的功能性作用。

结果显示这个多基因家族在许多方面不同于迄今已知的其他恶性疟原虫的多基因家族，并提示它们在引发参与控制寄生虫密度以及一般而言参与人类宿主防御机制的免疫应答方面具有重要作用。

9A – 材料与方法

序列分析

查询恶性疟原虫 3D7 数据库使用了 GenBank blasts，NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Malaria/plasmodiumbl.html>)。所有 BLAST 查询均未使用低复杂性过滤 (low-complexity filter) 但所有其他设置保持默认。使用 Wilbur-Lipman 算法在不同蛋白质序列之间进行成对同源性，PAM 250 采用 Gene Jockey II 序列分析软件。ClustalW 用于产生多重比对 (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/newclustalwpl>)，其被复制到 Boxshade Hofmann、Barron (在 [http://bioweb.pasteur.fr/seqanal.interfaces/boxshade.html#letters](http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/boxshade.html#letters)) 用于产生比对。信号肽预测使用的是 iPSort 和 Signal P (分别在 <http://hypothesiscreator.net/iPSORT/predict.cgi> 和 <http://www.cbs.dtu.dk/services/signalp/#submission>)。

自氨基酸序列预测并分析卷曲螺旋区域采用的是 COILS2.1 程序 (Lupas, *et al.*, 1991)。

预测双链和三链卷曲螺旋区域使用了基于 PAIRCOIL 的 MULTICOIL 程序 (Wolf, *et al.*, 1997)。亮氨酸拉链预测基于 Lzpred 程序 (Bornberg-Bauer, *et al.*, 1998)，该程序结合了卷曲螺旋预测算法和对特征性亮氨酸重复的近似搜寻。“独特区域 (Unique regions)”代表 MSP3 蛋白质家族不同成员之间的最小相关性。它们由大约 50-80 个氨基酸残基组成 (见表 6A)，这些氨基酸是通过在不同成员的氨基酸序列之间进行同源性比对分析而鉴定的。在 BLASTP 搜索中用作查询的“独特区域”的序列证实了它们与数据库中的任何其他恶性疟原虫蛋白质的初级氨基酸序列没有任何显著的相关性 (它们在 BLAST 中的“分位 (score bit)”值总是大于

100, “E值”的范围是 $9e^{-23}$ 至 $1e^{-40}$; 针对MSP3.3、MSP3.4和MSP3.5获得的少数其他hits具有低于40的低“分位”值, “E值”不低于 $1e^{-04}$ 。涉及了另一组重组蛋白质以覆盖MSP3.1、MSP3.2、MSP3.3、MSP3.4、MSP3.7和MSP3.8的相关的C-末端区域 (如图27和表6B所示)。

重组蛋白质的克隆和表达

“独特区域”和“相关羧基末端”重组蛋白质克隆自3D7株基因组DNA并作为N-末端his标记的重组蛋白质进行表达和纯化, 如文献所述 (Theisen, *et al.*, 1995)。

RNA分析

RNA提取自未同步化的血液期寄生虫培养物 (3D7, 在10–15%寄生虫血症时收集), 使用的是TRIZOL (Life Technologies), 按照生产商的说明进行。RNA沉淀存放于 -20°C 。为了确保RNA中完全没有DNA污染, 使用DNA-free试剂盒 (Ambion) 以DnaseI对其进行处理。自大约 $1\text{ }\mu\text{g}$ 的无DNA的RNA合成了cDNA的第一链, 使用的是一组随机引物和M-MLV逆转录酶 (Invitrogen), 按照生产商的说明进行。对MSP3基因家族的独特区域进行扩增使用了表6A所列的引物组。对照由基因组DNA作为模板和无核酸 (以水作为模板) 组成, 并将其用于各个引物对。

Western印迹和斑点印迹 (Dot-blot) 分析

以12% SDS-PAGE在变性条件下分离寄生虫蛋白质, 对其进行Western印迹分析, 采用了文献所述的标准方案 (Bouharoun-Tayoun & Druilhe, *et al.*, 1992)。使用纯化的重组蛋白质在硝化纤维素试纸 (Amersham) 上进行斑点印迹分析。为了在每个斑点样品中获得相当的蛋白质分布, 对蛋白质的浓度和体积均进行调整。通常使用真空歧管

(BioRad) 将2 μ g/10 μ l的纯化重组蛋白质施加至硝化纤维素膜。然后以类似于Western印迹条的方式处理斑点印迹斑以检测抗体信号。

间接免疫荧光分析 (IFA)

在风干的丙酮固定的恶性疟原虫成熟裂殖体薄层涂片上进行IFA，按照文献所述方法进行 (Druilhe & Khusmith, 1987)。IFA用于检测蛋白质的亚细胞定位并调整亲和纯化的抗体的功能性浓度以用于ADCI分析，按照文献所述方法进行 (Singh, *et al.*, 2004)。

ELISA

ELISA用于检测针对MSP3蛋白质家族的不同成员的高免疫库中的总IgG和亚型，按照文献所述方法进行 (Druilhe & Bouharoun-Tayoun, 2002)。还测试了来自以MSP3.1和MSP3.2重组蛋白质进行免疫的小鼠的血清与MSP3家族其他成员的发生交叉反应的能力。通过以测试抗原的光密度值减去对照蛋白质 (0.25 μ g牛血清白蛋白/孔) 的光密度值得到各个血清样品 (人/小鼠) 的特异性反应性。

抗体的亲和纯化

自西非塞内加尔Dielmo村居民的高免疫血清库中亲和纯化出针对MSP3蛋白质家族的不同成员的抗体。按照文献所述进行亲和纯化 (Singh, *et al.*, 2004)，使用了吸附于聚苯乙烯珠 (平均直径10 μ m, Polysciences) 表面的纯化重组蛋白质。使用0.2 M甘氨酸 (pH 2.5) 洗脱特异性抗体，并立即用2M的Tris水溶液中和至pH 7.0。以PBS继以RPMI对亲和纯化的抗体进行充分透析，并以Centricon浓缩器 (Millipore) 进行浓缩，滤膜滤过除菌，加入1% albumax (Gibco, BRL) 后存放于4°C。

交叉反应性研究

通过测试针对来自MSP蛋白质家族成员的不同羧基末端重组蛋白质产生的抗体的交叉反应性来评价这蛋白质之间的抗原性相关性程度。为了测试MSP3蛋白质家族不同成员中是否存在抗原性相关性，使用来自高免疫血清的亲合纯化的抗体进行ELISA分析，ELISA中的浓度为10 μ g/ml。

通过ELISA测试了针对MSP3.1和MSP3.2 C-末端重组蛋白质所产生的小鼠血清对MSP3蛋白质家族的其他成员的交叉反应性，使用了1:50稀释的小鼠血清。

亲和力研究

采用斑点印迹分析来确定针对MSP3蛋白质家族的不同成员的天然产生的人类抗体的抗体结合亲和力。测试了以渐增浓度的离液盐(NH₄SCN: 0M, 0.1 M, 0.25 M, 0.62 M, 1.56 M和3.9 M) 室温处理20分钟后的排列有等量重组蛋白质的相同的硝化纤维素膜条的残余抗体结合。将0M NH₄SCN溶液条件下所得到的针对任一抗原的抗原反应性值作为100%，以更高浓度的NH₄SCN处理后的残余抗体反应性被表示为该100%的分数。使用EPSON扫描仪(型号: EU34; EPSON TWAIN软件)扫描斑点印迹斑，然后通过基于Adobe Photoshop的图像分析来定量评价抗体反应性。使用Macintosh PowerPC G4 系统，以Adobe Photoshop软件(version 6, Adobe Systems) 分析图像。

简言之，自同时含有因抗体反应性产生的“斑点染色”和“背景”部分(周围未染色的硝化纤维素膜)的硝化纤维素膜选择固定象素区。使用“选择保存”选项(选择菜单)保存该象素区并用于产生组方图(图像菜单)。设置组方图以便在“发光度”频道中显示选定象素区的统计学细节。组方图中的“Std Dev”值代表明亮区域(硝化纤维素背景)和深色区域(因抗体反应而染色)之间的差异水平，将其用于比较残余抗体反应性水平。

功能性体外抗体分析

进行双份的抗体依赖性单核细胞介导的ADCI分析, 使用的是实验室中维持的3D7株和乌干达Palo-Alto, 方法如文献所述 (Bouharoun, *et al.*, 1990)。单核细胞来健康的未暴露于疟疾的供者, 按照文献所述方法制备 (Bouharoun, *et al.*, 1990)。调整亲和纯化的抗体的浓度以产生1/200 IFA终点滴度, 以90 μ L完全培养基中10 μ L的比例添加, 在ADCI分析中产生的最终滴度为1/20。培养96小时后, 通过在来自各孔的以Giemsa染色的薄层涂片中镜检50,000个红细胞而确定寄生虫血症的水平。单核细胞依赖性寄生虫抑制被表示为特异性生长抑制指数 (SGI): 寄生虫血症SGI = $1 - \{(\text{加入单核细胞和测试IgG的寄生虫血症百分数} / \text{加入测试IgG的寄生虫血症百分数}) / (\text{加入单核细胞和正常IgG的寄生虫血症百分数} / \text{加入正常IgG的寄生虫血症百分数})\}$ 。本分析中使用的阳性对照IgG为用于在人类进行被动转移实验的来自象牙海岸的血清样品库 (Sabchareon, *et al.*, 1991), 阴性对照IgG来自从未暴露于疟疾感染的法国供者。

9B – 结果

与MSP3串联定位于10号染色体的8个ORF中的6个具有相似的序列组织结构

已经在不同的疟疾类型中鉴定了恶性疟原虫 MSP3的同源物 (Galinski, *et al.*, 2001; David, *et al.*, 1985), 在一些类型中, 这些同源物以多等位基因家族的形式存在。最近发现了与MSP3有关的另一种恶性疟原虫裂殖子表面蛋白质MSP6。MSP3和MSP6在它们的C-末端区域共享一种有序的序列组织结构, 由保护性抗体所针对的抗原性结构域继以富含谷氨酸的区域和卷曲螺旋区域组成 (Trucco, *et al.*, 2001)。不同寄生虫中的所有已知的MSP3样基因在N-末端区域均具有一种4-6个氨基酸的特征标记基序(NLRNA/NLRNG), 其紧随在推定的22-24个氨基酸的信号肽序列之后。

通过分析恶性疟原虫基因组 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Malaria/plasmodiumbl.html>) 中具有该特征标记基序的基因鉴定到位于10号染色体上的一个32 kb的重叠群, 其含有串联定位于同一编码链的8个ORF, 但在不同的读码框中。我们建议基于其与MSP3的序列相关性, 根据它们在编码链中的位置 (自5'至3'端), 来重新命名这些基因, 如图26 A所示。已知其中有2个编码已知的裂殖子表面蛋白质MSP3和MSP6 (现分别命名为MSP3.1和MSP3.2), 而其他的被归于编码数据库中的尚未表征的假象蛋白质。

它们在数据库中的蛋白质id为:

MSP3.1-AAN35542.1 ; MSP3.2-AAN35543.1 ; MSP3.3-AAN35544.1 ; MSP3.4-AAN35545.1 ; MSP3.5-AAN35547.1 ; MSP3.6-AAN35548.1; MSP3.7-AAN35549.1和MSP3.8-AAN35552.1。

所有这些ORF均含有相关的由ip-SORT和Signal P程序所推定的氨基末端信号肽区域。最可能的推定裂解位点的氨基酸位置为: MSP3.1: 25-26; MSP3.5: 21-22; MSP3.6: 21-22; 以及MSP3.7: 24-25。不过, 对于MSP3.2、MSP3.3、MSP3.4和MSP3.8的推定裂解位点并非最佳的。

这8个ORF中的6个 (MSP3.1、MSP3.2、MSP3.3、MSP3.4、MSP3.7和MSP3.8) 具有相同的C-末端区域的有序的序列组织结构, 但其他2个 (MSP3.5和MSP3.6) 具有无关序列 (图27)。这些MSP3样ORF中的每一个在所测试的不同恶性疟原虫分离株中均具有高度保守的C-末端区域 (见补充数据, 附件5)。相关序列I的Clustal-W比对显示于图26 B。BLASTP分析 (见表6) 发现这些相关的ORF之间的氨基酸残基具有总体上大约28%的相同性以及大约45%的相似性, 而在相关的C-末端区域内, 这些值分别为大约32%和大约54%。进化树 (图26 C) 显示的是这些ORF中序列相关性的程度。这些ORF中的2个 (MSP3.4和MSP3.8) 由DBL样结构域连同13至14个半胱氨酸残基所组成, 这一排列类似于在*var*或*eb1* 基因家族成员中观察到的情况 (图27)。

MSP3.1的最C-末端区域先前被报道为亮氨酸拉链结构域 (McColl & Anders, 1997), 采用不同的算法例如Lzpred并未证实, 这与MSP3.2中观察到的情况一致 (Trucco, *et al.*, 2001)。不过, 采用COILS2.1和PAIRCOILS, 推定MSP3.1和MSP3.2两者中的该最C-末端区域形成卷曲螺旋结构域。MSP3.3、MSP3.4、MSP3.7和MSP3.8也推定具有存在相似的卷曲螺旋最C-末端区域。

所有6个MSP3样ORF均表达为裂殖子表面蛋白质

我们分析了所有这些ORF在恶性疟原虫血液期培养物中的RNA和蛋白质表达情况。在每一个ORF中都鉴定到了独特区域 (具有最少的相关氨基酸序列段) (ca 70-80氨基酸), 如图27所示。使用这些独特区域作为查询对恶性疟原虫基因组的BLASTP分析与其相应的ORF特别相配, 具有高比对分值 (100-200) 和低'E'值 $< e^{-32}$ 。使用MSP3.3和MSP3.4独特区域在很少的其他蛋白质观察到低比对分值 (< 40)。

使用具体的引物自非同步化的无性血液期恶性疟原虫的基因组DNA和cDNA制备物扩增来自各个ORF的独特区域。cDNA的分析结果显示所有的具有相关 C-末端区域的ORF在寄生虫发育的血液期均被转录 (图29, 图片A)。在不具有C末端相关性的ORF中, 检测到MSP3.5和MSP3.6的RNA表达。不过, 观察到MSP3.5的独特区域有低水平的cDNA扩增 (图29, 图片A, 右上), 提示该ORF的转录产物较不稳定。

使用非洲人高免疫血清库, 针对为各个ORF中的独特区域设计的重组蛋白质对抗体进行亲和纯化, 方法如文献所述 (Singh, *et al.*, 2004)。图28显示了通过斑点印迹分析确定的针对各个独特区域的亲和纯化的抗体的特异性。观察到的对角反应性 (diagonal reactivity) 模式证实了亲和纯化的抗体对它们的相应蛋白质具有特异性。

使用这些特异性亲和纯化的抗体进行Western印迹分析, 以检测相应ORF在寄生虫无效血液期的表达 (图29B)。证实了具有相关C-末端区域

的ORF表达天然的寄生虫蛋白质。尽管观察到的寄生虫蛋白质的分子量大部分与其计算的分子量相一致，但对于少数情况，例如在MSP3.1中，观察到的分子量 (大约48 kDa) 远大于计算的分子量 (大约40 kDa)，这与先前的研究相一致 (McColl, *et al.*, 1994)。一些亲和纯化的抗体所识别的低分子量蛋白质可能是由于天然蛋白质的蛋白裂解作用，如已知MSP3.2存在这种情况 (Trucco, *et al.*, 2001)。不过，不能排除蛋白质制备物的不稳定性导致的蛋白质降解。针对MSP3.5和MSP3.6的亲和纯化的抗体不识别特定的寄生虫蛋白质。而抗MSP3.5抗体不与任何寄生虫蛋白质反应，抗MSP3.6抗体与多种不符合其65 kDa的计算分子量的多肽反应 (图29, 图片B)。

采用间接IFA，以针对相应的蛋白质的亲和纯化的抗体评价这些蛋白质在3D7株寄生虫的血液期的定位 (图29, 图片C)。针对具有相关C-末端区域的ORF的抗体使得游离裂殖子的表面被染色，这种模式无法与MSP3或MSP6中所观察到的模式区别开来。在两种其他的实验室株寄生虫培养物Palo-Alto (乌干达) 和T23 (数据未显示) 中也观察到了这种模式的IFA反应性。针对MSP3.5的抗体未能与寄生虫蛋白质发生反应 (图29, 图片C, 右上)。可能是由于转录产物较不稳定，如在MSP3.5所观察到的，其不表达于红内期。针对MSP3.6的抗体与成熟裂殖体和游离裂殖子反应 (图29, 图片C)。不过，由于抗MSP3.4抗体在Western印迹分析中对多种寄生虫蛋白质显示出明显的交叉反应性，因此需要采用更加精确的抗体来证实其表达。

因此，表达分析说明，具有与MSP3相关的C-末端区域的ORF表达于寄生虫发育的红内期，作为裂殖子表面蛋白质，且这些构成了恶性疟原虫中的MSP3蛋白质家族。

观察到针对MSP3家族成员中的相关C-末端区域的抗原性交叉反应性

为了确定MSP3家族不同成员之间的抗原性相关性程度，相关的C-末端区域被表达为His-标签蛋白质，如图27所示。针对这些重组蛋白质自非洲人高免疫血清库亲和纯化抗体。图30显示了该库对不同重组蛋白质的反应性。观察到针对各重组蛋白质存在不同水平和模式的抗体亚型反应性，说明序列的不同导致这些蛋白质在抗原性特征方面存在差异。

通过ELISA确定了针对各重组蛋白质的亲和纯化的抗体对于该家族其他成员的反应性。亲和纯化的抗体对该家族的不同成员表现出不同程度的交叉反应性，见表7。尽管抗MSP3.1抗体对家族其他成员显示出最小的交叉反应性，但MSP3.1却广泛地被针对家族其他成员的亲和纯化的抗体识别。相反，尽管抗MSP3.4抗体对家族其他成员显示出最高的交叉反应性水平，但MSP3.4本身却较少被针对家族其他成员的亲和纯化的抗体所识别。针对其他家族成员的抗体显示出中等水平的交叉反应性。

为了确定交叉反应性抗体的结合亲和力，我们使用针对不同重组蛋白质的亲和纯化的抗体，在渐增浓度的硫氰酸铵 (NH_4SCN) 溶液条件下，对该家族所有成员进行了斑点-ELISA分析。将无 NH_4SCN 时所观察到的任何给定的抗原抗体组合的反应性视为100%，将存在渐增浓度的 NH_4SCN 时观察到的反应性视为该100%的分数。观察到各个亲和纯化的抗体制备物针对家族的不同成员具有异质性的结合亲和力模式。此外，对于一些抗原抗体组合出现了超过一个的斜坡 (slope)，说明其是具有不同结合亲和力的抗体混合物，如图31所示。我们于是评价了“曲线下面积%”作为对抗体结合亲和力的估计。如表8所示，通过分别对由不同抗体制备物 (沿表8的列) 所识别的各个抗原的能力和对针对家族所有成员 (沿表8的行) 的各个抗体的反应性进行“曲线下面积%”求和，得到不同抗原的“抗原性”的估计值和亲和纯化的抗体针对它们的“交叉反应性程度”。根据观察，MSP3.1 C-末端被发现最具有抗原性，表现出与针对家族不同成员的亲和纯化的抗体具有高结合力 (表9)。相反，MSP3.4 C-末端被发现具有最小的抗原性，表现出与不同抗体发生相对弱的结

合。各种亲和纯化的抗体表现出的交叉反应性程度也不同。抗MSP3.1抗体被发现具有最小的交叉反应性，而抗MSP3.2和抗MSP3.4抗体表现出最高程度的交叉反应性。

这些结果强烈提示针对MSP3蛋白质家族的不同成员的天然产生的抗体中具有抗原性交叉反应性网络。

我们以来自来自这些成员中的两个成员MSP3.1和MSP3.2的C-末端重组蛋白质的免疫小鼠，以便确定通过人工免疫接种诱导的抗体所具有的交叉反应性。针对MSP3.1和MSP3.2两种产生的抗体与家族的所有成员均具有交叉反应性，见图32，这进一步证明MSP3蛋白质家族的不同成员之间共享抗原性特征。

MSP3蛋白质家族的所有成员均引发通过ADCI有效杀死寄生虫的天然产生的抗体。

我们先前发现，抗MSP3.1和抗MSP3.2的抗体介导单核细胞依赖性的寄生虫生长抑止作用 (Singh, *et al.*, 2004; Singh, *et al.*, manuscript communicated)。为了评价针对家族其他成员天然产生的抗体的抗寄生虫作用，在ADCI体外分析中测试了来自高免疫血清的针对所述分子的相关C-末端部分的亲和纯化的抗体。将各种亲和纯化的抗体调整至等效浓度，以便对天然寄生虫抗原产生相同的反应性，这可通过各种抗体制备物在IFA中的终点滴度而确定 (数据未显示)。结果 (图33) 显示针对MSP3蛋白质家族各个成员的抗体引发了很强的寄生虫抑止作用。抑制的水平与先前在人体进行被动转移实验所用的非洲人IgG库 (PIAG) 中观察到的水平 (Sabchareon, *et al.*, 1991) 相当。结果证实MSP3-蛋白质家族的各个成员可作为天然产生的具有抗寄生虫作用的抗体的靶位，这与抗原相似性以及由针对它们的抗体所表现出的交叉反应性的网络相一致。

9C – 结论

基于它们的序列相关性，恶性疟原虫蛋白质可划分为不同家族。一些基因家族表达于寄生虫的无性血液期。具有高度可变性的基因家族(例如*PfEMP1 (var)*、*rifin*和*stevor*)的成员散布于不同染色体的诱重组性亚端粒区(recombinogenic subtelomeric regions)。它们表达于被感染的RBC的表面并参与抗原性变异和细胞粘附(Su, *et al.*, 1995; Fernandez, *et al.*, 1999)。*RBL*、*EBL*和*RAP*的成员表达于裂殖子分泌细胞器中并具有可观的基因冗余性(Reed, *et al.*, 2000; Kaneko, *et al.*, 2000; Duraisingh, *et al.*, 2003)。它们在裂殖子侵入RBC时被分泌，且已知它们在恶性疟原虫的替代侵袭途径中具有作用(Barnwell, 1999)。

裂殖子表面蛋白质可分类为膜锚定蛋白质和膜结合蛋白质。尽管具有单EGF样结构域的GPI锚定蛋白质MSP2、MSP5和MSP4定位于同一染色体基因座，但具有双EGF样结构域的GPI锚定蛋白质例如MSP1、MSP8、MSP8样和MSP10定位于不同染色体上(Burns, *et al.*, 2000; Black, *et al.*, 2001; Black, *et al.*, 2003)。相反，属于膜结合蛋白质家族的大多数成员如MSP3、MSP7和SERA(除SERA9以外)则以串联形式成簇位于同一染色体上(Mello, *et al.*, 2002; Aoki, *et al.*, 2002; Miller, *et al.*, 2002)。

MSP3蛋白质家族与其他多基因家族相比具有多种不同的特征。所有MSP3基因均具有单一的外显子结构，这不同于在其他基因家族如*PfEMP1*、*rifin*、*stevor*、*PfRBL*、*EBL*和*SERA*基因家族成员中所见的两个或多个外显子结构。MSP3蛋白质家族的所有成员同时表达于裂殖子表面。这在其他基因家族中是不常见的，例如*var*基因，其在一个时期只表达一种抗原(Scherf, *et al.*, 1998)，或例如*SERA*，其中基因簇的外周基因是不表达的(Aoki, *et al.*, 2002; Miller, *et al.*, 2002)。

尽管其他基因家族的成员共享一般的序列组织结构，但它们是显著不同的，且不具有共享的交叉反应性表位。例如，天然产生的针对不同MSP的EGF样结构域的抗体不具有交叉反应性(Black, *et al.*, 1999; Black, *et al.*, 2003)。不过，最近报道在*var*基因家族的不同成员之间存在一定程

度的交叉反应性 (Chattopadhyay, *et al.*, 2003)。MSP3蛋白质家族的C-末端区域是高度相关的, 并共享交叉反应性表位, 这些表位在不同寄生虫分离株中是高度保守的, 并且是介导ADCI的天然产生的抗体的靶位。

MSP3家族的所有基因均被转录且相应的蛋白质同时表达于恶性疟原虫裂殖子的表面。这大大增加了同时表达于裂殖子表面的MSP3样表位的数量, 且由此大大增加了由MSP3诱导的抗体所针对的表位的数量, 也就是说, 以MSP3-LSP疫苗构建体对志愿者进行免疫接种诱导了不仅与MSP3.1, 还与该家族其他成员相互作用的抗体, 这些抗体因此能够与该家族所有成员反应且因此在能够反映保护作用的生物学分析方法中发挥作用。

基因的复制以及相关同源性表位的表达也可解释为何以MSP3.1 (Mills, *et al.*, 2002) 和MSP3.2 (Mills & Cowman, *personal communication*) 进行的基因敲除实验对寄生虫的存活几乎没有影响。由MSP3家族的其余的成员所表达的同源性结构能够补偿MSP3.1或MSP3.2的缺失。换言之, 所有成员同时表达使得寄生虫具有了功能性“备胎”。

已经发现来自该家族各个成员的相关C-末端区域可与单核细胞协作以抑制寄生虫的生长, 并可达到与针对原有MSP3.1蛋白质的抗体所介导的相似的程度。这拓宽了参与天然获得的保护作用的抗原的范围并能够基于它们来制备疫苗构建体。除了在鉴定为对保护作用具有关键作用的区域具有高度同源性的相关C-末端区域具有共享的序列组织结构以外, 各种MSP3基因还显示出显著的序列多样性。对MSP3.1的详细分析导致有3个表位区域, 基于流行病学和临床依据以及反映抗体介导的保护作用的研究, 被鉴定为保护性抗体的靶位 (Singh, *et al.*, 2004)。

对MSP3家族成员进行详细的抗原性分析显示, 它们的初级氨基酸序列之间的差异, 抗原性特性, 具有足够的保守性, 可产生交叉反应性抗体。交叉反应性的程度能够使得当检测人体对该家族的一个成员的抗体应答时, 该多基因家族的任何其他成员均能够诱导这些抗体。不过,

针对一种给定基因产物的亲和纯化的抗体在其与其他基因产物的结合亲和力和方面时不同的。结果提示在针对一种基因产物产生的抗体与该家族的其余成员之间存在分子相互作用的复杂模式。

疟疾基因的多态性可通过随机突变产生，由于其经常累及那些参与保护作用的表位区域，因此通常被认为是疫苗研发的主要瓶颈。不过，对于MSP3多基因家族，不同成员之间的差异似乎与随机突变无关。实际上，多个不同分离株之间的各个MSP3基因具有全序列保守性这一点是非常惊人的且最为与众不同。这说明，不同成员之间现存的差异不是随机产生的，且反过来提示，这些差异可能是为了某些重要功能而保守的。

总之，恶性疟原虫的MSP3蛋白质家族成员之间具有高度保守的趋异性，而又仍然保留抗原性相关性。这些发现所产生的主要问题是保持这种多样性的强保守性的原因何在？对此可有两个主要的假设。

1. 这种多样性产生了与单一抗原相比更广泛的与相关抗原性网络发生反应的抗体，即在亲和性、亲和力和精细特异性方面具有更广泛的多样性，与确保针对原始的以及相关的表位具有反应性并介导单核细胞依赖性寄生虫杀死所必需的抗体库。

2. 序列的差异还提供了表位多样性以确保在广泛的人类遗传背景中诱导必需的抗体应答，即各种基因序列可能会更好地适合于一种给定的MHC II类亚型。既然如此，这种多样性的保守性的目的在于在每一个单独的个体中产生相同类型的必需抗体。MSP3.1疫苗试验的结果支持这一假设(由于所有志愿者均没有产生于天然寄生虫蛋白质反应的Ab)。

在后一种情况中，基因的序列保守性的驱动力在于，如果一种寄生虫发生突变，其将无法在一些宿主中诱导这一类型的抗体，因此导致在

这一特定宿主内出现高寄生虫血症，宿主可能死亡，且由此这种特定的突变寄生虫也随之死亡，即这种突变体的频率在人群中自发降低。

在这两种情况中，结果均指向能够控制寄生虫增殖的抗MSP3交叉反应性抗体的重要意义，即确保每一给定的人类宿主中存在低至中度的寄生虫密度，以这种方式保证宿主和寄生虫均能够存活。

这一发现给裂殖子表面抗原的功能带来了新的认识。它们在维持恶性疟原虫和人类之间的动态平衡的天然的宿主-寄生虫相互作用中具有重要意义。它们对疫苗研发也具有实际的意义，并强烈提示，改进的MSP3疫苗应该结合各种C-末端区域，以产生作用于多基因家族的各种蛋白质产物中的每一种的更广泛的抗体，并应该同时改进其在各种人类遗传学背景中的免疫原性。

表 6

(A)

序列	用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物对	独特区域的氨基酸序列 (数字所示为 3D7 序列的氨基酸位置)
MSP3.1 独特	F: 5'-CGCAAGATCTGGTTATACGGAAGATTAAAGC-3' R: 5'-CGCACCATGGCTATGAAGATTTTCAGCATCATC-3'	71-GYTEELKAKKASEDAEKAANDAENASKEAEEAAKEAVNL KESDKSYTKAKEACTAASKAKKAVETALKAKDDAEKSS-147
MSP3.2 独特	F: 5'-CGCAAGATCTACATCAAGGAGGAAATAATGTAATTCC-3' R: 5'-CGCACCATGGCTAATTATTATTCAGAGAAAGTTGTAG-3'	112-TSGGNNVPLPIKQSGENQYTVTSISGIQKGANGLTGATEN ITQVVQANSETNKNPTSHSNSTTTSLNNN-181
MSP3.3 独特	F: 5'-CGCAAGATCTATTATGAAACTACAGGAAGTCTAAGG-3' R: 5'-CGCACCATGGCTAATCATTTTCTAACTACTATCAG-3'	72-IYETTSGLGTGVESVKAIDGESGTSMDSPKPKENKISTEPGA DQVSIGLVNESDSSLEND-130
MSP3.4 独特	F: 5'-CGCAAGATCTGATTCTCTAACAACCACTTCTTTATCAACG-3' R: 5'-CGCACCATGGCTAATTATTGTTGTAGTATTATTTCC-3'	459- DSLTTTSLSTSINSVRDSSNLDQGRNITTSQGNSHRATVVQ
MSP3.5 独特 (odd member)	F: 5'-CGCAAGATCTCAATCCAAAGGAAATAGTGGTACTAAGG-3' R: 5'-CGCACCATGGCTAATCTAAGTATATATTATTGTCG-3'	210- QSKGNSGTEGDGSSVFGSIFGSLTIDSLLEKFIGSNNTN SDSNVKNSTMGNGQNKYDNN IYLD-274
MSP3.6 独特 (odd member)	F: 5'-CGCAAGATCTCTTGATATCTTTTACT-3' R: 5'-CGCACCATGGCTAACCTATTTTCAGTTTCCG-3'	95-LDIFTENKEQKNEEVPKIEVVNDGEEVKTEYVSEKNEEV ENKSETIIG-143
MSP3.7 独特	F: 5'-CGCAAGATCTATGAAGCTTCAGAATATATAGA-3' R: 5'-CGCACCATGGCTACCCAGTACCTACAAATATACC-3'	60-YEASEYIEKQNDILNMYNDEKEKNNNSLOTNVTNKNTVID NSNKFQSIEDNNVYNGKIFVGTG-122
MSP3.8 独特	F: 5'-CGCAAGATCTGTGAGTAATAGTGTGAATGCCTTACC-3' R: 5'-CGCACCATGGCTAGCTACCTTGGTTACTTCTTGG-3'	475-VSNSVNALPEPQGITLPDPSLKQTTQENQPVVETPVTTA VINEHQGQTEPNKGDNNNERENHESNVGSIQEVNQGSS-551

(B)

序列	用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物对	C-末端氨基酸序列 (数字所示为 3D7 中的氨基酸位置)
MSP3.1CT	F: 5'-CGCAAGATCTTATGAAAAGGCAAAAATGCT-3' R: 5'-CGCACCATGGTTAATGATTTTTAAATATTTGGA-3'	167-YEKAKNAYQKANQAVLKAKEASSY... GNNQIDSTLKDLEELSKYFKNH-371
MSP3.2CT	F: 5'-CGCAAGATCTTCTGAAACAAATAAAATCCTACTTCTCAT-3' R: 5'-CGCACCATGGTTAATTATTACTAAATAGATGGATCATTTCTTG-3'	161- SETNKNPTSHSNSTTTSLNNILGWE... NEKNEIDSTINNLVQEMIHLFSNN-371
MSP3.3CT	F: 5'-CGCAAGATCTTATGAGAAGAAAAATGAAAATA-3' R: 5'-CGCACCATGGTTAATTATATGTAAAAAATTCAT-3'	228-YEKKENKNVSNVDSKTSNEKGR.. LNGKNELDATIRRLKHRFMEFFT YN- 424
MSP3.4CT	F: 5'-CGCAAGATCTGATAATGTAACTCTGTAAACG-3' R: 5'-CGCACCATGGTTATTTTTGAAATAAATCTGTCAT-3'	508-DNVNSVTQRGNNNYNNLERGLGS... FNDNNNLETIFKGLTEDMTDLFQK-697
MSP3.7CT	F: 5'-CGCAAGATCTCCTGAAGGACCAAGAGCAAA-3' R: 5'-CGCACCATGGTCAATAGTTATTTAAAAAAAAGT-3'	214-PEGPRANNRNNENNQNTDPYNHYFA.. QTNNQLDPSLKDLENELTFFLNNY-405
MSP3.8CT	F: 5'-CGCAAGATCTCATGAAAGTAATGTTGGTAG-3' R: 5'-CGCACCATGGTTAATTTTTAAATAAATTTGTAAT-3'	537-HESNVGSIQE VNQGS VSEESHSTKL... LEENGSDSTLNSLSKIDITNLFKN- 762

表 6: (A) 用于克隆独特区域序列的引物对, 和 (B) 来自 MSP3 蛋白质家族各个成员的相关的羧基端区域。右列显示的是独特区域的氨基酸序列。根据 3D7 序列对氨基酸进行编号。没有设计来自 MSP3.4 和 MSP3.5 的相关羧基末端重组体, 这是因为这些序列与该家族的其他成员没有共享序列相关性。

表 7: 恶性疟原虫 MSP3 蛋白质家族的 BLASTP 比较

基因产物	E 值 (%相同性, %相似性)					
	MSP3.1	MSP3.2	MSP3.3	MSP3.4	MSP3.7	MSP3.8
MSP3.1	0.0	9×10^{-41} (31.48)	3×10^{-21} (25.39)	3×10^{-21} (26.48)	8×10^{-24} (25.40)	2×10^{-17} (26.41)
MSP3.2	8×10^{-41} (31.48)	0.0	1×10^{-21} (30,47)	2×10^{-23} (27.45)	7×10^{-29} (25.43)	9×10^{-23} (31.51)
MSP3.3	9×10^{-27} (27.43)	9×10^{-22} (30,47)	0.0	1×10^{-17} (32,51)	2×10^{-20} (25.41)	1×10^{-17} (27,45)
MSP3.4	1×10^{-21} (26.48)	1×10^{-24} (27,45)	5×10^{-18} (32.51)	0.0	2×10^{-17} (31.52)	1×10^{-92} (31,47)
MSP3.7	7×10^{-24} (25.40)	3×10^{-29} (27.44)	—	3×10^{-17} (31,52)	0.0	9×10^{-12} (25,40)
MSP3.8	7×10^{-19} (25,42)	2×10^{-23} (31,51)	1×10^{-18} (27,45)	6×10^{-93} (31,47)	2×10^{-12} (25,40)	0.0

粗体所示序列在 Malaria Genetics/Genomic database at NCBI 中被用作定制 blast 的查询项。

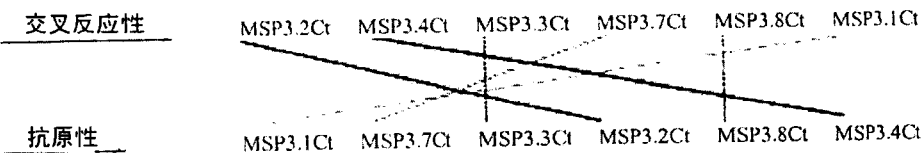
表 8: 针对 MSP3 蛋白质家族的相关 C 末端区域的天然产生的抗体显示出交叉反应性

	MSP3.1 Ct	MSP3.2 Ct	MSP3.3 Ct	MSP3.4 Ct	MSP3.7 Ct	MSP3.8 Ct	571-His	BSA
抗 MSP3.1Ct	0.156 (100%)	0.009 (5.8%)	0.052 (33.3%)	0.007 (4.5%)	0.054 (34.6%)	0.036 (23.1%)	0.005 (3.2%)	0.006 (3.8%)
抗 MSP3.2 Ct	0.073 (54.5%)	0.134 (100%)	0.029 (21.6%)	0.005 (3.7%)	0.052 (38.8%)	0.05 (37.3%)	0.005 (3.7%)	0.006 (4.5%)
抗 MSP3.3 Ct	0.135 (117.4%)	0.052 (45.2%)	0.115 (100%)	0.006 (5.2%)	0.115 (100%)	0.054 (47.0%)	0.006 (5.2%)	0.006 (5.2%)
抗 MSP3.4Ct	0.158 (216.4%)	0.032 (43.8%)	0.095 (130.1%)	0.073 (100%)	0.107 (146.6%)	0.075 (102.7%)	0.007 (9.6%)	0.007 (9.6%)
抗 MSP3.7Ct	0.047 (32.0%)	0.006 (4.1%)	0.005 (3.4%)	0.005 (3.4%)	0.147 (100%)	0.007 (4.8%)	0.006 (4.1%)	0.006 (4.1%)
抗 MSP3.8 Ct	0.085 (72.6%)	0.027 (23.1%)	0.031 (26.5%)	0.009 (7.7%)	0.062 (53.0%)	0.117 (100%)	0.007 (6.0%)	0.006 (5.1%)

ELISA 测定针对 MSP3 蛋白质家族各个成员的 C 末端重组蛋白质的亲和纯化的抗体对其他成员的交叉反应性。显示了代表亲和纯化的抗体针对各个重组蛋白质的反应性的 O.D.450 值。阴影代表亲和纯化的抗体对它们相应的重组蛋白质的反应性, 被认为是 100%。针对其他家族成员的交叉反应性的程度表示为的分数 100%, 以粗体显示。

表 9：从抗体结合亲和力推导得到的抗原性与交叉反应性之间的关系

	“曲线下面积(总作图面积认为是100%)” (使抗体反应性下降50%的[NH4SCN]大致浓度)						交叉反应性程度 (曲线下面积之和)	
	MSP3.1Cl (1.0 M)	MSP3.2Cl (1.0 M)	MSP3.3Cl (1.0 M)	MSP3.4Cl (1.0 M)	MSP3.7Cl (1.0 M)	MSP3.8Cl (1.0 M)	曲线下面积之和 (%)(1.0 M)	交叉反应性 等级
anti-MSP3.1Cl (1.0 M)	56.21 (0.4 M)	55.38 (0.4 M)	28.75 (0.4 M)	16.98 (0.3 M)	34.91 (0.6 M)	15.75 (0.5 M)	163.93	6
anti-MSP3.2Cl (1.0 M)	52.84 (1 M)	55.38 (0.4 M)	37.75 (0.6 M)	22.12 (0.5 M)	46.32 (2.5 M)	24.25 (0.3 M)	231.62	5
anti-MSP3.3Cl (1.0 M)	33.77 (1.2 M)	35.77 (0.5 M)	45.19 (1.6 M)	12.32 (0.5 M)	43.37 (1.8 M)	30.93 (0.4 M)	175.03	4
anti-MSP3.4Cl (1.0 M)	37.12 (1.6 M)	28.10 (1 M)	28.75 (0.5 M)	47.77 (2.2 M)	35.23 (2.1 M)	26.12 (0.7 M)	206.07	3
anti-MSP3.7Cl (1.0 M)	27.06 (1 M)	39.03 (1.6 M)	29.70 (1.2 M)	22.20 (0.3 M)	23.17 (0.4 M)	23.63 (0.2 M)	176.33	1
anti-MSP3.8Cl (1.0 M)	30.01 (0.5 M)	22.38 (0.3 M)	24.34 (0.3 M)	19.23 (0.3 M)	32.58 (1.2 M)	37.85 (1.3 M)	167.19	3
抗原性程度 (曲线下面积之和)								
曲线下面积之和 (1.0 M)	25.93	182.34	192.27	126.94	223.98	151.56		
抗原性等级	6	5	4	3	2	1		



各个抗原抗体反应的抗体结合亲和力以“曲线下面积%”表示 (如说明书文字部分和图 6 所述)。通过对由不同抗体制备物对任一给定抗原所显示的结合亲和力进行求和得到“抗原性”的估计值，沿本表的列。类似地，通过对由任一抗体制备物对不同抗原所显示的结合亲和力进行求和得到该抗体的“交叉反应性程度”的估计值，沿本表的行。通过将分子按其渐增的“抗原性”以及亲和纯化的抗体的“交叉反应性程度”进行排列，发现 MSP3-1 是家族中抗原性最高的分子，而 MSP3-4 是家族中抗原性最低的分子。反过来，抗 MSP3-1 抗体具有最低交叉反应性，而抗 MSP3-2 和抗 MSP3-4 抗体具有较高程度的交叉反应性。

实施例 10: 恶性疟原虫裂殖子表面抗原 6 为介导单核细胞依赖性寄生虫杀灭作用的天然产生的抗体提供多重靶位

本实施例中, MSP6 指 MSP3-2, MSP3 指 MSP3-1。恶性疟原虫 MSP6 是裂殖子表面抗原, 具有与 MSP3 相似的组织结构和序列同源性。其在 C-末端保守区域具有与 MSP3 具有交叉反应性的表位和与之不具有交叉反应性的其他表位, 两者均为与单核细胞协作而阻断恶性疟原虫红细胞周期的天然产生的抗体。

恶性疟原虫 MSP6 是一种最近发现的裂殖子表面分子, 在其总体序列组织结构上与先前文献所述的 MSP3 在结构上相关 (Pearce, J. A., T. Triglia, A. N. Hodder, D. C. Jackson, A. F. Cowman, and R. F. Anders, 2004.; Trucco, C., D. Fernandez-Reyes, S. Howell, W. H. Stafford, T. J. Scott-Finnigan, M. Grainger, S. A. Ogun, W. R. Taylor, and A. A. Holder, 2001)。该蛋白质的 C-末端部分与 MSP3 具有同源性 (ca. 与氨基酸残基具有 50% 的相同性和 85% 的相似性), 且与先前鉴定为由那些具有强抗寄生虫活性的抗体 (Oeuvray, C., H. Bouharoun-Tayoun, H. Gras-Masse, E. Bottius, T. Kaidoh, M. Aikawa, M. C. Filgueira, A. Tartar and P. Druilhe., 1994; Singh, S., S. Soe, J. P. Mejia, C. Roussilhon, M. Theisen, G. Corradin and P. Druilhe, 2004) 所针对的靶位的 11 个氨基酸的序列段 (ILGWEFGGG[A/V]P) 具有相同性。此外, 该分子的 C-末端部分在 MSP6 中是高度保守的, MSP3 也是如此, 而 N-端部分可通过蛋白裂解作用裂解, 其相对于 C-末端部分具有更高的多态性并具有较低的抗原性 (Pearce, J. A., T. Triglia, A. N. Hodder, D. C. Jackson, A. F. Cowman, and R. F. Anders, 2004; Wang, L., L. Crouch, T. L. Richie, D. H. Nhan, and R. L. Coppel, 2003)。

ADCI (抗体依赖性细胞抑制) 分析已经将 MSP3 鉴定为保护性抗体的靶位, 已经发现 ADCI 机制可最好地反映能够通过抗体而被动转移至感染了恶性疟原虫的患者中的保护作用 (Oeuvray, C., H. Bouharoun-Tayoun,

H. Gras-Masse, E. Bottius, T. Kaidoh, M. Aikawa, M. C. Filgueira, A. Tartar and P. Druilhe, 1994)。其已经被用于人类疫苗试验中进行追踪,这是基于以下一系列发现,其提示抗MSP3抗体促进形成抗疟疾免疫保护: i) 免疫流行病学研究发现, IgG3抗体与通过天然暴露于寄生虫而获得的保护作用具有显著的相关性 (Singh, S., S. Soe, J. P. Mejia, C. Roussilhon, M. Theisen, G. Corradin and P. Druilhe, 2004, Soe, S., M. Theisen, C. Roussilhon, K. S. Aye, and P. Druilhe, 2004); ii) 天然产生的或人工合成的抗体具有强单核细胞依赖性抗体ADCI作用 (Oeuvray, C., H. Bouharoun-Tayoun, H. Gras-Masse, E. Bottius, T. Kaidoh, M. Aikawa, M. C. Filgueira, A. Tartar and P. Druilhe, 1994; Singh, S., S. Soe, J. P. Mejia, C. Roussilhon, M. Theisen, G. Corradin and P. Druilhe, 2004); iii) 可在灵长类动物中主动引发针对恶性疟原虫攻击的免疫力并使之与攻击前的抗体滴度相关联 (Hisaeda, H., A. Saul, J. J. Reece, M. C. Kennedy, C. A. Long, L. H. Miller, and A.W. Stowers, 2002); iv) 可通过抗体将免疫力被动转移给感染了恶性疟原虫的SCID小鼠 (Badell, E., C. Oeuvray, A. Moreno, S. Soe, N. van Rooijen, A. Bouzidi, and P. Druilhe, 2000; Singh, S., S. Soe, J. P. Mejia, C. Roussilhon, M. Theisen, G. Corradin and P. Druilhe, 2004) and *P. reichnowi*-infected chimpanzees (Druilhe P., et al, *submitted for publication*)。

鉴于MSP6与MSP3的同源性,我们于是对MSP6的抗原性进行详细的研究,并评价了天然产生的抗MSP6抗体的抗寄生虫作用。

10A – 疫区人群中的抗原性

克隆MSP6的C-末端部分 (3D7克隆的161-371位氨基酸) 并将其表达为重组合氨酸标记的蛋白质 (MSP6-CT), 方法如先前文献所述 (Theisen, M., J. Vuust, A. Gottschau, S. Jespen, and B. Høgh, 1995)。设计了6种重叠的肽 (MSP6a161-182, MSP6b179-204, MSP6c192-224, MSP6d205-257, MSP6e282-326和MSP6f320-371), 方法与MSP3中所用方法相似 (Singh,

S., S. Soe, J. P. Mejia, C. Roussilhon, M. Theisen, G. Corradin and P. Druilhe, 2004), 所述肽各自代表C-末端部分的不同区域, 如图34所示。排除了一个小的富含谷氨酸的区域 (氨基酸 258至氨基酸 281; 富含54%谷氨酸) 以避免一些恶性疟原虫抗原中存在的富含谷氨酸的表位产生交叉反应性 (Mattei, D., K. Berzins, M. Wahlgren, R. Udomsangpetch, P. Perlmann, H. W. Griesser, A. Scherf, B. Muller-Hill, S. Bonnefoy, M. Guillotte, G. Langsley, L. H. Pereira da Silva and O. Mercereau-Puijalon, 1989)。进行ELISA分析, 方法如先前文献所述 (Singh, S., S. Soe, J. P. Mejia, C. Roussilhon, M. Theisen, G. Corradin and P. Druilhe, 2004), 以确定来自象牙海岸的30个得到抗疟疾保护的非洲成人的血清中的针对各个肽的总IgG水平和亚型分布。先前已经发现以纯化自这些血清的IgG进行被动转移可显著降低疟疾患者的寄生虫血症水平 (Sabchareon, A., T. Burnouf, D. Ouattara, P. Attanath, H. Bouharoun-Tayoun, P. Chantavanich, C. Foucault, T. Chongsuphajaisiddhi, and P. Druilhe, 1991)。

图35概括了针对覆盖MSP6-C末端不同区域的这6种肽所记录到的抗体亚型反应性。尽管针对不同区域的IgG的流行程度是不同的, 但针对各个肽的抗体亚型反应性模式是相当一致的, 总体上以嗜细胞抗体 IgG1和IgG3为主。还测定了针对一部分这些肽如MSP6e的IgG2抗体的实际水平。这种抗体亚型模式不同于针对一些血液期抗原所观察到的模式。例如, MSP3的相应区域显示, 针对MSP3b、MSP3c和MSP3d肽以IgG3为主, 而针对MSP3f则以IgG1为主 (Singh, S., S. Soe, J. P. Mejia, C. Roussilhon, M. Theisen, G. Corradin and P. Druilhe, 2004)。还观察到针对一种蛋白质内的不同区域存在不同模式的抗体亚型, 例如针对MSP-1 “2区” 以IgG3为主, 不同于针对MSP-119的IgG1 (Cavanagh, D.R., C. Dobano, I. M. Elhassan, K. Marsh, A. Elhassan, L. Hviid, E. A.Khalil, T. G. Theander, D. E. Arnot, and J. S. McBride, 2001), 在不同蛋白质之间也是不同的, 例如针对MSP-2以IgG3为主 (Rzepczyk, C. M., K. Hale, N.

Woodroffe, A. Bobogare, P. Csurhes, A. Ishii, and A. Ferrante, 1997; Taylor, R. R., S. J. Allen, B. M. Greenwood, and E. M. Riley, 1995), 而针对RAP-1 (Fonjungo, P. N., I. M. Elhassan, D. R. Cavanagh, T. G. Theander, L. Hviid, C. Roper, D. E. Arnot, and J. S. McBride, 1999) 和AMA-1 (Singh S., et al, *unpublished results*) 主要为IgG1。在另一个裂殖子表面抗原家族中, 针对MSP-4主要是IgG3, 而针对MSP-5主要为IgG1 (Wang, L., L. Crouch, T. L. Richie, D. H. Nhan, and R. L. Coppel, 2003; Weisman, S., L. Wang, H. Billman-Jacobe, D. H. Nhan, T. L. Richie and R. L. Coppel. 2001)。导致针对不同抗原产生不同的人类亚型应答的因素还不十分清楚。不过, 抗原本身的性质 (Gerraud, O., R. Perraut, A. Diouf, W. S. Nambei, A. Tall, A. Spiegel, S. Longacre, D. C. Kaslow, H. Jouin, D. Mattei, G. M. Engler, T. B. Nutman, E. M. Riley, and O. Mercereau-Puijalon, 2002) 以及应答B细胞所处的细胞因子环境 (Gerraud, O., and T. B. Nutman, 1996) 均可影响结果。

10B- 抗MSP6抗体的抗疟疾活性

为了评价针对MSP6的不同区域的人抗体的功能活性, 我们针对这6种肽的每一种对抗体进行亲和纯化, 使用的是独立的血清库 (每一个由5至7名个体的血清样品构成), 如先前所述进行选择 (Singh, S., S. Soe, J. P. Mejia, C. Roussilhon, M. Theisen, G. Corradin and P. Druilhe, 2004), 基于高含量的嗜细胞抗体 (IgG1 + IgG3) 以及针对邻近区域的反应性。亲和纯化的抗体被证明对相应的肽具有特异性, 这是因为没有观察到其对该分子的其他区域具有交叉反应性 (图10 A)。因此, 发现每一种MSP6肽定义了至少一种B细胞表位, 所述表位不与该分子的其他区域共享抗原性决定簇。对丙酮固定的恶性疟原虫无性血液期寄生虫薄层涂片进行间接免疫荧光分析 (IFA), 其提示各个抗肽抗体与天然的寄生虫蛋白质具有反应性 (数据未显示)。

然后采用单核细胞依赖性ADCI分析在体外评价抗寄生虫活性。为此,通过测试对寄生虫蛋白质的反应性,调整各个肽特异性抗体至等效浓度(1/200 IFA终点滴度),如先前所述(Singh, S., S. Soe, J. P. Mejia, C. Roussilhon, M. Theisen, G. Corradin and P. Druilhe, 2004),用于在ADCI中进行测试。检测以双份进行,历时96小时,使用了3D7株寄生虫和来自健康供者的单核细胞,方法如先前所述(Bouharoun-Tayoun, H., P. Attanath, A. Sabchareon, T. Chongsuphajaisiddhi, and P. Druilhe, 1990)。以RPMI培养基对亲和纯化的抗体进行透析,将其以完全培养基的10% (v/v)的比例添加,因此,在ADCI分析中,它们的每一种所使用的最终IFA滴度为1/20。在96小时通过镜检Giemsa染色的薄层涂片上的;¥10,000个红细胞确定寄生虫血症,如下计算特异性生长抑制指数: %SGI = 1-{(加入单核细胞和测试IgG的寄生虫血症百分数/加入测试IgG的寄生虫血症百分数)/(加入单核细胞和正常IgG的寄生虫血症百分数/加入正常IgG的寄生虫血症百分数)}X100。ADCI分析的结果(图36)显示,针对这6种肽中的每一种的亲和纯化的抗体均能够产生很强的单核细胞依赖性寄生虫生长抑制作用。这一结果明显不同于以MSP3得到的结果,后者的6种肽特异性抗体中仅有3种是有效的(Singh, S., S. Soe, J. P. Mejia, C. Roussilhon, M. Theisen, G. Corradin and P. Druilhe, 2004)。在所使用的抗体浓度中没有观察到对寄生虫生长产生明显的直接作用(无单核细胞的条件下)(数据未显示)。

10C - MSP6和MSP3共享交叉反应性表位

使用抗MSP6亲和纯化的抗体检测其对来自MSP3的同源性肽的交叉反应性。如表10 B所示,发现4个区域存在交叉反应性。抗MSP6 “b” 和“f” 抗体具有完全的交叉反应性,而抗MSP6 “d” 和抗MSP6 “e” 抗体显示出部分的交叉反应性。相反,抗MSP6a和抗MSP6c对相应的MSP3区域没有显示出交叉反应性。这些结果总体上与序列同源性一致(图34B),

且提示由一些抗MSP6抗体介导的抗寄生虫作用也可能是与MSP3的交叉反应性区域结合引起的。不过，由非交叉反应性MSP6抗体如抗MSP6a和抗MSP6c介导的寄生虫抑制证明MSP6本身也是ADCI的靶位。

表 10: ELISA 测定的亲和纯化的人抗 MSP6 抗体的特异性

(A)

	抗 MSP6a	抗 MSP6b	抗 MSP6c	抗 MSP6d	抗 MSP6e	抗 MSP6f
MSP6a	0.118	0.009	0.008	0.008	0.009	0.008
MSP6b	0.007	0.111	0.007	0.008	0.007	0.009
MSP6c	0.009	0.008	0.084	0.018	0.006	0.007
MSP6d	0.010	0.007	0.008	0.116	0.007	0.009
MSP6e	0.009	0.009	0.009	0.008	0.085	0.008
MSP6f	0.007	0.008	0.007	0.008	0.009	0.092

(B)

	抗 MSP6a	抗 MSP6b	抗 MSP6c	抗 MSP6d	抗 MSP6e	抗 MSP6f
MSP3a	0.007	0.007	0.008	0.010	0.007	0.012
MSP3b	0.010	0.105	0.008	0.008	0.009	0.007
MSP3c	0.008	0.009	0.010	0.008	0.008	0.009
MSP3d	0.010	0.009	0.007	0.049	0.008	0.008
MSP3e	0.008	0.008	0.009	0.009	0.045	0.010
MSP3f	0.009	0.009	0.011	0.009	0.008	0.085

测试了针对 MSP6 的不同区域的亲和纯化的抗体的 (A) 特异性，和 (B) 对 MSP3 的相关区域的交叉反应性。所示为来自双份孔的 O.D.₄₅₀ 平均值。所有的肽均在相同的包被条件下使用。阴影代表阳性反应性。

参考文献:

- Aoki S, Li J, et al (2002) "Serine repeat antigen (SERA5) is predominantly expressed among the SERA multigene family of *Plasmodium falciparum*, and the acquired antibody titers correlate with serum inhibition of the parasite growth." J Biol Chem. 277(49): 47533-40.
- Badell, E., C. Oeuvray, et al. (2000). "Human malaria in immunocompromised mice: an in vivo model to study defense mechanisms against *Plasmodium falciparum*." J Exp Med 192(11): 1653-60.
- Baird JK, Jones TR, et al, (1991). "Age-dependant acquired protection against *Plasmodium Falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria." Am J Trop Med Hyg 45: 65-76.
- Barnwell JW, (1999). "A new escape and evasion tactic" *Nature* 398(6728): 562-3.
- Beier, J. C., G. F. Killeen, et al. (1999). "Short report: entomologic inoculation rates and *Plasmodium falciparum* malaria prevalence in Africa." Am J Trop Med Hyg 61(1): 109-13.
- BenMohamed, L., Y. Belkaid, et al. (2002). "Systemic immune responses induced by mucosal administration of lipopeptides without adjuvant." Eur J Immunol 32(8): 2274-81.
- Behr C, Sartou JL, et al, (1992). "Antibodies and reactive T cells against the malaria heat-shock protein Pf72/Hsp70-1 and derived peptides in individuals continuously exposed to *Plasmodium Falciparum*." J Immunol 149: 3321-30.
- Black CG, Wang L, Hibbs AR, Werner E, Coppel RL. Identification of the *Plasmodium chabaudi* homologue of merozoite surface proteins 4 and 5 of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. 1999;67(5):2075-81.

Black CG, Wu T, Wang L, Hibbs AR, Coppel RL. Merozoite surface protein 8 of *Plasmodium falciparum* contains two epidermal growth factor-like domains. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;114(2):217-26.

Black CG, Wang L, Wu T, Coppel RL. Apical location of a novel EGF-like domain containing protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003; 127(1): 59-68.

Bornberg-Bauer E, Rivals E, Vingron M. Computational approaches to identify leucine zippers. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(11):2740-6.

Bottius, E., L. BenMohamed, et al. (1996). "A novel *Plasmodium falciparum* sporozoite and liver stage antigen (SALSA) defines major B, T helper, and CTL epitopes." *J Immunol* 156(8): 2874-84.

Bouharoun-Tayoun, H., P. Attanath, A. Sabchareon, T. Chongsuphajaisiddhi, and P. Druilhe. 1990. Antibodies which protect man against *P. falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion *in vitro* but act in co-operation with monocytes. *J. Exp. Med*. 172: 1633-1641.

Bouharoun-Tayoun, H. and P. Druilhe (1992). "Antibodies in *falciparum* malaria: what matters most, quantity or quality?" *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87 Suppl 3: 229-34.

Bouharoun-Tayoun, H. and P. Druilhe (1992). "Evidence for an isotype imbalance, which may be responsible for the delayed acquisition of protective immunity." *Infect immun* 60: 1473-81.

Bouharoun-Tayoun, H., C. Oeuvray, et al. (1995). "Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages." *J Exp Med* 182(2): 409-18.

Brahimi, K., J. L. Perignon, et al. (1993). "Fast immunopurification of small amounts of specific antibodies on peptides bound to ELISA plates." *J Immunol Methods* 162(1): 69-75.

Burns JM Jr, Belk CC, Dunn PD. A protective glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane protein of *Plasmodium yoelii* trophozoites and merozoites contains two epidermal growth factor-like domains. *Infect Immun.* 2000;68(11):6189-95.

Cavanagh, D.R., C. Dobano, I. M. Elhassan, K. Marsh, A. Elhassan, L. Hviid, E. A.Khalil, T. G. Theander, D. E. Arnot, and J. S. McBride. 2001. Differential patterns of human immunoglobulin G subclass responses to distinct regions of a single protein, the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 69: 1207-1211.

Chattopadhyay R, Sharma A, Srivastava VK, Pati SS, Sharma SK, Das BS, Chitnis CE. *Plasmodium falciparum* infection elicits both variant-specific and cross-reactive antibodies against variant surface antigens. *Infect Immun.* 2003;71(2):597-604.

Cohen S, McGregor IA, Carrington S. Gamma globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 1961; 192: 733-7.

Cowman AF, Crabb BS. The *Plasmodium falciparum* genome--a blueprint for erythrocyte invasion. *Science.* 2002;298(5591):126-8.

Dame, J. B., J. L. Williams, et al. (1984). "Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Science* 225(4662): 593-9.

Daubersies, P., A. W. Thomas, et al. (2000). "Protection against *Plasmodium falciparum* malaria in chimpanzees by immunization with the conserved pre-erythrocytic liver-stage antigen 3." *Nat Med* 6(11): 1258-63.

David PH, Hudson DE, Hadley TJ, Klotz FW, Miller LH. Immunization of monkeys with a 140 kilodalton merozoite surface protein of *Plasmodium knowlesi* malaria: appearance of alternate forms of this protein. *J Immunol.* 1985;134(6):4146-52.

- De Stricker, K., J. Vuust, et al. (2000). "Conservation and heterogeneity of the glutamate-rich protein (GLURP) among field isolates and laboratory lines of *Plasmodium falciparum*." Mol Biochem Parasitol 111(1): 123-30.
- Dodoo, D., T. G. Theander, et al. (1999). "Levels of antibody to conserved parts of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in Ghanaian children are not associated with protection from clinical malaria." Infect Immun 67(5): 2131-7.
- Dodoo, D., M. Theisen, et al. (2000). "Naturally acquired antibodies to the glutamate-rich protein are associated with protection against *Plasmodium falciparum* malaria." J Infect Dis 181(3): 1202-5.
- Druilhe P, Bouharoun-Tayoun H. Human antibody subclass ELISA. *Methods Mol Med*. 2002;72:457-9.
- Druilhe P, Khusmith S. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of *Plasmodium falciparum* and malaria-immune status. *Infect Immun*. 1987;55(4):888-91.
- Druilhe P, Spertini F, Soe Soe D, Corradin GP, Mejia P, Singh S, Audran R, Cachat M, Leroy O, Oeuvray C. A malaria vaccine that elicits antibodies able to kill *P. falciparum* (manuscript under preparation).
- Duraisingh MT, Triglia T, Ralph SA, Rayner JC, Barnwell JW, McFadden GI, Cowman AF. Phenotypic variation of *Plasmodium falciparum* merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. *EMBO J*. 2003;22(5):1047-57.
- Edozien JC, Gilles HM, Udeozo IO. Adult and cord-blood gamma globulin and immunity to malaria in Nigerians. *Lancet* 1962; ii: 951-5.
- Egan, A. F., J. Morris, et al. (1996). "Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-

terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1." J Infect Dis 173(3): 765-9.

Egan AF, Burghaus P, Druilhe P, Holder AA, Riley EM. Human antibodies to the 19kDa C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth *in vitro*. *Parasite Immunol.* 1999; 21: 133-9.

Escalante, A. A., H. M. Grebert, et al. (2001). "Polymorphism in the gene encoding the apical membrane antigen-1 (AMA-1) of *Plasmodium falciparum*. X. Asembo Bay Cohort Project." Mol Biochem Parasitol 113(2): 279-87.

Fernandez V, Hommel M, Chen Q, Hagblom P, Wahlgren M. Small, clonally variant antigens expressed on the surface of the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte are encoded by the rif gene family and are the target of human immune responses. *J Exp Med.* 1999;190(10):1393-404.

Fidock, D. A., E. Bottius, et al. (1994). "Cloning and characterization of a novel *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigen, STARP." Mol Biochem Parasitol 64(2): 219-32.

Fonjungo, P. N., I. M. Elhassan, D. R. Cavanagh, T. G. Theander, L. Hviid, C. Roper, D. E. Arnot, and J. S. McBride. 1999. A longitudinal study of human antibody responses to *Plasmodium falciparum* rhoptry-associated protein 1 in a region of seasonal and unstable malaria transmission. *Infect. Immun.* 67: 2975-2985.

Galinski MR, Ingravallo P, Corredor-Medina C, Al-Khedery B, Pova M, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* merozoite surface proteins-3beta and 3gamma share structural similarities with *P. vivax* merozoite surface protein-3alpha and define a new gene family. *Mol Biochem Parasitol.* 2001;115(1):41-53.

- Gerraud, O., and T. B. Nutman. 1996. The roles of cytokines on human B-cell differentiation into immunoglobulin secreting cells. *Bull. Inst. Pasteur* 94: 285-309.
- Gerraud, O., R. Perraut, A. Diouf, W. S. Nambei, A. Tall, A. Spiegel, S. Longacre, D. C. Kaslow, H. Jouin, D. Mattei, G. M. Engler, T. B. Nutman, E. M. Riley, and O. Mercereau-Puijalon. 2002. Regulation of antigen-specific immunoglobulin G subclasses in response to conserved and polymorphic *Plasmodium falciparum* antigens in an *in vitro* model. *Infect. Immun.* 70: 2820-2827.
- Gras-Masse, H., B. Georges, et al. (1999). "Convergent peptide libraries, or mixotopes, to elicit or to identify specific immune responses." Curr Opin Immunol 11(2): 223-8.
- Groux H, Gysin J. Opsonisation as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* : functional role of IgG subclasses. *Res Immunol* 1990; 141: 532-42.
- Guerin-Marchand, C., P. Druilhe, et al. (1987). "A liver-stage-specific antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by gene cloning." Nature 329(6135): 164-7.
- Huber, W., I. Felger, et al. (1997). "Limited sequence polymorphism in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3." Mol Biochem Parasitol 87(2): 231-4.
- Hisaeda, H., A. Saul, J. J. Reece, M. C. Kennedy, C. A. Long, L. H. Miller, and A.W. Stowers. 2002. Merozoite surface protein-3 and protection against malaria in *Aotus nancymai* monkeys. *J. Infect. Dis.* 185: 657-64.
- Kaneko O, Fidock DA, Schwartz OM, Miller LH. Disruption of the C-terminal region of EBA-175 in the Dd2/Nm clone of *Plasmodium falciparum*

does not affect erythrocyte invasion. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;110(1):135-46.

Khusmith, S. and P. Druilhe (1983). "Cooperation between antibodies and monocytes that inhibit in vitro proliferation of *Plasmodium falciparum*." *Infect Immun* 41(1): 219-23.

Knapp, B., E. Hundt, et al. (1989). "Molecular cloning, genomic structure and localization in a blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by a serine stretch." *Mol Biochem Parasitol* 32(1): 73-83.

Lunel, F. and P. Druilhe (1989). "Effector cells involved in nonspecific and antibody-dependent mechanisms directed against *Plasmodium falciparum* blood stages in vitro." *Infect Immun* 57(7): 2043-9.

Lupas A, Van Dyke M, Stock J. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*. 1991;252(5010):1162-4.

Marshall, V. M., W. Tieqiao, et al. (1998). "Close linkage of three merozoite surface protein genes on chromosome 2 of *Plasmodium falciparum*." *Mol Biochem Parasitol* 94(1): 13-25.

Mattei, D., K. Berzins, M. Wahlgren, R. Udomsangpetch, P. Perlmann, H. W. Griesser, A. Scherf, B. Muller-Hill, S. Bonnefoy, M. Guillotte, G. Langsley, L. H. Pereira da Silva and O. Mercereau-Puijalon. 1989. Cross-reactive antigenic determinants present on different *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens. *Parasite Immunol*. 11:15-29.

McColl, D. J. and R. F. Anders (1997). "Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 (MSP-3)." *Mol Biochem Parasitol* 90(1): 21-31.

McColl DJ, Silva A, Foley M, Kun JF, Favaloro JM, Thompson JK, Marshall VM, Coppel RL, Kemp DJ, Anders RF. Molecular variation in a novel

polymorphic antigen associated with *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol*. 1994;68(1):53- 67.

McGregor IA, Wilson, RJM. Specific immunity: acquired in man. In: Wernsdorfer WH, McGregor IA ed. *Malaria: Principles and Practice of Malariology*. Churchill Livingstone 1989: 559-619.

Mello K, Daly TM, Morrissey J, Vaidya AB, Long CA, Bergman LW. A multigene family that interacts with the amino terminus of plasmodium MSP-1 identified using the yeast two-hybrid system. *Eukaryot Cell*. 2002;1(6):915-25.

Miller SK, Good RT, Drew DR, Delorenzi M, Sanders PR, Hodder AN, Speed TP, Cowman AF, de Koning-Ward TF, Crabb BS. A subset of *Plasmodium falciparum* SERA genes are expressed and appear to play an important role in the erythrocytic cycle. *J Biol Chem*. 2002;277(49):47524-32.

Miller, L. H., T. Roberts, et al. (1993). "Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1)." *Mol Biochem Parasitol* 59(1): 1-14.

Mills KE, Pearce JA, Crabb BS, Cowman AF. Truncation of merozoite surface protein 3 disrupts its trafficking and that of acidic-basic repeat protein to the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Microbiol*. 2002;43(6):1401-11.

Moreno A, Badell E, van Rooijen N, Druilhe P. Human malaria in immunocompromised mice: new *in vivo* model for chemotherapy studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1847-53.

Oeuvray, C., H. Bouharoun-Tayoun, et al. (1994). "Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes." *Blood* 84(5): 1594-602.

Oouvray, C., M. Theisen, et al. (2000). "Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal." Infect Immun 68(5): 2617-20.

Pearce, J. A., T. Triglia, A. N. Hodder, D. C. Jackson, A. F. Cowman, and R. F. Anders. 2004. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 6 is a dimorphic antigen. *Infect. Immun.* 72: 2321-2328.

Peterson, M. G., V. M. Marshall, et al. (1989). "Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*." Mol Cell Biol 9(7): 3151-4.

Pleass, R. J. and J. M. Woof (2001). "Fc receptors and immunity to parasites." Trends Parasitol 17(11): 545-51.

Polley SD, Tetteh KK, Cavanagh DR, et al, Repeat sequences in block 2 of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 are targets of antibodies associated with protection from malaria. *Infect Immun* 2003; 71: 1833-42.

Reed MB, Caruana SR, Batchelor AH, Thompson JK, Crabb BS, Cowman AF. Targeted disruption of an erythrocyte binding antigen in *Plasmodium falciparum* is associated with a switch toward a sialic acid-independent pathway of invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(13):7509-14.

Robson, K. J., J. R. Hall, et al. (1988). "A highly conserved amino-acid sequence in thrombospondin, properdin and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite." Nature 335(6185): 79-82.

Roggero MA, Servis C, Corradin G. A simple and rapid procedure for the purification of synthetic polypeptides by a combination of affinity chromatography and methionine chemistry. *FEBS Lett* 1997; 408: 285-8.

Roussillon, C. (1999). "Correlates of Immune protection in malaria." MIM African Malaria Conference, 14-19 March, Durban South Africa.

Rzepczyk, C. M., K. Hale, N. Woodroffe, A. Bobogare, P. Csurhes, A. Ishii, and A. Ferrante. 1997. Humoral immune responses of Solomon Islanders to the merozoite surface antigen 2 of *Plasmodium falciparum* show pronounced skewing towards antibodies of the immunoglobulin G3 subclass. *Infect. Immun.* 65: 1098-1100.

Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, Foucault C, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;45(3):297-308.

Scherf A, Hernandez-Rivas R, Buffet P, Bottius E, Benatar C, Pouvelle B, Gysin J, Lanzer M. Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J.* 1998;17(18):5418-26.

Sergent E, Parrot L. L'immunité, la prémunition et la résistance innée. *Arch Inst Pasteur Alger* 1935; 23: 279-319.

Simmons, D., G. Woollett, et al. (1987). "A malaria protein exported into a new compartment within the host erythrocyte." *Embo J* 6(2): 485-91.

Singh S, Soe S, Mejia JP, Roussilhon C, Theisen M, Corradin G, Druilhe P. Identification of a Conserved Region of *Plasmodium falciparum* MSP3 Targeted by Biologically Active Antibodies to Improve Vaccine Design. *J Infect Dis.* 2004;190(5):1010-8.

Singh S, Soe S, Mejia JP, Roussilhon C, Theisen M, Corradin G, Druilhe P. *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein-6 displays multiple targets for naturally occurring antibodies mediating monocyte-dependent parasite killing. (*Manuscript communicated*, article-II, this report).

Soe, S., A. Khin Saw, et al. (2001). "Premunition against *Plasmodium falciparum* in a malaria hyperendemic village in Myanmar." Trans R Soc Trop Med Hyg 95(1): 81-4.

Soe S, Theisen M, Roussilhon C, Aye KS, Druilhe P. Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar: complementarity between responses to merozoite surface protein 3 and the 220-kilodalton glutamate-rich protein. *Infect Immun*. 2004;72(1):247-52.

Stavnezer J. Antibody class switching. *Adv Immunol* 1996; 61: 79-146.

Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, Ravetch JA, Wellems TE. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell*. 1995;82(1):89-100.

Taylor, R. R., S. J. Allen, B. M. Greenwood, and E. M. Riley. 1995. IgG3 antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 (MSP2): increasing prevalence with age and association with clinical immunity to malaria. *Infect. Immun*. 63: 4382-4388.

Taylor RR, Smith DB, Robinson VJ, McBride JS, Riley EM. Human antibody response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is serogroup specific and predominantly of the immunoglobulin G3 subclass. *Infect Immun* 1995; 63: 4382-8.

Theisen, M., D. Dodo, et al. (2001). "Selection of glutamate-rich protein long synthetic peptides for vaccine development: antigenicity and relationship with clinical protection and immunogenicity." Infect Immun 69(9): 5223-9.

Theisen, M., S. Soe, et al. (2000). "Identification of a major B-cell epitope of the *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein (GLURP), targeted by human antibodies mediating parasite killing." Vaccine 19(2-3): 204-12.

Theisen, M., S. Soe, et al. (1998). "The glutamate-rich protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth in vitro." Infect Immun 66(1): 11-7.

Theisen M, Vuust J, Gottschau A, Jepsen S, Hogh B. Antigenicity and immunogenicity of recombinant glutamate-rich protein of *Plasmodium falciparum* expressed in *Escherichia coli*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1995;2(1):30-4.

Thomas, A. W., D. A. Carr, et al. (1990). "Sequence comparison of allelic forms of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen MSA2." Mol Biochem Parasitol 43(2): 211-20.

Trape JF, Rogier C, Konate L, et al, The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51:123-37.

Trucco, C., D. Fernandez-Reyes, et al. (2001). "The merozoite surface protein 6 gene codes for a 36 kDa protein associated with the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 complex." Mol Biochem Parasitol 112(1): 91-101.

Tun-Lin, W., M. M. Thu, et al. (1995). "Hyperendemic malaria in a forested, hilly Myanmar village." J Am Mosq Control Assoc 11(4): 401-7.

Wang, L., L. Crouch, T. L. Richie, D. H. Nhan, and R. L. Coppel. 2003. Naturally acquired antibody responses to the components of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 complex. *Parasite Immunol*. 25: 403-412.

Weisman, S., L. Wang, H. Billman-Jacobe, D. H. Nhan, T. L. Richie and R. L. Coppel. 2001. Antibody responses in patients infected with strains of *Plasmodium falciparum* expressing diverse forms of merozoite surface protein 2. *Infect. Immun*. 69: 959-967.

Wolf E, Kim PS, Berger B. MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils. *Protein Sci.* 1997;6(6):1179-89.

<110> MSP-3 样基因家族

<120> 巴斯德研究院

<130> B5767A - AD/ES/KP

<140> New International Patent Application

<141> 2004-10-22

<160> 30

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1065

<212> DNA

<213> Plasmodium Falciparum

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1065)

<223> MSP 3.1

<400> 1

```

atgaaaagtt ttataaatat tactctttca ttatTTTTgt tacatttata tatttatata      60
aataatgttg ctagtaaaga aattgtaaaa aaatataatc ttaacttaag aaatgcaata      120
ttgaataata attctcaaat agaaaatgaa gaaaatgtaa atactacaat tactggtaat      180
gatttttagtg gtggagaatt tttgtggcct gggttatacgg aagaattaaa agctaaaaaa      240
gcttccgaag atgctgaaaa agctgcta atgatgctgaaa atgcttcaaa agaggcagaa      300
gaagctgcta aagaagcagt aaattttaag gaatctgata aatcttatac aaaagcaaaa      360
gaagcatgta cagctgcttc aaaggcaaag aaagctgttg aaactgcttt aaaggcaaaa      420
gatgatgctg aaaaatcttc aaaagctgat agtattttcta caaaaacaaa agaatatgct      480
gaaaaagcaa aaaatgctta tgaaaaggca aaaaatgctt atcaaaaagc aaaccaagct      540
gtttttaaag caaaagaagc ttctagttat gatttatatt taggttggga atttgaggga      600
ggcgttccag aacacaaaaa agaagaaaat atgttatcac atttatatgt ttcttcaaa      660
gataaggaaa atatattctaa ggaaaatgat gatgtattag atgagaagga agaagaggca      720
gaagaaacag aagaagaaga acttgaagaa aaaaatgaag aagaaacaga atcagaaata      780
agtgaagatg aagaagaaga agaagaagaa gaagaaaagg aagaagaaaa tgacaaaaaa      840
aaagaacaag aaaaagaaca aagtaatgaa aataatgata aaaaaaaga tatggaagca      900
cagaatttaa tttctaaaaa ccagaataat aatgagaaaa acgtaaaaga agctgctgaa      960
agcatcatga aaactttagc tggtttaatc aagggaata atcaaataga ttctacctta     1020
aaagatttag tagaagaatt atccaaatat tttaaaaatc attaa                       1065

```

<210> 2

<211> 354

<212> PRT

<213> Plasmodium Falciparum

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(354)

<223> MSP 3.1

<400> 2

Met Lys Ser Phe Ile Asn Ile Thr Leu Ser Leu Phe Leu Leu His Leu
1 5 10 15Tyr Ile Tyr Ile Asn Asn Val Ala Ser Lys Glu Ile Val Lys Lys Tyr
20 25 30Asn Leu Asn Leu Arg Asn Ala Ile Leu Asn Asn Asn Ser Gln Ile Glu
35 40 45Asn Glu Glu Asn Val Asn Thr Thr Ile Thr Gly Asn Asp Phe Ser Gly
50 55 60Gly Glu Phe Leu Trp Pro Gly Tyr Thr Glu Glu Leu Lys Ala Lys Lys
65 70 75 80Ala Ser Glu Asp Ala Glu Lys Ala Ala Asn Asp Ala Glu Asn Ala Ser
85 90 95Lys Glu Ala Glu Glu Ala Ala Lys Glu Ala Val Asn Leu Lys Glu Ser
100 105 110Asp Lys Ser Tyr Thr Lys Ala Lys Glu Ala Cys Thr Ala Ala Ser Lys
115 120 125Ala Lys Lys Ala Val Glu Thr Ala Leu Lys Ala Lys Asp Asp Ala Glu
130 135 140Lys Ser Ser Lys Ala Asp Ser Ile Ser Thr Lys Thr Lys Glu Tyr Ala
145 150 155 160Glu Lys Ala Lys Asn Ala Tyr Glu Lys Ala Lys Asn Ala Tyr Gln Lys
165 170 175Ala Asn Gln Ala Val Leu Lys Ala Lys Glu Ala Ser Ser Tyr Asp Tyr
180 185 190Ile Leu Gly Trp Glu Phe Gly Gly Gly Val Pro Glu His Lys Lys Glu
195 200 205Glu Asn Met Leu Ser His Leu Tyr Val Ser Ser Lys Asp Lys Glu Asn
210 215 220Ile Ser Lys Glu Asn Asp Asp Val Leu Asp Glu Lys Glu Glu Glu Ala
225 230 235 240

Glu Glu Thr Glu Glu Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Glu Glu Glu Thr

Asn His

```
<210> 3
<211> 1116
<212> DNA
<213> Plasmodium Falciparum
```

```
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1116)
<223> MSP 3,2
```

<400>	3					
atgaataaga	tttataatat	tactttttctt	ttcattcttt	taaacttata	tataaatgaa	60
aataacttta	tcagaaatga	acttataaac	gaaaaaaacc	ataatttaag	aaatggttca	120
atgtataata	acgataaaat	attaagtaaa	aatgaagtag	atactaatat	agaaagtaac	180
gaaaatagta	ttcacgaatc	tggacataag	attgatgggg	agaaggtttt	aaaagctaata	240
gtagatgata	taacatacaa	aaaaaaaaat	gttgatgatt	cagaaattcc	tttttctggt	300
tatgatatac	aagcaacata	tcaatttcct	tctacatcag	gaggaaataa	tgtaattcca	360
cttcctataa	aacaaagtgg	agaaaatcaa	tatactgtta	catctatatc	aggtattcaa	420
aagggagcaa	atggtttaac	tgggtgaaca	gaaaatatta	cacaagttgt	acaagcaaac	480
tctgaaacaa	ataaaaatcc	tactttctcat	agtaatagta	ctacaacttc	tctgaataat	540
aatatacttg	gatgggaatt	tggaggaggt	gctcctcaa	atggagctgc	agaagataaa	600
aagacagaat	atttactaga	acaaataaaa	attccatcat	gggatagaaa	taacatcccc	660
gatgagaatg	aacaagtaat	agaggaccct	caagaagata	ataaagatga	agatgaagat	720
gaagaaacag	aaacagaaaa	tttggaacaa	gaagatgata	ataatgaaga	gatagaagaa	780

```

aatgaagaag atgacataga tgaagaaagt gtagaagaaa aggaagaaga ggaagaaaaa   840
aaggaagaag aagaaaaaaa ggaagaaaaa aaagaagaaa aaaaaccaga caatgaaatt   900
acaaatgaag ttaaagagga acaaaaatat agttcaccaa gtgatataaa tgcccaaat    960
ttaatttcta ataagaataa aaagaatgat gaaacaaaaa agactgctga aaatatagtt  1020
aaaacattgg ttggattatt taatgaaaaa aatgagatag attctactat aaataattta  1080
gtacaagaaa tgatccatct atttagtaat aattaa                               1116

```

```

<210> 4
<211> 371
<212> PRT
<213> Plasmodium Falciparum

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(371)
<223> MSP 3.2

```

```

<400> 4

```

```

Met Asn Lys Ile Tyr Asn Ile Thr Phe Leu Phe Ile Leu Leu Asn Leu
1           5           10           15

```

```

Tyr Ile Asn Glu Asn Asn Phe Ile Arg Asn Glu Leu Ile Asn Glu Lys
          20           25           30

```

```

Asn His Asn Leu Arg Asn Gly Ser Met Tyr Asn Asn Asp Lys Ile Leu
          35           40           45

```

```

Ser Lys Asn Glu Val Asp Thr Asn Ile Glu Ser Asn Glu Asn Ser Ile
          50           55           60

```

```

His Glu Ser Gly His Lys Ile Asp Gly Glu Glu Val Leu Lys Ala Asn
65           70           75           80

```

```

Val Asp Asp Ile Thr Tyr Lys Lys Lys Asn Val Asp Asp Ser Glu Ile
          85           90           95

```

```

Pro Phe Ser Gly Tyr Asp Ile Gln Ala Thr Tyr Gln Phe Pro Ser Thr
          100          105          110

```

```

Ser Gly Gly Asn Asn Val Ile Pro Leu Pro Ile Lys Gln Ser Gly Glu
          115          120          125

```

```

Asn Gln Tyr Thr Val Thr Ser Ile Ser Gly Ile Gln Lys Gly Ala Asn
          130          135          140

```

```

Gly Leu Thr Gly Ala Thr Glu Asn Ile Thr Gln Val Val Gln Ala Asn
145          150          155          160

```

```

Ser Glu Thr Asn Lys Asn Pro Thr Ser His Ser Asn Ser Thr Thr Thr
          165          170          175

```

Ser Leu Asn Asn Asn Ile Leu Gly Trp Glu Phe Gly Gly Gly Ala Pro
 180 185 190
 Gln Asn Gly Ala Ala Glu Asp Lys Lys Thr Glu Tyr Leu Leu Glu Gln
 195 200 205
 Ile Lys Ile Pro Ser Trp Asp Arg Asn Asn Ile Pro Asp Glu Asn Glu
 210 215 220
 Gln Val Ile Glu Asp Pro Gln Glu Asp Asn Lys Asp Glu Asp Glu Asp
 225 230 235 240
 Glu Glu Thr Glu Thr Glu Asn Leu Glu Thr Glu Asp Asp Asn Asn Glu
 245 250 255
 Glu Ile Glu Glu Asn Glu Glu Asp Asp Ile Asp Glu Glu Ser Val Glu
 260 265 270
 Glu Lys Glu Glu Glu Glu Glu Lys Lys Glu Glu Glu Glu Lys Lys Glu
 275 280 285
 Glu Lys Lys Glu Glu Lys Lys Pro Asp Asn Glu Ile Thr Asn Glu Val
 290 295 300
 Lys Glu Glu Gln Lys Tyr Ser Ser Pro Ser Asp Ile Asn Ala Gln Asn
 305 310 315 320
 Leu Ile Ser Asn Lys Asn Lys Lys Asn Asp Glu Thr Lys Lys Thr Ala
 325 330 335
 Glu Asn Ile Val Lys Thr Leu Val Gly Leu Phe Asn Glu Lys Asn Glu
 340 345 350
 Ile Asp Ser Thr Ile Asn Asn Leu Val Gln Glu Met Ile His Leu Phe
 355 360 365
 Ser Asn Asn
 370

<210> 5
 <211> 1275
 <212> DNA
 <213> Plasmodium Falciparum

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1275)
 <223> MSP 3.3

<400> 5
 atgaaaaaaa tcgtgaatat aatattttat atcttatatt tatatatata taaaagaaac 60
 ttagtacaaa acgaaaatgt aaataaatct aatctaagaa aaggattatc tactaataat 120

```

tcagaaaatg gaataaaaag tctaaaggat gaagatgaac atattaatat tataggagat 180
gatttttcag cattttctta tgggtggttat cctatttatg aaactacagg aagtctagga 240
actgggggttg aaagtgtaaa agctattgat ggggaaagtg gtacttcaat ggattctaaa 300
cctaaagaga ataaaattag tactgaacca ggagcagacc aggtgtctat tggattgggtc 360
aacgaatctg atagtagttt agaaaatgat aaaaaaaaaa aagaaaacgt aaaaaaagaa 420
atgcttggtta ctgaaaagga aggttctcca gatagtcatg atagttctaa ggaaaaatta 480
aatcttaacg acaattccaa atgggtctgat tttcttaaaa atatcgtaac gtttggtggt 540
tttggtccta ctgtggttca tgatgttagt gatacccttt cagatatatc taaagatgaa 600
gttactcaaa aaacaactaa agatattggt agtactttac ttgacttttt tttaccatta 660
ccgactaaaa acactaatac atatgagaag aaaaatgaaa ataaaaatgt atcaaagtga 720
gattcaaaaa caaatcaaa tgaaaaagga agacctccta catattctcc tattctggat 780
gatgggatag aatttagtgg tggtttatat tttaatgaga aaaagtcgac tgaagaaaat 840
aaacaaaaaa atgtttttaga atcagtaa ataacatcgt gggataaaga ggatattggt 900
aaggaaaatg aggatgttaa agatgaaaag gatgaagatg atgaagaaga agaagaaaaa 960
tacgaaaacg aaattataaa gcaaccagaa gacatattgg atgaggaaga agtattagaa 1020
gaagaaatat tagaagaaaa taaaaatgat acagtagata caagtgattt agaaaagaaa 1080
aatataccag atttatcaaa cgataataat tattatagtt taatttataa gaactataag 1140
gataatgata aatcagaaaa aactgcacaa acattaatca cagctctgat aagtttatta 1200
aatggaaaaa atgaattaga tgctaccata agaagattaa aacatagggt tatggaattt 1260
tttacatata attaa 1275

```

<210> 6
 <211> 424
 <212> PRT
 <213> Plasmodium Falciparum

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(424)
 <223> MSP 3.3

<400> 6

Met Lys Lys Ile Val Asn Ile Ile Phe Tyr Ile Leu Tyr Leu Tyr Ile
1 5 10 15

Tyr Lys Arg Asn Leu Val Gln Asn Glu Asn Val Asn Lys Ser Asn Leu
20 25 30

Arg Lys Gly Leu Ser Thr Asn Asn Ser Glu Asn Gly Ile Lys Ser Leu
35 40 45

Lys Asp Glu Asp Glu His Ile Asn Ile Ile Gly Asp Asp Phe Ser Ala
50 55 60

Phe Ser Tyr Gly Gly Tyr Pro Ile Tyr Glu Thr Thr Gly Ser Leu Gly
 65 70 75 80
 Thr Gly Val Glu Ser Val Lys Ala Ile Asp Gly Glu Ser Gly Thr Ser
 85 90 95
 Met Asp Ser Lys Pro Lys Glu Asn Lys Ile Ser Thr Glu Pro Gly Ala
 100 105 110
 Asp Gln Val Ser Ile Gly Leu Val Asn Glu Ser Asp Ser Ser Leu Glu
 115 120 125
 Asn Asp Lys Lys Lys Lys Glu Asn Val Lys Lys Glu Met Leu Gly Thr
 130 135 140
 Glu Lys Glu Gly Ser Pro Asp Ser His Asp Ser Ser Lys Glu Lys Leu
 145 150 155 160
 Asn Leu Asn Asp Asn Ser Lys Trp Ser Asp Phe Leu Lys Asn Ile Val
 165 170 175
 Thr Phe Gly Gly Phe Gly Pro Thr Val Val His Asp Val Ser Asp Thr
 180 185 190
 Leu Ser Asp Ile Ser Lys Asp Glu Val Thr Gln Lys Thr Thr Lys Asp
 195 200 205
 Ile Gly Ser Thr Leu Leu Asp Phe Phe Leu Pro Leu Pro Thr Lys Asn
 210 215 220
 Thr Asn Thr Tyr Glu Lys Lys Asn Glu Asn Lys Asn Val Ser Asn Val
 225 230 235 240
 Asp Ser Lys Thr Lys Ser Asn Glu Lys Gly Arg Pro Pro Thr Tyr Ser
 245 250 255
 Pro Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Phe Ser Gly Gly Leu Tyr Phe Asn
 260 265 270
 Glu Lys Lys Ser Thr Glu Glu Asn Lys Gln Lys Asn Val Leu Glu Ser
 275 280 285
 Val Asn Leu Thr Ser Trp Asp Lys Glu Asp Ile Val Lys Glu Asn Glu
 290 295 300
 Asp Val Lys Asp Glu Lys Asp Glu Asp Asp Glu Glu Glu Glu Glu Lys
 305 310 315 320
 Tyr Glu Asn Glu Ile Ile Lys Gln Pro Glu Asp Ile Leu Asp Glu Glu
 325 330 335

Glu Val Leu Glu Glu Glu Ile Leu Glu Glu Asn Lys Asn Asp Thr Val
340 345 350

Asp Thr Ser Asp Leu Glu Lys Lys Asn Ile Pro Asp Leu Ser Asn Asp
355 360 365

Asn Asn Tyr Tyr Ser Leu Ile Tyr Lys Asn Tyr Lys Asp Asn Asp Lys
370 375 380

Ser Glu Lys Thr Ala Gln Thr Leu Ile Thr Ala Leu Ile Ser Leu Leu
385 390 395 400

Asn Gly Lys Asn Glu Leu Asp Ala Thr Ile Arg Arg Leu Lys His Arg
405 410 415

Phe Met Glu Phe Phe Thr Tyr Asn
420

<210> 7
<211> 2094
<212> DNA
<213> Plasmodium Falciparum

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2094)
<223> MSP 3.4

<400> 7
atgaagaaaa tatatagtat tttcttttct ttattttattt tgaatcttca tatatatata 60
aaaaatatca aatgcaatga cctaataaat tataatgatt cgaatctaag aaacggatta 120
ctaaataata gtttagattt aacaaatgga ttaaataaca aagataacag ttttattgat 180
tctaaaattg aagaacatga aaataaatct taccaaaaata aagataataa tatctctatc 240
gttggacaag atgtgcctat tacatcggtat tattcttcta aaattataaa tgctaattgat 300
ttagaaggaa atagtattga cgatactaaa ggtcttagtg ttactaatag tggatttgat 360
gatggtagtg cttttggtgg tggactccct ttttctgggt attctcctct acaaggaaat 420
cataataaat gtcctgatga aaatttttgt aagggtatta aaaatgtctt atcctgtcct 480
ccaaaaaatt ctactggtag aaatggggat tggatttagtg tggctgttaa agaaagttca 540
actacaaata aagggtgttct tgttcccccc agaagaacaa aattatgtct aagaaatatt 600
aacaagggtt ggcacgaat caaagacgag aaaaatttta aagaagaatt tgtaaagtt 660
gctttaggag aatcaaatgc tttaatgaaa cattataaag aaaaaaatct gaatgccctt 720
acagctataa aatatggatt ttcagatatg ggagatataa taaaggaac agacctaatt 780
gactatcaaa ttactaaaaa tataaatagg gcattagata aaatattacg taatgaaaca 840
agtaatgaca aaattaaaaa acgtgtagac tggtggaag ctaataaaaag tgcattctgg 900
gatgcattca tgtgtggata taaagttcat atcggaaata aaccatgtcc agaacatgat 960
aatatggaca gaataccaca atatcttaga tggtttagag aatggggaac atatgtttgc 1020

```

agcgaatata aaaataagtt tgaggatgta ataaaattat gtaatatcca acaatttaca 1080
aaccaggatg attcacaact attagaaata tcaaaaaagg ataatgttaa agaagcatta 1140
aagcattatg aagaatgggt taatagaagg agacctgaat ggaaaggcca atgtgataaa 1200
tttgaaaaag aaaaaagtaa atatgaagat actaaaagta taactgctga aaaatatitta 1260
aaagaaatat gttctgaatg tgattgtaaa tataaagatt tggataatac atttaaagaa 1320
tttaaagata acgttacact tcttaaagca gtaattgata acaaaaaaaaa tcaagattct 1380
ctaacaacca cttctttatc aacgtctatt aatagtgtta gggattctag taatctagat 1440
caacgaggga atataacaac atctcaagga aattcacacc gtgcaactgt tgtgcaacaa 1500
gttgatcaaa ccaacagatt agataatgta aactctgtaa cgcaaaggagg aaataataac 1560
tacaacaata atttagagcg tggattgggt tctggtgctc ttcctggtac aaatattatt 1620
actgaagaaa aatatttctt agaattaata aaattaacat caaaggatga agaagatatt 1680
ataaagcata atgaggatgt gagagaagaa atagaagaac aacaagaaga catcgaggaa 1740
gatgaagaag aattggaaaa tgaaggagaa gaaacaaaag aagaagatga tgaagaaaag 1800
aatgaaacaa atgatacggg agatacggac gatactgaag atacggaaga tatagaagag 1860
gaaaataagg aaaaagaact cagtaatcaa caacaaagtg aaaaaaaaag tatttcaaaa 1920
gttgacgaag attcatatcg aatactatca gtaagttata aggacaataa tgaagtaaaa 1980
aatgttgctg aatctatagt gaaaaaacta ttagttttat ttaatgataa taataatttg 2040
gaaactattt ttaagggttt gacagaagat atgacagatt tatttcaaaa ataa 2094

```

```

<210> 8
<211> 697
<212> PRT
<213> Plasmodium Falciparum

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(697)
<223> MSP 3.4

```

```
<400> 8
```

```
Met Lys Lys Ile Tyr Ser Ile Phe Phe Ser Leu Phe Ile Leu Asn Leu
1           5           10           15

```

```
His Ile Tyr Ile Lys Asn Ile Lys Cys Asn Asp Leu Ile Asn Tyr Asn
20           25           30

```

```
Asp Ser Asn Leu Arg Asn Gly Leu Leu Asn Asn Ser Leu Asp Leu Thr
35           40           45

```

```
Asn Gly Leu Asn Asn Lys Asp Asn Ser Phe Ile Asp Ser Lys Ile Glu
50           55           60

```

```
Glu His Glu Asn Lys Ser Tyr Gln Asn Lys Asp Asn Asn Ile Ser Ile
65           70           75           80

```

Val Gly Gln Asp Val Pro Ile Thr Ser Val Tyr Ser Ser Lys Ile Ile
 85 90 95
 Asn Ala Asn Asp Leu Glu Gly Asn Ser Ile Asp Asp Thr Lys Gly Leu
 100 105 110
 Ser Val Thr Asn Ser Gly Phe Asp Asp Gly Ser Ala Phe Gly Gly Gly
 115 120 125
 Leu Pro Phe Ser Gly Tyr Ser Pro Leu Gln Gly Asn His Asn Lys Cys
 130 135 140
 Pro Asp Glu Asn Phe Cys Lys Gly Ile Lys Asn Val Leu Ser Cys Pro
 145 150 155 160
 Pro Lys Asn Ser Thr Gly Arg Asn Gly Asp Trp Ile Ser Val Ala Val
 165 170 175
 Lys Glu Ser Ser Thr Thr Asn Lys Gly Val Leu Val Pro Pro Arg Arg
 180 185 190
 Thr Lys Leu Cys Leu Arg Asn Ile Asn Lys Val Trp His Arg Ile Lys
 195 200 205
 Asp Glu Lys Asn Phe Lys Glu Glu Phe Val Lys Val Ala Leu Gly Glu
 210 215 220
 Ser Asn Ala Leu Met Lys His Tyr Lys Glu Lys Asn Leu Asn Ala Leu
 225 230 235 240
 Thr Ala Ile Lys Tyr Gly Phe Ser Asp Met Gly Asp Ile Ile Lys Gly
 245 250 255
 Thr Asp Leu Ile Asp Tyr Gln Ile Thr Lys Asn Ile Asn Arg Ala Leu
 260 265 270
 Asp Lys Ile Leu Arg Asn Glu Thr Ser Asn Asp Lys Ile Lys Lys Arg
 275 280 285
 Val Asp Trp Trp Glu Ala Asn Lys Ser Ala Phe Trp Asp Ala Phe Met
 290 295 300
 Cys Gly Tyr Lys Val His Ile Gly Asn Lys Pro Cys Pro Glu His Asp
 305 310 315 320
 Asn Met Asp Arg Ile Pro Gln Tyr Leu Arg Trp Phe Arg Glu Trp Gly
 325 330 335
 Thr Tyr Val Cys Ser Glu Tyr Lys Asn Lys Phe Glu Asp Val Ile Lys
 340 345 350

Leu Cys Asn Ile Gln Gln Phe Thr Asn Gln Asp Asp Ser Gln Leu Leu
 355 360 365
 Glu Ile Ser Lys Lys Asp Lys Cys Lys Glu Ala Leu Lys His Tyr Glu
 370 375 380
 Glu Trp Val Asn Arg Arg Arg Pro Glu Trp Lys Gly Gln Cys Asp Lys
 385 390 395 400
 Phe Glu Lys Glu Lys Ser Lys Tyr Glu Asp Thr Lys Ser Ile Thr Ala
 405 410 415
 Glu Lys Tyr Leu Lys Glu Ile Cys Ser Glu Cys Asp Cys Lys Tyr Lys
 420 425 430
 Asp Leu Asp Asn Thr Phe Lys Glu Phe Lys Asp Asn Val Thr Leu Leu
 435 440 445
 Lys Ala Val Ile Asp Asn Lys Lys Asn Gln Asp Ser Leu Thr Thr Thr
 450 455 460
 Ser Leu Ser Thr Ser Ile Asn Ser Val Arg Asp Ser Ser Asn Leu Asp
 465 470 475 480
 Gln Arg Gly Asn Ile Thr Thr Ser Gln Gly Asn Ser His Arg Ala Thr
 485 490 495
 Val Val Gln Gln Val Asp Gln Thr Asn Arg Leu Asp Asn Val Asn Ser
 500 505 510
 Val Thr Gln Arg Gly Asn Asn Asn Tyr Asn Asn Asn Leu Glu Arg Gly
 515 520 525
 Leu Gly Ser Gly Ala Leu Pro Gly Thr Asn Ile Ile Thr Glu Glu Lys
 530 535 540
 Tyr Ser Leu Glu Leu Ile Lys Leu Thr Ser Lys Asp Glu Glu Asp Ile
 545 550 555 560
 Ile Lys His Asn Glu Asp Val Arg Glu Glu Ile Glu Glu Gln Gln Glu
 565 570 575
 Asp Ile Glu Glu Asp Glu Glu Glu Leu Glu Asn Glu Gly Glu Glu Thr
 580 585 590
 Lys Glu Glu Asp Asp Glu Glu Lys Asn Glu Thr Asn Asp Thr Glu Asp
 595 600 605
 Thr Asp Asp Thr Glu Asp Thr Glu Asp Ile Glu Glu Glu Asn Lys Glu
 610 615 620

Lys Glu Leu Ser Asn Gln Gln Gln Ser Glu Lys Lys Ser Ile Ser Lys
625 630 635 640

Val Asp Glu Asp Ser Tyr Arg Ile Leu Ser Val Ser Tyr Lys Asp Asn
645 650 655

Asn Glu Val Lys Asn Val Ala Glu Ser Ile Val Lys Lys Leu Phe Ser
660 665 670

Leu Phe Asn Asp Asn Asn Asn Leu Glu Thr Ile Phe Lys Gly Leu Thr
675 680 685

Glu Asp Met Thr Asp Leu Phe Gln Lys
690 695

<210> 9
<211> 2139
<212> DNA
<213> Plasmodium Falciparum

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2139)
<223> MSP 3.5

<400> 9
atgaaatata tattaagtat tagtcttttt ttaattcttt taaatttata taaatgtgct 60
agtatatcat gtgaaataga ttacaccctt agtaccaata ttactagcaa tttaaattct 120
aatttaagaa gctgttcttc taatcttggt ctttcttcaa atatagattc tactaaatta 180
gaaggaacat atgggtgaaaa tttaaacgac agtgtatctt tgacgaataa tattaatgat 240
catacaacta acgaatcaaa tatatcaaat gtatcaaata tatcaaata atcaaata 300
tcaaataaat caagtataac taaccagtca aatttatcta gcgaaacaaa tatatctagc 360
gaaacaaata tatctaacga atcaagtgtc ccaaataaaa gcagtgtcaa tgaggtacct 420
caacttgaag tacctaaaga tgcagtagaa aatcacacag aatccaaaga tgttttattg 480
aatgaaaagg aaaattttgc aaatggagtg gaaacacatg ttgatctagg atccaagaa 540
caatattttg gatcttccta tgatatgaat atggacacag aaggaggaat aaaaaagttc 600
aaaaatgtgt ttcagtctta ttttaataca tccaaaggaa atagtggtag tgaaggtgat 660
ggatcaagtg tatttgatc catatttggt agcttattaa cccctataga ttcattgtta 720
gaaaaattta taggatctaa caatacaaat tcggattcta atgtgaagaa cacttctatg 780
ggaaatggac aaaataaata cgacaataat atatacttag atgaagaaga tgctttgagt 840
gatgcagaac attataatga tggtagtata agtttaggcg aagaagatga gttgagtgat 900
gcagaacatt ataatgatgg aagtataagt ttagatgaag aagatgagtt gagtgatgca 960
gaacattata atgatggagg tatatgttta ggtgaagaag atgagttaag tgatgcagaa 1020
cattataatg atggaggtat aagtttagat gaagaagatg tgttgagtga tgcagaacat 1080
tataatgatg gagatataag tttagatgaa gatgaggtta gtgatacaga aaattattat 1140

```

gatggaggta taagtttaga cgaatcagat gatttgagtg accccgaaag taaaacaaaa 1200
gaagataact accatttata ttattgggat gattttctatc atgaatataa accaacttat 1260
ttaaattatc atatgcatta tacactttat gaaccaaaaca atttttatga tactactaat 1320
gaagaaacac acaattttta taatactact aatgaagaat cacacaattt ttacaaccct 1380
actcatgaag aatcacacaa tttttacaac cctactcatg aagaatcaca caattttttac 1440
aaccctactc atgaagaatc acacaatttt tacaacccta ctcatgaaga atcacacaat 1500
ttttacaacc ctactcatga agaatcacac aattttttaca accctactca tgaagaatca 1560
cacaattttt acaaccctac tcatgaagaa tcacacaatt tttacaaccc tactcatgaa 1620
gaatcacaca atttttacaa ccctactcat gaagaatcac acaattttta caaccctact 1680
catgaagaat cacacaattt ttacaaccct actcatgaag aatcacacaa tttttacacc 1740
cctactcatg aagaatcaca caattttttac aaccctactc atgaagaatc acacaatttt 1800
tacaacccta ctcatgaaga atcacacaat ttttacaacc ctactcatga agaatcacac 1860
aattttttaca accctactca tgaagaatca cacaattttt acaaccctac tcatgaagaa 1920
tcacacaatt tttacacccc tactcatgat gaattttaatg ttccttttaa ttataacccat 1980
gactacgatt acaattactt tgaaaatgat aattataata ttcaaaatgt taaagacaat 2040
ttggtaaaaa aagttaatga tttcatggaa tcagataatt tattagttaa tacctttaaa 2100
ggtatagctg ggggtgttac tagttttttc ggatattaa 2139

```

```

<210> 10
<211> 712
<212> PRT
<213> Plasmodium Falciparum

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(712)
<223> MSP 3.5

```

```
<400> 10
```

```
Met Lys Tyr Ile Leu Ser Ile Ser Leu Phe Leu Ile Leu Leu Asn Leu
1           5           10           15
```

```
Tyr Lys Cys Ala Ser Ile Ser Cys Glu Ile Asp Tyr Thr Pro Ser Thr
20           25           30
```

```
Asn Ile Thr Ser Asn Leu Asn Ser Asn Leu Arg Ser Cys Ser Ser Asn
35           40           45
```

```
Leu Val Leu Ser Ser Asn Ile Asp Ser Thr Lys Leu Glu Gly Thr Tyr
50           55           60
```

```
Gly Glu Asn Leu Asn Asp Ser Val Ser Leu Thr Asn Asn Ile Asn Asp
65           70           75           80
```

His Thr Thr Asn Glu Ser Asn Ile Ser Asn Val Ser Asn Ile Ser Asn
 85 90 95
 Glu Ser Asn Ile Ser Asn Glu Ser Ser Ile Thr Asn Gln Ser Asn Leu
 100 105 110
 Ser Ser Glu Thr Asn Ile Ser Ser Glu Thr Asn Ile Ser Asn Glu Ser
 115 120 125
 Ser Val Pro Asn Glu Ser Ser Val Asn Glu Val Pro Gln Leu Glu Val
 130 135 140
 Pro Lys Asp Ala Val Glu Asn His Thr Glu Ser Lys Asp Val Leu Leu
 145 150 155 160
 Asn Glu Lys Glu Asn Phe Ala Asn Gly Val Glu Thr His Val Asp Leu
 165 170 175
 Gly Ser Gln Glu Gln Tyr Phe Gly Ser Ser Tyr Asp Met Asn Met Asp
 180 185 190
 Thr Glu Gly Gly Ile Lys Lys Phe Lys Asn Val Phe Gln Ser Tyr Phe
 195 200 205
 Asn Gln Ser Lys Gly Asn Ser Gly Thr Glu Gly Asp Gly Ser Ser Val
 210 215 220
 Phe Gly Ser Ile Phe Gly Ser Leu Leu Thr Pro Ile Asp Ser Leu Leu
 225 230 235 240
 Glu Lys Phe Ile Gly Ser Asn Asn Thr Asn Ser Asp Ser Asn Val Lys
 245 250 255
 Asn Thr Ser Met Gly Asn Gly Gln Asn Lys Tyr Asp Asn Asn Ile Tyr
 260 265 270
 Leu Asp Glu Glu Asp Ala Leu Ser Asp Ala Glu His Tyr Asn Asp Gly
 275 280 285
 Ser Ile Ser Leu Gly Glu Glu Asp Glu Leu Ser Asp Ala Glu His Tyr
 290 295 300
 Asn Asp Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Glu Asp Glu Leu Ser Asp Ala
 305 310 315 320
 Glu His Tyr Asn Asp Gly Gly Ile Cys Leu Gly Glu Glu Asp Glu Leu
 325 330 335
 Ser Asp Ala Glu His Tyr Asn Asp Gly Gly Ile Ser Leu Asp Glu Glu
 340 345 350
 Asp Val Leu Ser Asp Ala Glu His Tyr Asn Asp Gly Asp Ile Ser Leu

355					360					365					
Asp	Glu	Asp	Glu	Leu	Ser	Asp	Thr	Glu	Asn	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Gly	Ile
	370					375					380				
Ser	Leu	Asp	Glu	Ser	Asp	Asp	Leu	Ser	Asp	Pro	Glu	Ser	Lys	Thr	Lys
385					390					395					400
Glu	Asp	Asn	Tyr	His	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Asp	Asp	Phe	Tyr	His	Glu	Tyr
				405					410					415	
Lys	Pro	Thr	Tyr	Leu	Asn	Tyr	His	Met	His	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Glu	Pro
			420					425					430		
Asn	Asn	Phe	Tyr	Asp	Thr	Thr	Asn	Glu	Glu	Thr	His	Asn	Phe	Tyr	Asn
		435					440					445			
Thr	Thr	Asn	Glu	Glu	Ser	His	Asn	Phe	Tyr	Asn	Pro	Thr	His	Glu	Glu
	450					455					460				
Ser	His	Asn	Phe	Tyr	Asn	Pro	Thr	His	Glu	Glu	Ser	His	Asn	Phe	Tyr
465					470					475					480
Asn	Pro	Thr	His	Glu	Glu	Ser	His	Asn	Phe	Tyr	Asn	Pro	Thr	His	Glu
				485					490					495	
Glu	Ser	His	Asn	Phe	Tyr	Asn	Pro	Thr	His	Glu	Glu	Ser	His	Asn	Phe
			500					505					510		
Tyr	Asn	Pro	Thr	His	Glu	Glu	Ser	His	Asn	Phe	Tyr	Asn	Pro	Thr	His
		515					520					525			
Glu	Glu	Ser	His	Asn	Phe	Tyr	Asn	Pro	Thr	His	Glu	Glu	Ser	His	Asn
	530					535					540				
Phe	Tyr	Asn	Pro	Thr	His	Glu	Glu	Ser	His	Asn	Phe	Tyr	Asn	Pro	Thr
545					550					555					560
His	Glu	Glu	Ser	His	Asn	Phe	Tyr	Asn	Pro	Thr	His	Glu	Glu	Ser	His
			565					570					575		
Asn	Phe	Tyr	Thr	Pro	Thr	His	Glu	Glu	Ser	His	Asn	Phe	Tyr	Asn	Pro
			580				585						590		
Thr	His	Glu	Glu	Ser	His	Asn	Phe	Tyr	Asn	Pro	Thr	His	Glu	Glu	Ser
		595					600					605			
His	Asn	Phe	Tyr	Asn	Pro	Thr	His	Glu	Glu	Ser	His	Asn	Phe	Tyr	Asn
	610					615					620				
Pro	Thr	His	Glu	Glu	Ser	His	Asn	Phe	Tyr	Asn	Pro	Thr	His	Glu	Glu
625					630					635					640

Ser His Asn Phe Tyr Thr Pro Thr His Asp Glu Phe Asn Val Pro Leu
645 650 655

Asn Tyr Asn His Asp Tyr Asp Tyr Asn Tyr Phe Glu Asn Asp Asn Tyr
660 665 670

Asn Ile Gln Asn Val Lys Asp Asn Leu Val Lys Lys Val Asn Asp Phe
675 680 685

Met Glu Ser Asp Asn Leu Leu Val Asn Thr Phe Lys Gly Ile Ala Gly
690 695 700

Gly Val Thr Ser Phe Phe Gly Tyr
705 710

<210> 11
<211> 1701
<212> DNA
<213> Plasmodium Falciparum

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1701)
<223> MSP 3.6

<400> 11
atgttgaata tttttaatat aattttcttg ttgtttttaa taaacatata tatatgtgaa 60
gccaatggaa cactctctga aaatattgaa agtgcgtgaag agatagatgc tttaaaaacg 120
aatttaagaa atggatattt aaataatact tattttaatg aagaaaacaa taatttaaata 180
atagaaaatg aaataaataa tacaatttat aatgaagtaa cagaagaaac taaagaagaa 240
ttatatgata taaatgaaaa tattttccct gattattttt ttcttgatat ctttactgaa 300
aataaagaac aaaaaaatga agaagtacca atgaaaatag aagtagtaaa tgatggagaa 360
gaagtaaaaa cagaatatgt atctgaaaaa aatgaggaag tagaaaataa atcggaaact 420
gaaataggtg aagaattaac tgaaaaagta gatgaaaaag tacctgaaga agtagctgaa 480
gaattagttg aaaaagtaga tgaagaagta gctgaagaat tagttgaaaa agtagatgaa 540
aaagtagctg aagaagtaga tcaaaaagta gatgaagaag taactgaaga attaattgaa 600
aaagtagatg aagaagtaac tgaagaatta attgaaaaag tagatgaaga agttgctgaa 660
gaattaattg aaaaagtaga tgaagaagtt gctgaagaat taattgaaaa ggtagctgat 720
gaattaattg aaaaagtaga tgaagaagtt gctgaagaat taattgaaaa ggtagctgat 780
gaattagttg aaaaagtagc tgaagaatta gttgaaaaag tagatgaaga agtagctgaa 840
gaattagttg aaaaagtaga tgaaaaagta gctgaagaag tagatcaaaa agtagatgaa 900
gaagtaactg aagaattaat tgaaaaagta gatgaagaag taactgaaga attaattgaa 960
aaagtagatg aagaagttgc tgaagaatta attgaaaaag tagatgaaga agttgctgaa 1020
gaattaattg aaaaggtagc tgatgaatta gttgaaaaag tagctgaaga attagttgaa 1080

```

aaagtagatg aacaagtagc tgaagaatta gttgaaaaag tagatgaaca agtagctgaa 1140
gaattagttg aaaaagtaga tgaacaagta gttgaagaag tagctgaaga agtagctgaa 1200
gaagtagttg aagaaggtag aaaagtacct gaagaagtag ctgaagaagt agctgaagaa 1260
gtagctgaag aagtagctga agaagtagct gaagaattag ttgaaaaagt agatgaagaa 1320
gtagctgaaa aagtagttga agaagaagggt gaaaaagtag ctgaagaagt agttgaagaa 1380
gtagatgaag aagtagctga aaaagtagtt gaagaagaag gtgaaaaagt acttgaagaa 1440
gtaattgaag aagtagttga agaagtagcc gaagaagtag ctgaaaaagt agttgaagaa 1500
caagggtgaaa aagtaaaca aaatgattta aatgatgcat cttccgagga aattaaggat 1560
tctagtgatt ttaaagaatc tcatgaggaa ttatttaaag ttttcctgga gttaattaat 1620
aaaaacgatt tagttaaaga aaatttaaaa aagattacaa acaatttaaa tgaaatgcat 1680
ttaagcactt tatatccata a 1701

```

```

<210> 12
<211> 566
<212> PRT
<213> Plasmodium Falciparum

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(566)
<223> MSP 3.6

```

```

<400> 12

```

```

Met Leu Asn Ile Phe Asn Ile Ile Phe Leu Leu Phe Leu Ile Asn Ile
1 5 10 15

```

```

Tyr Ile Cys Glu Ala Asn Gly Thr Leu Ser Glu Asn Ile Glu Ser Ala
20 25 30

```

```

Glu Glu Ile Asp Ala Leu Lys Thr Asn Leu Arg Asn Gly Tyr Leu Asn
35 40 45

```

```

Asn Thr Tyr Phe Asn Glu Glu Asn Asn Asn Leu Asn Ile Glu Asn Glu
50 55 60

```

```

Ile Asn Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Val Thr Glu Glu Thr Lys Glu Glu
65 70 75 80

```

```

Leu Tyr Asp Ile Asn Glu Asn Ile Phe Pro Asp Tyr Phe Phe Leu Asp
85 90 95

```

```

Ile Phe Thr Glu Asn Lys Glu Gln Lys Asn Glu Glu Val Pro Met Lys
100 105 110

```

```

Ile Glu Val Val Asn Asp Gly Glu Glu Val Lys Thr Glu Tyr Val Ser
115 120 125

```

Glu Lys Asn Glu Glu Val Glu Asn Lys Ser Glu Thr Glu Ile Gly Glu
 130 135 140
 Glu Leu Thr Glu Lys Val Asp Glu Lys Val Pro Glu Glu Val Ala Glu
 145 150 155 160
 Glu Leu Val Glu Lys Val Asp Glu Glu Val Ala Glu Glu Leu Val Glu
 165 170 175
 Lys Val Asp Glu Lys Val Ala Glu Glu Val Asp Gln Lys Val Asp Glu
 180 185 190
 Glu Val Thr Glu Glu Leu Ile Glu Lys Val Asp Glu Glu Val Thr Glu
 195 200 205
 Glu Leu Ile Glu Lys Val Asp Glu Glu Val Ala Glu Glu Leu Ile Glu
 210 215 220
 Lys Val Asp Glu Glu Val Ala Glu Glu Leu Ile Glu Lys Val Ala Asp
 225 230 235 240
 Glu Leu Ile Glu Lys Val Asp Glu Glu Val Ala Glu Glu Leu Ile Glu
 245 250 255
 Lys Val Ala Asp Glu Leu Val Glu Lys Val Ala Glu Glu Leu Val Glu
 260 265 270
 Lys Val Asp Glu Glu Val Ala Glu Glu Leu Val Glu Lys Val Asp Glu
 275 280 285
 Lys Val Ala Glu Glu Val Asp Gln Lys Val Asp Glu Glu Val Thr Glu
 290 295 300
 Glu Leu Ile Glu Lys Val Asp Glu Glu Val Thr Glu Glu Leu Ile Glu
 305 310 315 320
 Lys Val Asp Glu Glu Val Ala Glu Glu Leu Ile Glu Lys Val Asp Glu
 325 330 335
 Glu Val Ala Glu Glu Leu Ile Glu Lys Val Ala Asp Glu Leu Val Glu
 340 345 350
 Lys Val Ala Glu Glu Leu Val Glu Lys Val Asp Glu Gln Val Ala Glu
 355 360 365
 Glu Leu Val Glu Lys Val Asp Glu Gln Val Ala Glu Glu Leu Val Glu
 370 375 380
 Lys Val Asp Glu Gln Val Val Glu Glu Val Ala Glu Glu Val Ala Glu
 385 390 395 400
 Glu Val Val Glu Glu Gly Glu Lys Val Pro Glu Glu Val Ala Glu Glu

[illegible]

```

caaatagacg atgaaaaatt gaagtatgga gggtcgtttg acacaatttt ttcaggtttt 480
gttaatttat taacaccatc aagtcctact caaaacgatg gatctacagg aagaaatgta 540
ccacctccta gtgaacctaa tgttgataca ccagatcctc caacagcacc cgcacctgta 600
aaggtagctg aagatgcaaa attatcaagt tctcctagac ctgaaggacc aagagcaaac 660
aatagaaatg aaaataatca aaatacagat ccatataacc actattttgc atgggaaatt 720
ggagggtggtg ctccaacgta taaacccgag aacaataaga acgataatat ttgctagaa 780
cacgtaaaaa ttacctcgtg ggataaagaa gatataatta aagaaaatga agacacaaaa 840
cgcgaagttc aagaaactga agacactgac gaaactgaag atactgacga aactgaagaa 900
acagaagata tggaagatga aaacgaaatt gtggaagatc aattacaaga aaatgaagat 960
gatgaggata atgtaaattt agaagatatt aataaaaata ctagaaatga tatatttgaa 1020
gaacaaataa aattagattc tacgcaagat gacaaagctc aaaaattaat ttctaataa 1080
tataaaaaaa ctgaagaaaa aaaatcatta gaagatcatg taaatctatt atttaatttt 1140
ttacaaacaa ataaccaact agatccttca ctaaaagatt tagaaaatga gttaactttt 1200
tttttaataa actattga 1218

```

```

<210> 14
<211> 405
<212> PRT
<213> Plasmodium Falciparum

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(405)
<223> MSP 3.7

```

```
<400> 14
```

```
Met Asn Lys Phe Leu Asn Ile Ile Phe Tyr Ile Phe Leu Ile Leu Asn
1 5 10 15
```

```
Phe Ser Phe Phe Gln Ser Asn Ala Thr Ser Lys Glu Ile Gln Lys Asp
20 25 30
```

```
Glu Gln Lys Asn Leu Arg Asn Gly Ser Ser Ile Asn Asn Asn Lys Asn
35 40 45
```

```
Ile Glu Asn Lys Asn Asp Asn Ile Glu Thr Gln Tyr Glu Ala Ser Glu
50 55 60
```

```
Tyr Ile Glu Lys Gln Asn Asp Ile Leu Asn Met Tyr Asn Asp Glu Lys
65 70 75 80
```

```
Glu Lys Asn Asn Asn Asn Ser Leu Asp Thr Asn Val Thr Lys Asn Thr
85 90 95
```

```
Val Ile Asp Asn Ser Asn Lys Phe Gln Ser Ile Glu Asp Asn Asn Val
100 105 110
```

Tyr Asn Lys Gly Ile Phe Val Gly Thr Gly Ile Lys Leu Asn Asp Ser
 115 120 125
 Gln Thr Thr Ser Asp Asn Tyr Lys Asn Glu Arg Tyr Gln Ile Asp Asp
 130 135 140
 Glu Lys Leu Lys Tyr Gly Gly Ser Phe Asp Thr Ile Phe Ser Gly Phe
 145 150 155 160
 Val Asn Leu Leu Thr Pro Ser Ser Pro Thr Gln Asn Asp Gly Ser Thr
 165 170 175
 Gly Arg Asn Val Pro Pro Pro Ser Glu Pro Asn Val Asp Thr Pro Asp
 180 185 190
 Pro Pro Thr Ala Pro Ala Pro Val Lys Val Pro Glu Asp Ala Lys Leu
 195 200 205
 Ser Ser Ser Pro Arg Pro Glu Gly Pro Arg Ala Asn Asn Arg Asn Glu
 210 215 220
 Asn Asn Gln Asn Thr Asp Pro Tyr Asn His Tyr Phe Ala Trp Glu Ile
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Ala Pro Thr Tyr Lys Pro Glu Asn Asn Lys Asn Asp Asn
 245 250 255
 Ile Leu Leu Glu His Val Lys Ile Thr Ser Trp Asp Lys Glu Asp Ile
 260 265 270
 Ile Lys Glu Asn Glu Asp Thr Lys Arg Glu Val Gln Glu Thr Glu Asp
 275 280 285
 Thr Asp Glu Thr Glu Asp Thr Asp Glu Thr Glu Glu Thr Glu Asp Met
 290 295 300
 Glu Asp Glu Asn Glu Ile Val Glu Asp Gln Leu Gln Glu Asn Glu Asp
 305 310 315 320
 Asp Glu Asp Asn Val Asn Leu Glu Asp Ile Asn Lys Asn Thr Arg Asn
 325 330 335
 Asp Ile Phe Glu Glu Gln Ile Lys Leu Asp Ser Thr Gln Asp Asp Lys
 340 345 350
 Ala Gln Lys Leu Ile Ser Asn Glu Tyr Lys Lys Thr Glu Glu Lys Lys
 355 360 365
 Ser Leu Glu Asp His Val Asn Leu Leu Phe Asn Phe Leu Gln Thr Asn
 370 375 380

Asn Gln Leu Asp Pro Ser Leu Lys Asp Leu Glu Asn Glu Leu Thr Phe
385 390 395 400

Phe Leu Asn Asn Tyr
405

<210> 15
<211> 2289
<212> DNA
<213> Plasmodium Falciparum

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2289)
<223> MSP 3.8

<400> 15
atgatata ttttatctat tgtatatttat atattttttt tacatattga tatatatgta 60
aacatttatt ctacatgttt tgttgtaaag gaggggaacc ctaatttaag aaataacata 120
attaatgatg atgaactaaa ggggaaagca tataataata ctatagatgc taataaccaa 180
aatatagaat ataataaaaa cttaaagcac aatgtaaact catctcatat atctaaattt 240
tcggatatta tggatcaaga agataaagga gataatgaaa attctcatga cataaaattt 300
gaagaaaaaa aaaatattaa taaatcttta gacgctgaat ccaattatgg tattaatgaa 360
attagtatta ctggtaatga tagtaatagt gataatagta atcagaatat ttttccagat 420
ggtagtgaat tagctggagg tattcctcgt tctatatata ctattaacct tggttttaat 480
aaatgtccta ctgaagagat ttgtaaagac tttagtaatc ttccacaatg tcgaaagaat 540
gtacatgaaa gaaataattg gttgggctca agtgtaaaaa atttttcaag tgataataag 600
ggggttcttg ttcctccaag aagacaatct ttatgtttta gaattacatt acaagatttt 660
cgtacgaaaa agaaaaagga aggagatttt gaaaaattta ttatttcata tgcattcatct 720
gaagctagaa aattaagaac catacacaat aataacttag aaaaagctca tcaagctata 780
agatatagtt ttgcagatat tggaaatatt attagaggag atgacatgat ggatacacct 840
acgtcaaaaag aaaccataac atatttagaa aaagtactta aaatttataa tgaaaataat 900
gataaaccaa aagatgcaaa aaaatggtgg acagaaaaca ggcattcatgt ttgggaagca 960
atgatgtgcg gatatcagag tgcgcagaaa gataaccaat gtacaggtta tggtaacatt 1020
gatgatatac cacaattttt aagggtggtc agagagtggg gaacatatgt ctgtgaagaa 1080
agcgaaaaaa atatgaacac actaaaagct gtttgctttc cgaaacagcc aagaaccgaa 1140
gcgaatcctg cattgactgt acatgaaaat gaaatgtgct catcaacttt aaaaaatat 1200
gaagaatggt ataataaaag gaaaactgaa tggactgaac aatctattaa atataacaat 1260
gacaaaatta attatacaga tataaaaaca ttatctcctt ctgaatattt aatagaaaaa 1320
tgtcctgaat gtaaagtgtac caaaaaaat ttgcaagatg tatttgaact tacatttgat 1380
ggaaaagctt tattagaaaa gctaaaaaaa gaagaatcac ctgtgagtaa tagtgtgaat 1440
gccttacctg aaccagggtca aattacatta cctgatcctt cattaaaaca aacaacacaa 1500

```

caggaaaatc aacctgttgt agaaacacct gttaccacag ctgttattaa tgaacatcaa 1560
ggacaaacag aaccgaataa aggtgacaac aataatgaaa gagaaaatca tgaaagtaat 1620
gttggttagca tccaagaagt aaaccaaggt agcgtgagcg aagaatcaca ttctaaaact 1680
atagatcctt ctaagattga cgaccgtttg gaattaagta gtgggtcatc atctcttgaa 1740
caacactcta aggaagatgt aaaaaaggga tgtgcttttag aattgggtacc tttatcttta 1800
tcggatattg aacagatagc taatgaaagc gaagatgtac tggaagagat agaagaagaa 1860
attaatacag atgggggaaat agaatatata acagaagaag aaataaaaga agatatagaa 1920
gaagaaacag aagaagatat agaagaagaa acagaagaag aaacagaaga agaaacagaa 1980
gaagaagcag atgaagaaac agtaaaagaa atagaagaca aaccagaaca agaaattaaa 2040
aataaatcgc tagaagaaaa acaaatagat aaaaatacag ataccagtga aaagaaagga 2100
tttaataatt cagaaaaaga tgaaaaagct cgaaatttaa tttctaaaaa ttataaaaaat 2160
tataatgaac tagataaaaa cgttcatact ttagtaaatt caattattag tttattagaa 2220
gaaggtaatg gaagtgattc taccttgaat agtttatcaa aagatattac aaatttattt 2280
aaaaattaa 2289

```

```

<210> 16
<211> 762
<212> PRT
<213> Plasmodium Falciparum

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(762)
<223> MSP 3.8

```

```

<400> 16

```

```

Met Ile Tyr Ile Leu Ser Ile Val Phe Tyr Ile Phe Phe Leu His Ile
1           5           10           15

```

```

Asp Ile Tyr Val Asn Ile Tyr Ser Thr Cys Phe Val Val Asn Glu Gly
20           25           30

```

```

Asn Pro Asn Leu Arg Asn Asn Ile Ile Asn Asp Asp Glu Leu Lys Gly
35           40           45

```

```

Lys Ala Tyr Asn Asn Thr Ile Asp Ala Asn Asn Gln Asn Ile Glu Tyr
50           55           60

```

```

Asn Lys Asn Leu Lys His Asn Val Asn Ser Ser His Ile Ser Lys Phe
65           70           75           80

```

```

Ser Asp Ile Met Asp Gln Glu Asp Lys Gly Asp Asn Glu Asn Ser His
85           90           95

```

```

Asp Ile Lys Phe Glu Glu Lys Lys Asn Ile Asn Lys Ser Leu Asp Ala
100          105          110

```

Glu Ser Asn Tyr Gly Ile Asn Glu Ile Ser Ile Thr Gly Asn Asp Ser
 115 120
 Asn Ser Asp Asn Ser Asn Gln Asn Ile Phe Pro Asp Gly Ser Glu Leu
 130 135 140
 Ala Gly Gly Ile Pro Arg Ser Ile Tyr Thr Ile Asn Leu Gly Phe Asn
 145 150 155 160
 Lys Cys Pro Thr Glu Glu Ile Cys Lys Asp Phe Ser Asn Leu Pro Gln
 165 170 175
 Cys Arg Lys Asn Val His Glu Arg Asn Asn Trp Leu Gly Ser Ser Val
 180 185 190
 Lys Asn Phe Ser Ser Asp Asn Lys Gly Val Leu Val Pro Pro Arg Arg
 195 200 205
 Gln Ser Leu Cys Leu Arg Ile Thr Leu Gln Asp Phe Arg Thr Lys Lys
 210 215 220
 Lys Lys Glu Gly Asp Phe Glu Lys Phe Ile Tyr Ser Tyr Ala Ser Ser
 225 230 235 240
 Glu Ala Arg Lys Leu Arg Thr Ile His Asn Asn Asn Leu Glu Lys Ala
 245 250 255
 His Gln Ala Ile Arg Tyr Ser Phe Ala Asp Ile Gly Asn Ile Ile Arg
 260 265 270
 Gly Asp Asp Met Met Asp Thr Pro Thr Ser Lys Glu Thr Ile Thr Tyr
 275 280 285
 Leu Glu Lys Val Leu Lys Ile Tyr Asn Glu Asn Asn Asp Lys Pro Lys
 290 295 300
 Asp Ala Lys Lys Trp Trp Thr Glu Asn Arg His His Val Trp Glu Ala
 305 310 315 320
 Met Met Cys Gly Tyr Gln Ser Ala Gln Lys Asp Asn Gln Cys Thr Gly
 325 330 335
 Tyr Gly Asn Ile Asp Asp Ile Pro Gln Phe Leu Arg Trp Phe Arg Glu
 340 345 350
 Trp Gly Thr Tyr Val Cys Glu Glu Ser Glu Lys Asn Met Asn Thr Leu
 355 360 365
 Lys Ala Val Cys Phe Pro Lys Gln Pro Arg Thr Glu Ala Asn Pro Ala
 370 375 380

Leu Thr Val His Glu Asn Glu Met Cys Ser Ser Thr Leu Lys Lys Tyr
 385 390 395 400
 Glu Glu Trp Tyr Asn Lys Arg Lys Thr Glu Trp Thr Glu Gln Ser Ile
 405 410 415
 Lys Tyr Asn Asn Asp Lys Ile Asn Tyr Thr Asp Ile Lys Thr Leu Ser
 420 425 430
 Pro Ser Glu Tyr Leu Ile Glu Lys Cys Pro Glu Cys Lys Cys Thr Lys
 435 440 445
 Lys Asn Leu Gln Asp Val Phe Glu Leu Thr Phe Asp Gly Lys Ala Leu
 450 455 460
 Leu Glu Lys Leu Lys Lys Glu Glu Ser Pro Val Ser Asn Ser Val Asn
 465 470 475 480
 Ala Leu Pro Glu Pro Gly Gln Ile Thr Leu Pro Asp Pro Ser Leu Lys
 485 490 495
 Gln Thr Thr Gln Gln Glu Asn Gln Pro Val Val Glu Thr Pro Val Thr
 500 505 510
 Thr Ala Val Ile Asn Glu His Gln Gly Gln Thr Glu Pro Asn Lys Gly
 515 520 525
 Asp Asn Asn Asn Glu Arg Glu Asn His Glu Ser Asn Val Gly Ser Ile
 530 535 540
 Gln Glu Val Asn Gln Gly Ser Val Ser Glu Glu Ser His Ser Lys Thr
 545 550 555 560
 Ile Asp Pro Ser Lys Ile Asp Asp Arg Leu Glu Leu Ser Ser Gly Ser
 565 570 575
 Ser Ser Leu Glu Gln His Ser Lys Glu Asp Val Lys Lys Gly Cys Ala
 580 585 590
 Leu Glu Leu Val Pro Leu Ser Leu Ser Asp Ile Glu Gln Ile Ala Asn
 595 600 605
 Glu Ser Glu Asp Val Leu Glu Glu Ile Glu Glu Glu Ile Asn Thr Asp
 610 615 620
 Gly Glu Ile Glu Tyr Ile Thr Glu Glu Glu Ile Lys Glu Asp Ile Glu
 625 630 635 640
 Glu Glu Thr Glu Glu Asp Ile Glu Glu Glu Thr Glu Glu Glu Thr Glu
 645 650 655

Glu Glu Thr Glu Glu Glu Ala Asp Glu Glu Thr Val Lys Glu Ile Glu
660 665 670

Asp Lys Pro Glu Gln Glu Ile Lys Asn Lys Ser Leu Glu Glu Lys Gln
675 680 685

Ile Asp Lys Asn Thr Asp Thr Ser Glu Lys Lys Gly Phe Asn Asn Ser
690 695 700

Glu Lys Asp Glu Lys Ala Arg Asn Leu Ile Ser Lys Asn Tyr Lys Asn
705 710 715 720

Tyr Asn Glu Leu Asp Lys Asn Val His Thr Leu Val Asn Ser Ile Ile
725 730 735

Ser Leu Leu Glu Glu Gly Asn Gly Ser Asp Ser Thr Leu Asn Ser Leu
740 745 750

Ser Lys Asp Ile Thr Asn Leu Phe Lys Asn
755 760

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Plasmodium Falciparum

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> MSP 3-1 MSP3b-like motif

<400> 17

Ile Leu Gly Trp Glu Phe Gly Gly Gly Val Pro
1 5 10

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Plasmodium Falciparum

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> MSP 3-2 MSP3b-like motif

<400> 18

Ile Leu Gly Trp Glu Phe Gly Gly Gly Ala Pro
1 5 10

<210> 19
<211> 14
<212> PRT
<213> Plasmodium Falciparum

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(14)
 <223> MSP 3-3 MSP3b-like motif

<400> 19

Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Phe Ser Gly Gly Leu Tyr Phe
 1 5 10

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Plasmodium Falciparum

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(11)
 <223> MSP 3-4 MSP3b-like motif

<400> 20

Leu Glu Arg Gly Leu Gly Ser Gly Ala Leu Pro
 1 5 10

<210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Plasmodium Falciparum

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(11)
 <223> MSP 3-4 MSP3b-like motif

<400> 21

Asp Asp Gly Ser Ala Phe Gly Gly Gly Leu Pro
 1 5 10

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Plasmodium Falciparum

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(11)
 <223> MSP 3-7 MSP3b-like motif

<400> 22

Tyr Phe Ala Trp Glu Ile Gly Gly Gly Ala Pro
 1 5 10

<210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Plasmodium Falciparum

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(11)

<223> MSP 3-8 MSP3b-like motif

<400> 23

Arg Leu Glu Leu Ser Ser Gly Ser Ser Leu Glu
1 5 10

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Plasmodium Falciparum

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(11)

<223> MSP 3-8 MSP3b-like motif

<400> 24

Pro Asp Gly Ser Glu Leu Ala Gly Gly Ile Pro
1 5 10

<210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> Plasmodium Falciparum

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> MSP3-1 MSP3c/d-like motif

<400> 25

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

Glu Asn Asp Asp
20

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> Plasmodium Falciparum

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> MSP 3-2 MSP3c/d-like motif

<400> 26

Leu Glu Gln Ile Lys Ile Pro Ser Trp Asp Arg Asn Asn Ile Pro Asp
1 5 10 15

Glu Asn Glu Gln
20

<210> 27

<211> 20
 <212> PRT
 <213> Plasmodium Falciparum

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(20)
 <223> MSP 3-3 MSP3c/d-like motif

<400> 27

Leu Glu Ser Val Asn Leu Thr Ser Trp Asp Lys Glu Asp Ile Val Lys
 1 5 10 15

Glu Asn Glu Asp
 20

<210> 28
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Plasmodium Falciparum

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(20)
 <223> MSP 3-4 MSP3c/d-like motif

<400> 28

Leu Glu Leu Ile Lys Leu Thr Ser Lys Asp Glu Glu Asp Ile Ile Lys
 1 5 10 15

His Asn Glu Asp
 20

<210> 29
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Plasmodium Falciparum

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(20)
 <223> MSP 3-7 MSP3c/d-like motif

<400> 29

Leu Glu His Val Lys Ile Thr Ser Trp Asp Lys Glu Asp Ile Ile Lys
 1 5 10 15

Glu Asn Glu Asp
 20

<210> 30
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Plasmodium Falciparum

<220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> MSP 3-8 MSP3c/d-like motif

<400> 30

Leu Glu Leu Val Pro Leu Ser Leu Ser Asp Ile Glu Gln Ile Ala Asn
1 5 10 15

Glu Ser Glu Asp
20

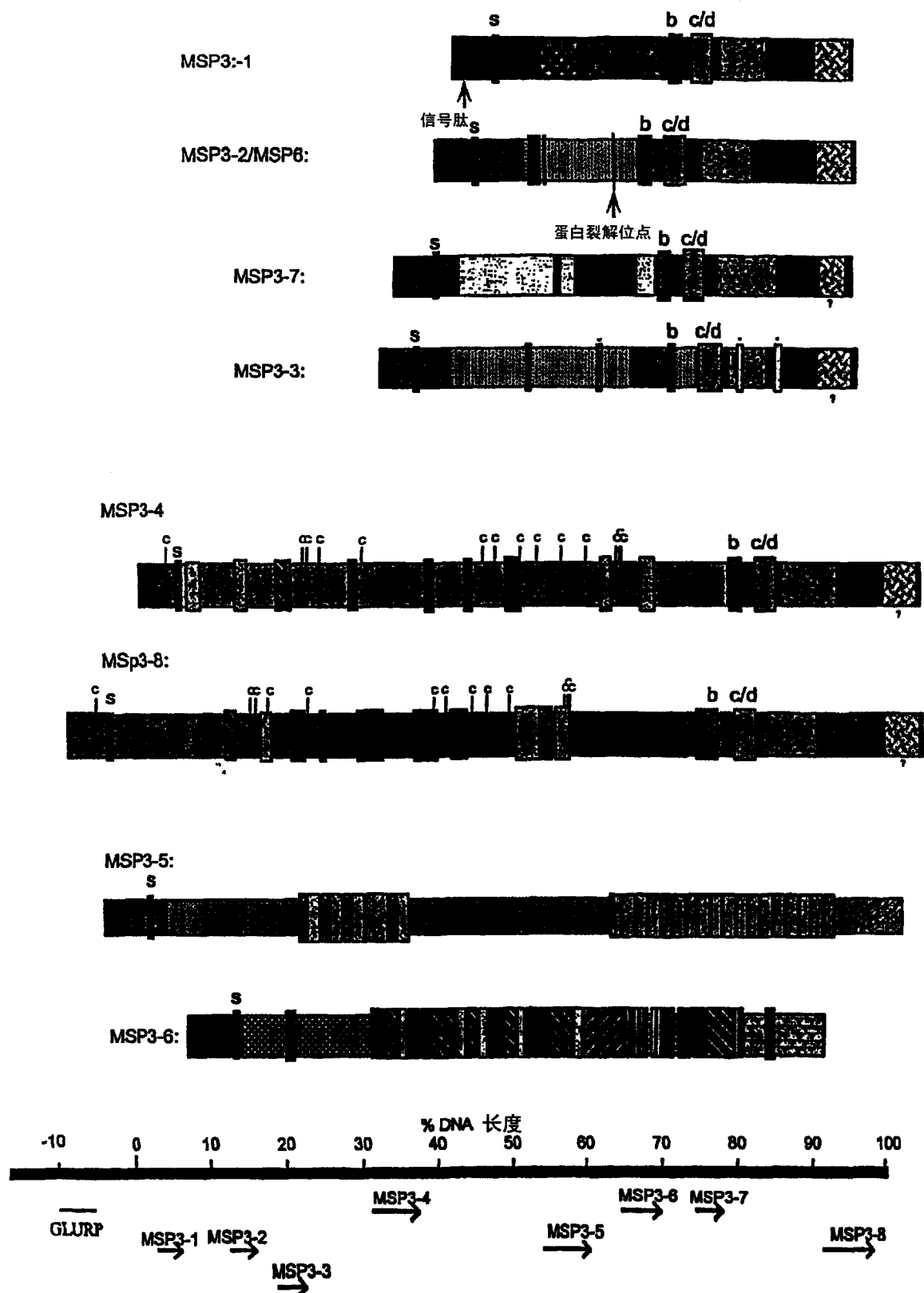


图 1

MS P3 肽

(数字相应于3D7株)

M SP 3a: 16 7- YEKA KNAY QKANQAV LKA KEASSYD-1 91

M SP 3b: 18 4- AK EASSYDYI LGWEFGGGVP EHKKEEN- 21 0

M SP 3c: 203-PEHKKEENM LSHL YVSSKDKENISKEND-230

M SP 3d: 211-MLSHLYV SSKDKENISKENDDVLD EKEEEAEETEEEELEEK-251

M SP 3e: 275-EENDKKKEQEKEQSNEN NDQKKD MEAQN LISKN-307

M SP 3f: 302-NLISKNQ NNNE KNVK EAA ESIMKTLAGLI KGNNQIDSTLKD LVE ELSKYFKN H

图2

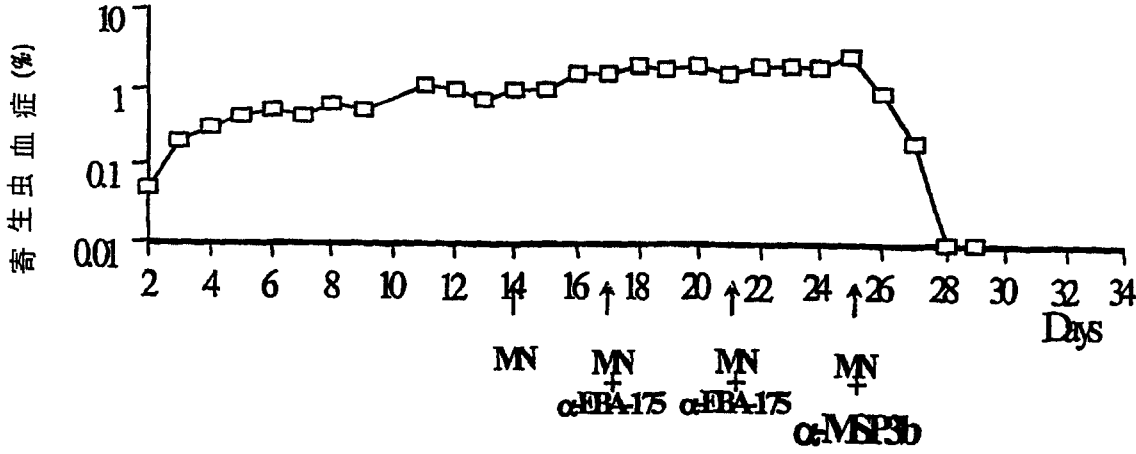


图3

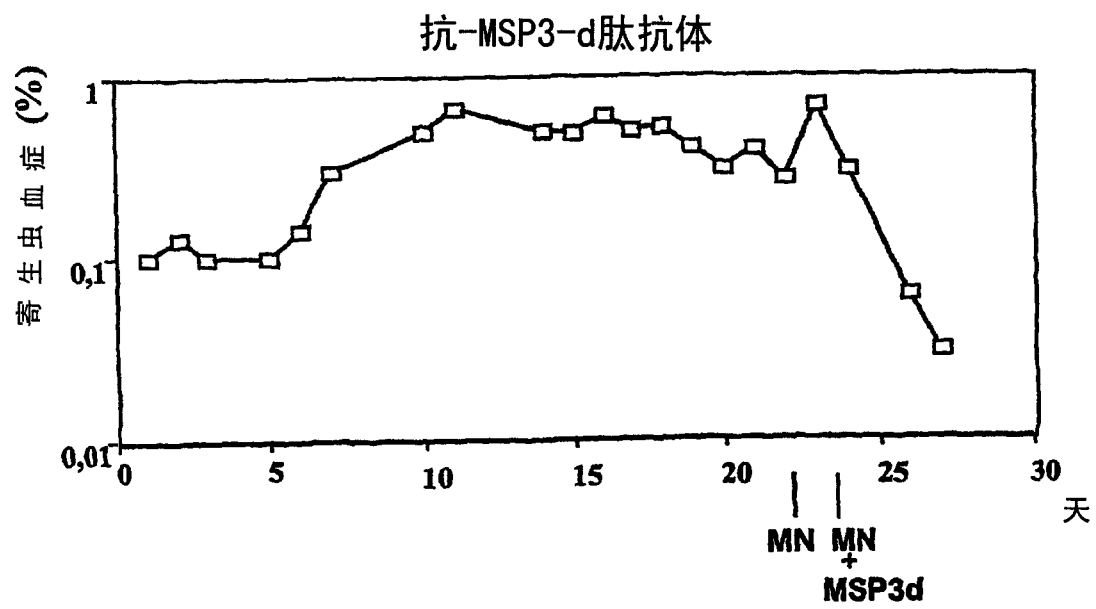


图4

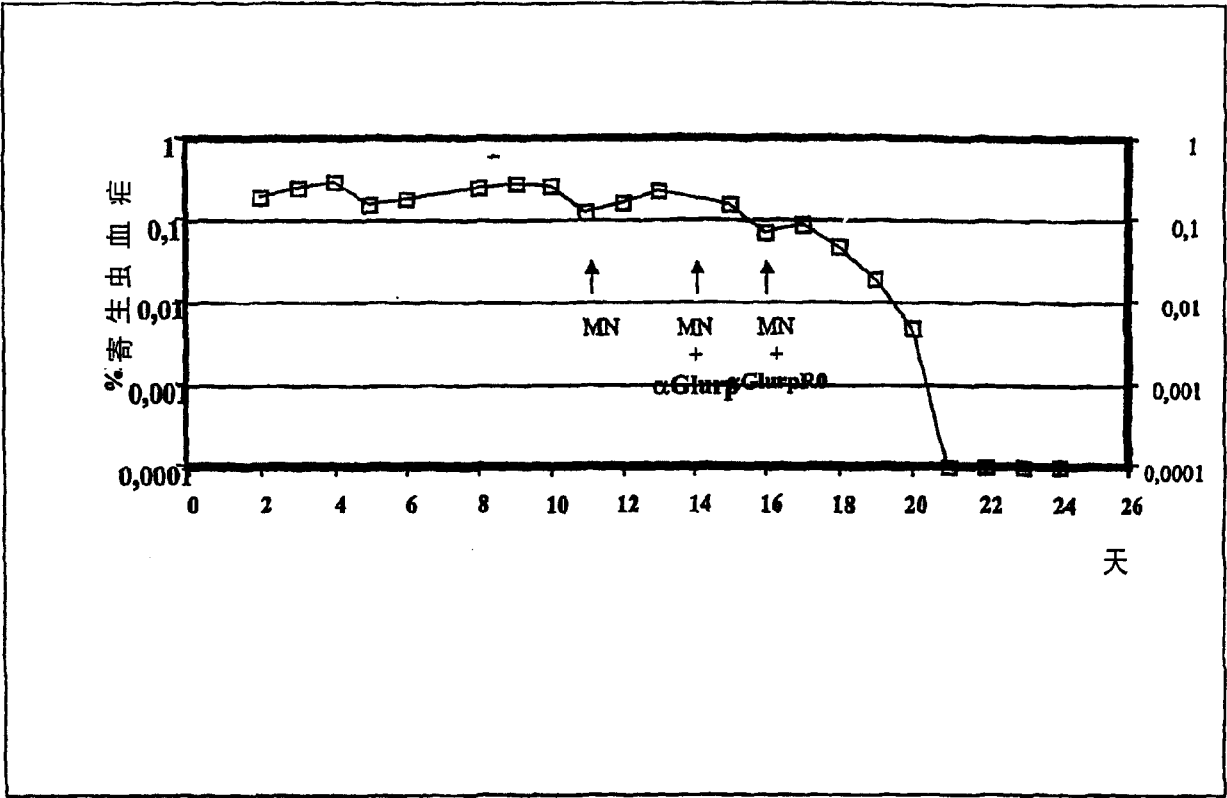


图5

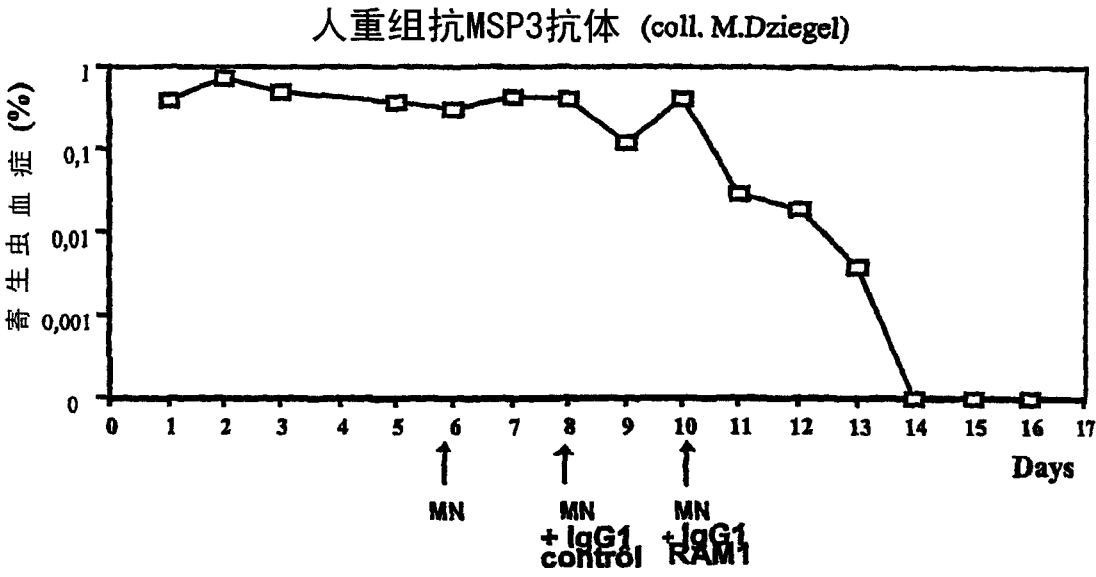


图6

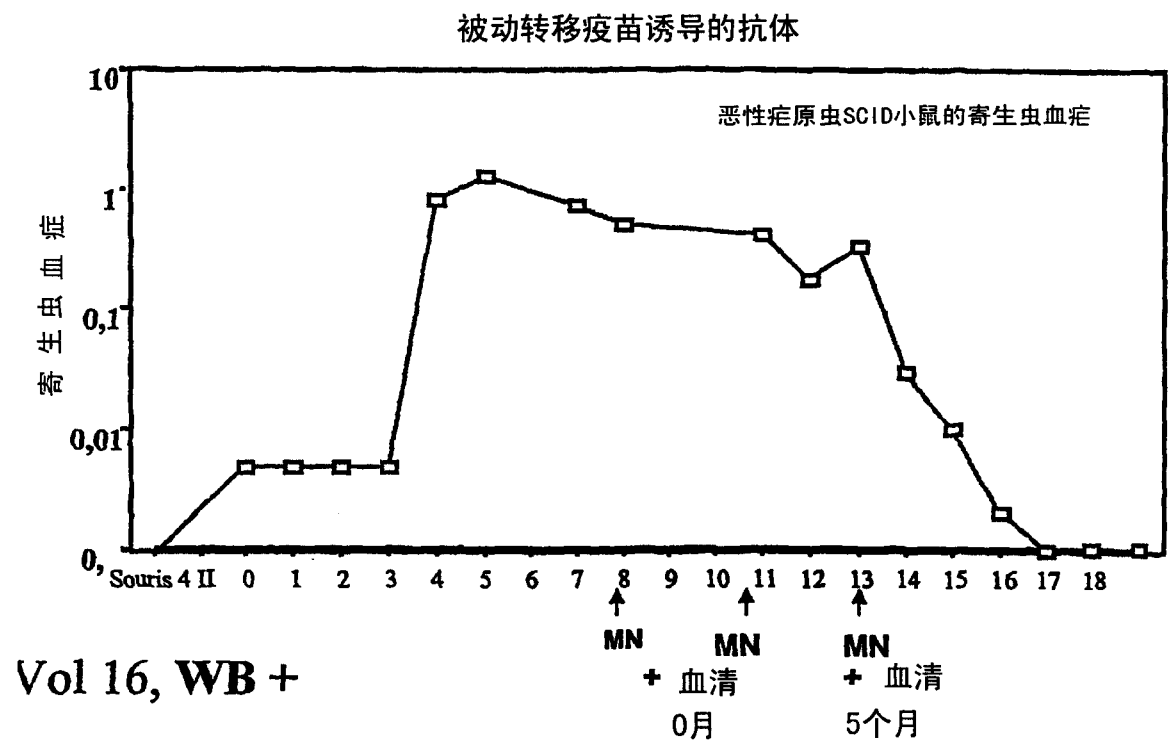


图7

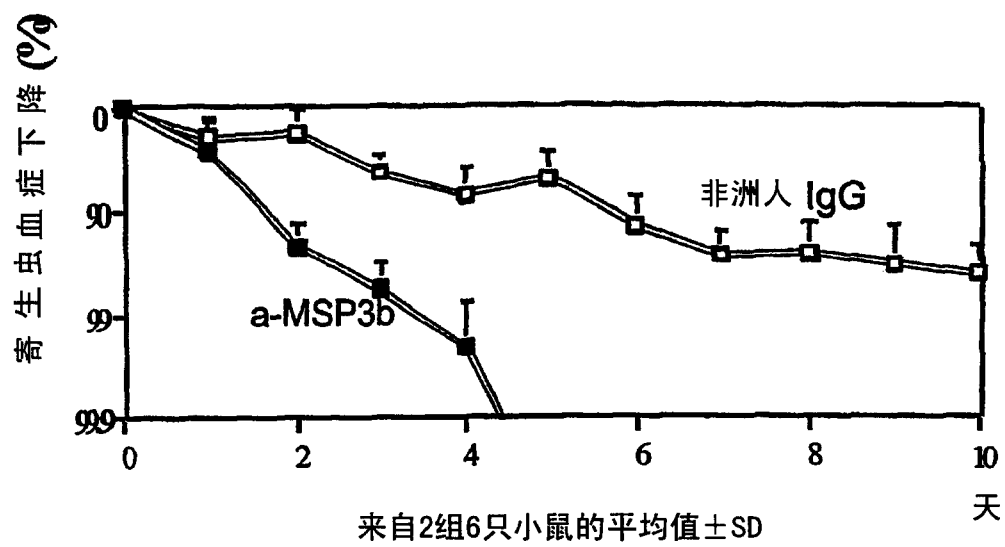


图8

CLUSTAL W (1.82) 多重 ClustalW 比对

核苷酸序列比对 - <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> MSP3-1

CLUSTAL W (1.82) 多重序列比对

```

MSP3.1C      3D7      -TATGAAAAGGCACAAAATGCTTATCAAAAAGCAAAACCAAGCTGTTTAAAGCAAAAGA 59
MSP3.1C      B2      -TATGAAAAGGCACAAAATGCTTATCAAAAAGCAAAACCAAGCTGTTTAAAGCAAAAGA 59
MSP3.1C      B3      -TATGAAAAGGCACAAAATGCTTATCAAAAAGCAAAACCAAGCTGTTTAAAGCAAAAGA 59
MSP3.1C      B4      -TATGAAAAGGCACAAAATGCTTATCAAAAAGCAAAACCAAGCTGTTTAAAGCAAAAGA 59
MSP3.1C      B5      -TATGAAAAGGCACAAAATGCTTATCAAAAAGCAAAACCAAGCTGTTTAAAGCAAAAGA 59
MSP3.1C      D2      -TATGAAAAGGCACAAAATGCTTATCAAAAAGCAAAACCAAGCTGTTTAAAGCAAAAGA 59
MSP3.1C      D3      -TATGAAAAGGCACAAAATGCTTATCAAAAAGCAAAACCAAGCTGTTTAAAGCAAAAGA 59
MSP3.1C      D4      TTATGAAAAGGCACAAAATGCTTATCAAAAAGCAAAACCAAGCTGTTTAAAGCAAAAGA 60
MSP3.1C      D5      -TATGAAAAGGCACAAAATGCTTATCAAAAAGCAAAACCAAGCTGTTTAAAGCAAAAGA 59
*****
MSP3.1C      3D7      AGCTTCTAGTTATGATTATATTTTAGGTTGGGAATTTGGAGGAGCGGTTCCAGAACACAA 119
MSP3.1C      B2      AGCTTCTAGTTATGATTATATTTTAGGTTGGGAATTTGGAGGAGCGGTTCCAGAACACAA 119
MSP3.1C      B3      AGCTTCTAGTTATGATTATATTTTAGGTTGGGAATTTGGAGGAGCGGTTCCAGAACACAA 119
MSP3.1C      B4      AGCTTCTAGTTATGATTATATTTTAGGTTGGGAATTTGGAGGAGCGGTTCCAGAACACAA 119
MSP3.1C      B5      AGCTTCTAGTTATGATTATATTTTAGGTTGGGAATTTGGAGGAGCGGTTCCAGAACACAA 119
MSP3.1C      D2      AGCTTCTAGTTATGATTATATTTTAGGTTGGGAATTTGGAGGAGCGGTTCCAGAACACAA 119
MSP3.1C      D3      AGCTTCTAGTTATGATTATATTTTAGGTTGGGAATTTGGAGGAGCGGTTCCAGAACACAA 119
MSP3.1C      D4      AGCTTCTAGTTATGATTATATTTTAGGTTGGGAATTTGGAGGAGCGGTTCCAGAACACAA 120
MSP3.1C      D5      AGCTTCTAGTTATGATTATATTTTAGGTTGGGAATTTGGAGGAGCGGTTCCAGAACACAA 119
*****
MSP3.1C      3D7      AAAAGAAGAAATATGTTATCATCTTATATGTTTCTTCAAAGGATAAGGAAATATATC 179
MSP3.1C      B2      AAAAGAAGAAATATGTTATCATCTTATATGTTTCTTCAAAGGATAAGGAAATATATC 179
MSP3.1C      B3      AAAAGAAGAAATATGTTATCATCTTATATGTTTCTTCAAAGGATAAGGAAATATATC 179
MSP3.1C      B4      AAAAGAAGAAATATGTTATCATCTTATATGTTTCTTCAAAGGATAAGGAAATATATC 179
MSP3.1C      B5      AAAAGAAGAAATATGTTATCATCTTATATGTTTCTTCAAAGGATAAGGAAATATATC 179
MSP3.1C      D2      AAAAGAAGAAATATGTTATCATCTTATATGTTTCTTCAAAGGATAAGGAAATATATC 179
MSP3.1C      D3      AAAAGAAGAAATATGTTATCATCTTATATGTTTCTTCAAAGGATAAGGAAATATATC 179
MSP3.1C      D4      AAAAGAAGAAATATGTTATCATCTTATATGTTTCTTCAAAGGATAAGGAAATATATC 180
MSP3.1C      D5      AAAAGAAGAAATATGTTATCATCTTATATGTTTCTTCAAAGGATAAGGAAATATATC 179
*****

```

图 9A

	3D7	
MSP3.1C	TAAGGAAAATGATGATGTATTAGATGAGAAAGGAAAGAGAGGCAGAGAAGAAACAGAGAAGA	239
MSP3.1C	TAAGGAAAATGATGATGATCTATTAGATGAGAAAGGAAAGAGAGGCAGAGAAGAAACAGAGAAGA	239
MSP3.1C	TAAGGAAAATGATGATGTATTAGATGAGAAAGGAAAGAGAGGCAGAGAAGAAACAGAGAAGA	239
MSP3.1C	TAAGGAAAATGATGATGTATTAGATGAGAAAGGAAAGAGAGGCAGAGAAGAAACAGAGAAGA	239
MSP3.1C	TAAGGAAAATGATGATGTATTAGATGAGAAAGGAAAGAGAGGCAGAGAAGAAACAGAGAAGA	239
MSP3.1C	TAAGGAAAATGATGATGTATTAGATGAGAAAGGAAAGAGAGGCAGAGAAGAAACAGAGAAGA	239
MSP3.1C	TAAGGAAAATGATGATGTATTAGATGAGAAAGGAAAGAGAGGCAGAGAAGAAACAGAGAAGA	239
MSP3.1C	TAAGGAAAATGATGATGTATTAGATGAGAAAGGAAAGAGAGGCAGAGAAGAAACAGAGAAGA	239
MSP3.1C	TAAGGAAAATGATGATGTATTAGATGAGAAAGGAAAGAGAGGCAGAGAAGAAACAGAGAAGA	240
MSP3.1C	TAAGGAAAATGATGATGTATTAGATGAGAAAGGAAAGAGAGGCAGAGAAGAAACAGAGAAGA	239

MSF3.1C	3D7	
MSF3.1C	B2	AGAACTTTGAAGAAAAAATGAAAGAAAGAAACAGAAATCAGAAAAATAAGTGAAGATGAAGAAGA 299
MSF3.1C	B3	AGAACTTTGAAGAAAAAATGAAAGAAAGAAACCGAAATCAGAAAAATAAGTGAAGATGAAGAAGA 299
MSF3.1C	B4	AGAACTTTGAAGAAAAAATGAAAGAAAGAAACCGAAATCAGAAAAATAAGTGAAGATGAAGAAGA 299
MSF3.1C	B5	AGAACTTTGAAGAAAAAATGAAAGAAAGAAACCGAAATCAGAAAAATAAGTGAAGATGAAGAAGA 299
MSF3.1C	D2	GGAACTTTGAAGAAAAAATGAAAGAAAGAAACAGAAATCAGAAAAATAAGTGAAGATGAAGAAGA 299
MSF3.1C	D3	AGAACTTTGAAGAAAAAATGAAAGAAAGAAACAGAAATCAGAAAAATAAGTGAAGATGAAGAAGA 299
MSF3.1C	D4	AGAACTTTGAAGAAAAAATGAAAGAAAGAAACAGAAATCAGAAAAATAAGTGAAGATGAAGAAGA 300
MSF3.1C	D5	AGAACTTTGAAGAAAAAATGAAAGAAAGAAACCGAAATCAGAAAAATAAGTGAAGATGAAGAAGA 299

MSP3.1C	3D7
MSP3.1C	3D7
MSP3.1C	B2
MSP3.1C	B3
MSP3.1C	B4
MSP3.1C	B5
MSP3.1C	D2
MSP3.1C	D3
MSP3.1C	D4
MSP3.1C	D5

MSF3.1C	3D7
MSF3.1C	B2
MSF3.1C	B3
MSF3.1C	B4

9B

MSP3.1C	B5	AGAACAAAGTAACGAAAAATAATGATCAAAAAAAGAGATATGGAAGCTCAGAAATTTAAATTTC	398
MSP3.1C	D2	AGAACAAAGTAATGAAAAATAATGATCAAAAAAAGAGATATGGAAGCA CAGAAATTTAAATTTC	413
MSP3.1C	D3	AGAACAAAGTAATGAAAAATAATGATCAAAAAAAGAGATATGGAAGCTCAGAAATTTAAATTTC	416
MSP3.1C	D4	AGAACAAAGTAGTGAATAATAATGATCAAAAAAAGAGATATGGAAGCTCAGAAATTTAAATTTC	420
MSP3.1C	D5	AGAACAAAGTAAACGAAAAATAATGATCAAAAAAAGAGATATGGAAGCTCAGAAATTTAAATTTC	419

MSP3.1C	3D7	TAAAAAC CAGAAATAATAATGAGAAAAACGTTAAAGAGCTGCTGAAAGCATCATGAAAAAC	476
MSP3.1C	B2	TAAAAAC CAGAAATAATAATGAGAAAAACGTTAAAGAGCTGCTGAAAGCATATAATGAAAAAC	458
MSP3.1C	B3	TAAAAAC CAGAAATAATAATGAGAAAAACGTTAAAGAGCTGCTGAAAGCATATAATGAAAAAC	458
MSP3.1C	B4	TAAAAAC CAGAAATAATAATGAGAAAAACGTTAAAGAGCTGCTGAAAGCATATAATGAAAAAC	458
MSP3.1C	B5	TAAAAAC CAGAAATAATAATGAGAAAAACGTTAAAGAGCTGCTGAAAGCATATAATGAAAAAC	458
MSP3.1C	D2	TAAAAAC CAGAAATAATAATGAGAAAAACGTTAAAGAGCTGCTGAAAGCATATAATGAAAAAC	473
MSP3.1C	D3	TAAAAAC CAGAAATAATAATGAGAAAAACGTTAAAGAGCTGCTGAAAGCATATAATGAAAAAC	476
MSP3.1C	D4	TAAAAAC CAGAAATAATAATGAGAAAAACGTTAAAGAGCTGCTGAAAGCATATAATGAAAAAC	480
MSP3.1C	D5	TAAAAAC CAGAAATAATAATGAGAAAAACGTTAAAGAGCTGCTGAAAGCATATAATGAAAAAC	479

MSP3.1C	3D7	TTTAGCTGGTTTAAATCAAGGGAAATAATCAAAATAGATTCTACCTTAAAGATTAGTAGA	536
MSP3.1C	B2	TTTAGCTGGTTTAAATCAAGGGAAATAATCAAAATAGATTCTACCTTAAAGATTAGTAGA	518
MSP3.1C	B3	TTTAGCTGGTTTAAATCAAGGGAAATAATCAAAATAGATTCTACCTTAAAGATTAGTAGA	518
MSP3.1C	B4	TTTAGCTGGTTTAAATCAAGGGAAATAATCAAAATAGATTCTACCTTAAAGATTAGTAGA	518
MSP3.1C	B5	TTTAGCTGGTTTAAATCAAGGGAAATAATCAAAATAGATTCTACCTTAAAGATTAGTAGA	518
MSP3.1C	D2	TTTAGCTGGTTTAAATCAAGGGAAATAATCAAAATAGATTCTACCTTAAAGATTAGTAGA	533
MSP3.1C	D3	TTTAGCTGGTTTAAATCAAGGGAAATAATCAAAATAGATTCTACCTTAAAGATTAGTAGA	536
MSP3.1C	D4	TTTAGCTGGTTTAAATCAAGGGAAATAATCAAAATAGATTCTACCTTAAAGATTAGTAGA	540
MSP3.1C	D5	TTTAGCTGGTTTAAATCAAGGGAAATAATCAAAATAGATTCTACCTTAAAGATTAGTAGA	539

MSP3.1C	3D7	AGAAATTATCCAAATATTTTAAAAATCATTA	567
MSP3.1C	B2	AGAAATTATCCAAATATTTTAAAAATCATTT--	547
MSP3.1C	B3	AGAAATTATCCAAATATTTTAAAAATCATTA	549
MSP3.1C	B4	AGAAATTATCCAAATATTTTAAAAATCATTA	549
MSP3.1C	B5	AGAAATTATCCAAATATTTTAAAAATCATTA	549
MSP3.1C	D2	AGAAATTATCCAAATATTTTAAAAATCATTA	564
MSP3.1C	D3	AGAAATTATCCAAATATTTTAAAAATCATTA	567
MSP3.1C	D4	AGAAATTATCCAAATATTTTAAAAATCATTA	571
MSP3.1C	D5	AGAAATTATCCAAATATTTTAAAAATCATTA	570

图9C

MSP3.2FL D3
MSP3.2FL D4
MSP3.2FL D5

```

ATGTATAATAACGATAAAATATTAAGTAAAAATGAAGTAGATACATACTAATAATAGAAAGTAAC 180
ATGTATAATAACGATAAAATATTAAGTAAAAATGAAGTAGATACATACTAATAATAGAAAGTAAC 180
ATGTATAATAACGATAAAATATTAAGTAAAAATGAAGTAGATACATACTAATAATAGAAAGTAAC 180
*****

```

MSP3.2FL 3D7
MSP3.2FL B1
MSP3.2FL B3
MSP3.2FL B4
MSP3.2FL B5
MSP3.2FL D1
MSP3.2FL D2
MSP3.2FL D3
MSP3.2FL D4
MSP3.2FL D5

```

GAAAATAGTATTACGAATCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT 240
GAAAATAGTATTACGAATCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT 240
GAAAATAGTATTACGAATCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT 240
GAAAATAGTATTACGAATCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT 240
GAAAATAGTATTACGAATCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT 240
GAAAATAGTATTACGAATCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT 240
GAAAATAGTATTACGAATCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT 240
GAAAATAGTATTACGAATCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT 240
GAAAATAGTATTACGAATCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT 240
GAAAATAGTATTACGAATCTGGACATAAGATTGATGGGGAAGAAGTTTAAAGCTAAT 240
*****

```

MSP3.2FL 3D7
MSP3.2FL B1
MSP3.2FL B3
MSP3.2FL B4
MSP3.2FL B5
MSP3.2FL D1
MSP3.2FL D2
MSP3.2FL D3
MSP3.2FL D4
MSP3.2FL D5

```

-----GTAGATGATATAACATACACAAAAAAATGTTGATGATTCAGAA 285
-----GTAGATGATATAACATACACAAAAAAATGTTGATGATTCAGAA 285
-----GTAGATGATATAACATACACAAAAAAATGTTGATGATTCAGAA 285
-----GTAGATGATATAACATACACAAAAAAATGTTGATGATTCAGAA 285
-----GTAGATGATATAACATACACAAAAAAATGTTGATGATTCAGAA 285
-----GTAGATGATATAACATACACAAAAAAATGTTGATGATTCAGAA 285
-----GTAGATGATATAACATACACAAAAAAATGTTGATGATTCAGAA 285
-----GTAGATGATATAACATACACAAAAAAATGTTGATGATTCAGAA 285
-----GTAGATGATATAACATACACAAAAAAATGTTGATGATTCAGAA 285
-----GTAGATGATATAACATACACAAAAAAATGTTGATGATTCAGAA 300
-----GTAGATGATATAACATACACAAAAAAATGTTGATGATTCAGAA 285
*****

```

MSP3.2FL 3D7
MSP3.2FL B1
MSP3.2FL B3
MSP3.2FL B4
MSP3.2FL B5
MSP3.2FL D1
MSP3.2FL D2
MSP3.2FL D3
MSP3.2FL D4

```

ATTCCCTTTTCTCGTTAATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAGGA 345
ATTCCCTTTTCTCGTTAATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAGGA 345
ATTCCCTTTTCTCGTTAATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAGGA 345
ATTCCCTTTTCTCGTTAATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAGGA 345
ATTCCCTTTTCTCGTTAATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAGGA 345
ATTCCCTTTTCTCGTTAATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAGGA 345
ATTCCCTTTTCTCGTTAATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAGGA 345
ATTCCCTTTTCTCGTTAATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAGGA 345
ATTCCCTTTTCTCGTTAATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAGGA 345
ATTCCCTTTTCTCGTTAATATACAAGCAACATATCAATTTCCCTTCTACATCAGGAGGA 360

```

MSP3.2FL D5	ATTCCTTTTCTGGTTATGATATACAAGCAACATATCAATTTCTTCTACATCAGGAGGA 345

MSP3.2FL 3D7	AATAATGTAATTCACCTTCCTATATAAAACAAAGTGGAGAAAATCAATATATACTGTTACATCT 405
MSP3.2FL B1	AATAATGTAATTCACCTTCCTATATAAAACAAAGTGGAGAAAATCAATATATACTGTTACATCT 405
MSP3.2FL B3	AATAATGTAATTCACCTTCCTATATAAAACAAAGTGGAGAAAATCAATATATACTGTTACATCT 405
MSP3.2FL B4	AATAATGTAATTCACCTTCCTATATAAAACAAAGTGGAGAAAATCAATATATACTGTTACATCT 405
MSP3.2FL B5	AATAATGTAATTCACCTTCCTATATAAAACAAAGTGGAGAAAATCAATATATACTGTTACATCT 405
MSP3.2FL D1	AATAATGTAATTCACCTTCCTATATAAAACAAAGTGGAGAAAATCAATATATACTGTTACATCT 405
MSP3.2FL D2	AATAATGTAATTCACCTTCCTATATAAAACAAAGTGGAGAAAATCAATATATACTGTTACATCT 405
MSP3.2FL D3	AATAATGTAATTCACCTTCCTATATAAAACAAAGTGGAGAAAATCAATATATACTGTTACATCT 405
MSP3.2FL D4	ATTA---TAAATCC---TCGTACTGGAGGAATACTGTAAATTCAC----CTCCTAGA--- 408
MSP3.2FL D5	AATAATGTAATTCACCTTCCTATATAAAACAAAGTGGAGAAAATCAATATATACTGTTACATCT 405
	* ** *** ** ** * ** * * ** * * ** * *
MSP3.2FL 3D7	ATATCAGGTATTCAAAGGGAGCAAAATGGTTTAACTGGTGCAACAGAAAATATTACACAA 465
MSP3.2FL B1	ATATCAGGTATTCAAAGGGAGCAAAATGGTTTAACTGGTGCAACAGAAAATATTACACAA 465
MSP3.2FL B3	ATATCAGGTATTCAAAGGGAGCAAAATGGTTTAACTGGTGCAACAGAAAATATTACACAA 465
MSP3.2FL B4	ATATCAGGTATTCAAAGGGAGCAAAATGGTTTAACTGGTGCAACAGAAAATATTACACAA 465
MSP3.2FL B5	ATATCAGGTATTCAAAGGGAGCAAAATGGTTTAACTGGTGCAACAGAAAATATTACACAA 465
MSP3.2FL D1	ATATCAGGTATTCAAAGGGAGCAAAATGGTTTAACTGGTGCAACAGAAAATATTACACAA 465
MSP3.2FL D2	ATATCAGGTATTCAAAGGGAGCAAAATGGTTTAACTGGTGCAACAGAAAATATTACACAA 465
MSP3.2FL D3	ATATCAGGTATTCAAAGGGAGCAAAATGGTTTAACTGGTGCAACAGAAAATATTACACAA 465
MSP3.2FL D4	AGACTAAGTGGACTAGAAGGTGTTTCTTATGCCATGTATCTACATCTTCTTAATCAATCA 468
MSP3.2FL D5	ATATCAGGTATTCAAAGGGAGCAAAATGGTTTAACTGGTGCAACAGAAAATATTACACAA 465
	* ** * ** * * * * * * * * * * * * * * * *
MSP3.2FL 3D7	GTTGTACAAGCAAACTCTGAACAACAAATAAAATCCTACTTCTCA-----TAGTAATA 517
MSP3.2FL B1	GTTGTACAAGCAAACTCTGAACAACAAATAAAATCCTACTTCTCA-----TAGTAATA 517
MSP3.2FL B3	GTTGTACAAGCAAACTCTGAACAACAAATAAAATCCTACTTCTCA-----TAGTAATA 517
MSP3.2FL B4	GTTGTACAAGCAAACTCTGAACAACAAATAAAATCCTACTTCTCA-----TAGTAATA 517
MSP3.2FL B5	GTTGTACAAGCAAACTCTGAACAACAAATAAAATCCTACTTCTCA-----TAGTAATA 517
MSP3.2FL D1	GTTGTACAAGCAAACTCTGAACAACAAATAAAATCCTACTTCTCA-----TAGTAATA 517
MSP3.2FL D2	GTTGTACAAGCAAACTCTGAACAACAAATAAAATCCTACTTCTCA-----TAGTAATA 517
MSP3.2FL D3	GTTGTACAAGCAAACTCTGAACAACAAATAAAATCCTACTTCTCA-----TAGTAATA 517
MSP3.2FL D4	CATCCTCAA--AGAGCCAACATCGGAGGAATATCCCATTTATCAGGGACACGTCGGAATTC 526
MSP3.2FL D5	GTTGTACAAGCAAACTCTGAACAACAAATAAAATCCTACTTCTGG-----TAGTAAAA 517
	* ** * ** * * * * * * * * * * * * * * *

9F

```

MSP3.2FL 3D7      GTACTACAACCTTCTCTGAAATAATAATATATACATTGGATGGGAATTTGGAGGAGGTGCTCCTC 577
MSP3.2FL B1       GTACTACAACCTTCTCTGAAATAATAATATATACATTGGATGGGAATTTGGAGGAGGTGCTCCTC 577
MSP3.2FL B3       GTACTACAACCTTCTCTGAAATAATAATATATACATTGGATGGGAATTTGGAGGAGGTGCTCCTC 577
MSP3.2FL B4       GTACTACAACCTTCTCTGAAATAATAATATATACATTGGATGGGAATTTGGAGGAGGTGCTCCTC 577
MSP3.2FL B5       GTACTACAACCTTCTCTGAAATAATAATATATACATTGGATGGGAATTTGGAGGAGGTGCTCCTC 577
MSP3.2FL D1       GTACTACAACCTTCTCTGAAATAATAATATATACATTGGATGGGAATTTGGAGGAGGTGCTCCTC 577
MSP3.2FL D2       GTACTACAACCTTCTCTGAAATAATAATATATACATTGGATGGGAATTTGGAGGAGGTGCTCCTC 577
MSP3.2FL D3       GTACTACAACCTTCTCTGAAATAATAATATATACATTGGATGGGAATTTGGAGGAGGTGCTCCTC 586
MSP3.2FL D4       ATACTTATTATCTCTGATAGTAAATATACATTGGATGGGAATTTGGAGGAGGTGCTCCTC 577
MSP3.2FL D5       GTACTACAACCTTCTCTGAAATAATAATATATACATTGGATGGGAATTTGGAGGAGGTGCTCCTC 577
      ***      * *****      * *****      * *****      * *****      * *****
MSP3.2FL 3D7      AAAATGGAGCTGCAGAGATATAAAGACAGAAATATTACTAGAACAAATAAATAATTTCCAT 637
MSP3.2FL B1       AAAATGGAGCTGCAGAGATATAAAGACAGAAATATTACTAGAACAAATAAATAATTTCCAT 637
MSP3.2FL B3       AAAATGGAGCTGCAGAGATATAAAGACAGAAATATTACTAGAACAAATAAATAATTTCCAT 637
MSP3.2FL B4       AAAATGGAGCTGCAGAGATATAAAGACAGAAATATTACTAGAACAAATAAATAATTTCCAT 637
MSP3.2FL B5       AAAATGGAGCTGCAGAGATATAAAGACAGAAATATTACTAGAACAAATAAATAATTTCCAT 637
MSP3.2FL D1       AAAATGGAGCTGCAGAGATATAAAGACAGAAATATTACTAGAACAAATAAATAATTTCCAT 637
MSP3.2FL D2       AAAATGGAGCTGCAGAGATATAAAGACAGAAATATTACTAGAACAAATAAATAATTTCCAT 637
MSP3.2FL D3       AAAATGGAGCTGCAGAGATATAAAGACAGAAATATTACTAGAACAAATAAATAATTTCCAT 637
MSP3.2FL D4       AAAATGGAGCTGCAGAGATATAAAGACAGAAATATTACTAGAACAAATAAATAATTTCCAT 646
MSP3.2FL D5       AAAATGGAGCTGCAGAGATATAAAGACAGAAATATTACTAGAACAAATAAATAATTTCCAT 637
      *****      *****      *****      *****      *****      *****
MSP3.2FL 3D7      CATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAACAAGTAATAGAGGACCCCTCAGAGAG 697
MSP3.2FL B1       CATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAACAAGTAATAGAGGACCCCTCAGAGAG 697
MSP3.2FL B3       CATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAACAAGTAATAGAGGACCCCTCAGAGAG 697
MSP3.2FL B4       CATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAACAAGTAATAGAGGACCCCTCAGAGAG 697
MSP3.2FL B5       CATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAACAAGTAATAGAGGACCCCTCAGAGAG 697
MSP3.2FL D1       CATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAACAAGTAATAGAGGACCCCTCAGAGAG 697
MSP3.2FL D2       CATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAACAAGTAATAGAGGACCCCTCAGAGAG 697
MSP3.2FL D3       CATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAACAAGTAATAGAGGACCCCTCAGAGAG 697
MSP3.2FL D4       CATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAACAAGTAATAGAGGACCCCTCAGAGAG 706
MSP3.2FL D5       CATGGGATAGAAATAACATCCCCGATGAGAATGAACAAGTAATAGAGGACCCCTCAGAGAG 697
      *****      *****      *****      *****      *****      *****
MSP3.2FL 3D7      ATAATAAGATGAAGATGAAGATGAAGA-----AACAGAAACAGAAATTTGGAAACAG 751

```

Figure 9G shows a sequence alignment of multiple DNA fragments. The fragments are labeled MSP3.2FL 3D7, MSP3.2FL B1, MSP3.2FL B3, MSP3.2FL B4, MSP3.2FL B5, MSP3.2FL D1, MSP3.2FL D2, MSP3.2FL D3, MSP3.2FL D4, MSP3.2FL D5, and MSP3.2FL 3D7. The alignment shows conserved regions across the fragments, with some gaps indicated by dashes. The sequence is presented in a standard nucleotide format (A, T, C, G).

[illegible][illegible][illegible]

AAGAAGAAAAAAAAACCAGACAATGGAATTACAAATGAGTTAAAGAGGAACAAAAATATA 931
AAGAAGAAAAAAAAACCAGACAATGGAATTACAAATGAGTTAAAGAGGAACAAAAATATA 931
AAGAAGAAAAAAAAACCAGACAATGGAATTACAAATGAGTTAAAGAGGAACAAAAATATA 931

MSP3.2FL B1
MSP3.2FL B3
MSP3.2FL B4
MSP3.2FL B5
MSP3.2FL D1
MSP3.2FL D2
MSP3.2FL D3
MSP3.2FL D4
MSP3.2FL D5

MSP3.2FL D7
MSP3.2FL B1
MSP3.2FL B3
MSP3.2FL B4
MSP3.2FL B5
MSP3.2FL D1
MSP3.2FL D2
MSP3.2FL D3
MSP3.2FL D4
MSP3.2FL D5

MSP3.2FL 3D7
MSP3.2FL B1
MSP3.2FL B3
MSP3.2FL B4
MSP3.2FL B5
MSP3.2FL D1
MSP3.2FL D2
MSP3.2FL D3
MSP3.2FL D4
MSP3.2FL D5

MSP3.2FL 3D7
MSP3.2FL B1
MSP3.2FL B3

9H

MSP3.2FL B4
 MSP3.2FL B5
 MSP3.2FL D1
 MSP3.2FL D2
 MSP3.2FL D3
 MSP3.2FL D4
 MSP3.2FL D5

AAGAAAGAAAAAACCAGACAATGAATTAACAATGAAGTTAAAGAGGAACAAAAATATA 931
 AAGAAGAAAAAACCAGACAATGAATTAACAATGAAGTTAAAGAGGAACAAAAATATA 931
 AAGAAAGAAAAAACCAGACAATGAATTAACAATGAAGTTAAAGAGGAACAAAAATATA 931
 AAGAAGAAAAAACCAGACAATGAATTAACAATGAAGTTAAAGAGGAACAAAAATATA 931
 AAGAAAGAAAAAACCAGACAATGAATTAACAATGAAGTTAAAGAGGAACAAAAATATA 931
 AAGAAGAAAAAACCAGACAATGAATTAACAATGAAGTTAAAGAGGAACAAAAATATA 946
 AAGAAGAAAAAACCAGACAATGAATTAACAATGAAGTTAAAGAGGAACAAAAATATA 931

MSP3.2FL 3D7
 MSP3.2FL B1
 MSP3.2FL B3
 MSP3.2FL B4
 MSP3.2FL B5
 MSP3.2FL D1
 MSP3.2FL D2
 MSP3.2FL D3
 MSP3.2FL D4
 MSP3.2FL D5

GTTCACCAAGTGATATAAATGCCCCAAATTTAAATTTCTAATAAGAAATAAAAAGAATGATG 991
 GTTCACCAAGTGATATAAATGCCCCAAATTTAAATTTCTAATAAGAAATAAAAAGAATGATG 991
 GTTCACCAAGTGATATAAATGCCCCAAATTTAAATTTCTAATAAGAAATAAAAAGAATGATG 991
 GTTCACCAAGTGATATAAATGCCCCAAATTTAAATTTCTAATAAGAAATAAAAAGAATGATG 991
 GTTCACCAAGTGATATAAATGCCCCAAATTTAAATTTCTAATAAGAAATAAAAAGAATGATG 991
 GTTCACCAAGTGATATAAATGCCCCAAATTTAAATTTCTAATAAGAAATAAAAAGAATGATG 991
 GTTCACCAAGTGATATAAATGCCCCAAATTTAAATTTCTAATAAGAAATAAAAAGAATGATG 991
 GTTCACCAAGTGATATAAATGCCCCAAATTTAAATTTCTAATAAGAAATAAAAAGAATGATG 991
 GTTCACCAAGTGATATAAATGCCCCAAATTTAAATTTCTAATAAGAAATAAAAAGAATGATG 1006
 GTTCACCAAGTGATATAAATGCCCCAAATTTAAATTTCTAATAAGAAATAAAAAGAATGATG 991

MSP3.2FL 3D7
 MSP3.2FL B1
 MSP3.2FL B3
 MSP3.2FL B4
 MSP3.2FL B5
 MSP3.2FL D1
 MSP3.2FL D2
 MSP3.2FL D3
 MSP3.2FL D4
 MSP3.2FL D5

AAACAAAAAGACTGCTGAAAAATATAGTTAAAAACATTTGGTTGGATTATTTAATGAATAAAA 1051
 AAACAAAAAGACTGCTGAAAAATATAGTTAAAAACATTTGGTTGGATTATTTAATGAATAAAA 1051
 AAACAAAAAGACTGCTGAAAAATATAGTTAAAAACATTTGGTTGGATTATTTAATGAATAAAA 1051
 AAACAAAAAGACTGCTGAAAAATATAGTTAAAAACATTTGGTTGGATTATTTAATGAATAAAA 1051
 AAACAAAAAGACTGCTGAAAAATATAGTTAAAAACATTTGGTTGGATTATTTAATGAATAAAA 1051
 AAACAAAAAGACTGCTGAAAAATATAGTTAAAAACATTTGGTTGGATTATTTAATGAATAAAA 1051
 AAACAAAAAGACTGCTGAAAAATATAGTTAAAAACATTTGGTTGGATTATTTAATGAATAAAA 1051
 AAACAAAAAGACTGCTGAAAAATATAGTTAAAAACATTTGGTTGGATTATTTAATGAATAAAA 1051
 AAACAAAAAGACTGCTGAAAAATATAGTTAAAAACATTTGGTTGGATTATTTAATGAATAAAA 1066
 AAACAAAAAGACTGCTGAAAAATATAGTTAAAAACATTTGGTTGGATTATTTAATGAATAAAA 1051

MSP3.2FL 3D7
 MSP3.2FL B1
 MSP3.2FL B3
 MSP3.2FL B4
 MSP3.2FL B5

ATGAGATAGATTCTCTATAATAATTTAGTACAAGAAATGATCCATCTATTTAGTAATA 1111
 ATGAGATAGATTCTCTATAATAATTTAGTACAAGAAATGATCCATCTATTTAGTAATA 1111
 ATGAGATAGATTCTCTATAATAATTTAGTACAAGAAATGATCCATCTATTTAGTAATA 1111
 ATGAGATAGATTCTCTATAATAATTTAGTACAAGAAATGATCCATCTATTTAGTAATA 1111
 ATGAGATAGATTCTCTATAATAATTTAGTACAAGAAATGATCCATCTATTTAGTAATA 1111

MSP3.2FL D1
MSP3.2FL D2
MSP3.2FL D3
MSP3.2FL D4
MSP3.2FL D5

ATGAGATAGATTCTACTATAAATAATTAGTACAAGAAATGATCCATCTATTTAGTAATA 1111
ATGAGATAGATTCTACTATAAATAATTAGTACAAGAAATGATCCATCTATTTAGTAATA 1111
ATGAGATAGATTCTACTATAAATAATTAGTACAAGAAATGATCCATCTATTTAGTAATA 1111
ATGGGATAGATTCTACTATAAATAATTAGTACAAGAAATGATCCATCTATTTAGTAATA 1126
ATGAGATAGATTCTACTATAAATAATTAGTACAAGAAATGATCCATCTATTTAGTAATA 1111
*** *****

MSP3.2FL 3D7
MSP3.2FL B1
MSP3.2FL B3
MSP3.2FL B4
MSP3.2FL B5
MSP3.2FL D1
MSP3.2FL D2
MSP3.2FL D3
MSP3.2FL D4
MSP3.2FL D5

AATAA 1116
AATAA 1116
AATAA 1116
AATAA 1116
AATAA 1116
AATAA 1116
AATAA 1116
AATAA 1131
AATAA 1116

ClustalW 比对 ORF2C 核苷酸序列 (Nucleotide sequence of ORF2C)

CLUSTAL W (1.82) 多重序列比对

MSP3.3C 3D7
MSP3.3C B1
MSP3.3C B2
MSP3.3C B5
MSP3.3C D1
MSP3.3C D2
MSP3.3C D4
MSP3.3C D5

TATGAGAAGAAATGAAATAAATAATGTATCAAAATGTAGATTCAAAAACAAAATCAAAT 60
TATGAGAAGAAATGAAATAAATAATGTATCAAAATGTAGATTCAAAAACAAAATCAAAT 60
-ATGAGAAGAAATGAAATAAATAATGTATCAAAATGTAGATTCAAAAACAAAATCAAAT 59
TATGAGAAGAAATGAAATAAATAATGTATCAAAATGTAGATTCAAAAACAAAATCAAAT 60
TATGAGAAGAAATGAAATAAATAATGTATCAAAATGTAGATTCAAAAACAAAATCAAAT 60
TATGAGAAGAAATGAAATAAATAATGTATCAAAATGTAGATTCAAAAACAAAATCAAAT 60
TATGAGAAGAAATGAAATAAATAATGTATCAAAATGTAGATTCAAAAACAAAATCAAAT 60
TATGAGAAGAAATGAAATAAATAATGTATCAAAATGTAGATTCAAAAACAAAATCAAAT 60

GAAAAGGAAGACCTCTACATATTCCTCCTATTCCTGATGATGGATAGAAATTTAGTGGT 120
GAAAAGGAAGACCTCTACATATTCCTCCTATTCCTGATGATGGATAGAAATTTAGTGGT 120
GAAAAGGAAGACCTCTACATATTCCTCCTATTCCTGATGATGGATAGAAATTTAGTGGT 119

GAAAAAGGAAGACCTCCTACATATTCTCCTATTCTCGATGATGGGATAGAATTTTAGTGGT	MSP3_3C B5
GAAAAAGGAAGACCTCCTACATATTCTCCTATTCTCGATGATGGGATAGAATTTTAGTGGT	MSP3_3C D1
GAAAAAGGAAGACCTCCTACATATTCTCCTATTCTCGATGATGGGATAGAATTTTAGTGGT	MSP3_3C D2
GAAAAAGGAAGACCTCCTACATATTCTCCTATTCTCGATGATGGGATAGAATTTTAGTGGT	MSP3_3C D4
GAAAAAGGAAGACCTCCTACATATTCTCCTATTCTCGATGATGGGATAGAATTTTAGTGGT	MSP3_3C D5

	3C	3C	3D7
MSP3	3C	3C	3D7
B1	B1	B1	B1
B2	B2	B2	B2
B5	B5	B5	B5
D1	D1	D1	D1
D2	D2	D2	D2
D4	D4	D4	D4
D5	D5	D5	D5

[illegible]

MSP3.3C 3D7	GATGAAAAGGATGTAAGATGATGTAAGAAAGAAAGAAAGAAATACGAAAACGAAATTTATATAAG	300
MSP3.3C B1	GATGAAAAGGATGTAAGATGATGTAAGAAAGAAAGAAATACGAAAACGAAATTTATATAAG	300
MSP3.3C B2	GATGAAAAGGATGTAAGATGATGTAAGAAAGAAAGAAATACGAAAACGAAATTTATATAAG	299
MSP3.3C B5	GATGAAAAGGATGTAAGATGATGTAAGAAAGAAAGAAATACGAAAACGAAATTTATATAAG	300
MSP3.3C D1	GATGAAAAGGATGTAAGATGATGTAAGAAAGAAAGAAATACGAAAACGAAATTTATATAAG	300
MSP3.3C D2	GATGAAAAGGATGTAAGATGATGTAAGAAAGAAAGAAATACGAAAACGAAATTTATATAAG	300
MSP3.3C D4	GATGAAAAGGATGTAAGATGATGTAAGAAAGAAAGAAATACGAAAACGAAATTTATATAAG	300
MSP3.3C D5	GATGAAAAGGATGTAAGATGATGTAAGAAAGAAAGAAATACGAAAACGAAATTTATATAAG	300

MSP3.3C 3D7
CAACCAGAAGACATATTGGATGAGGAGAAGCTATTAGAAGAAGAAATATTAGACGAAAAT 360

9K

```

MSP3.3C B1 CAACCAAGACATATTGGATGAGGAAGAGTATTAGAAAGAAATATTAGAAAGAAAAT 360
MSP3.3C B2 CAACCAAGACATATTGGATGAGGAAGAGTATTAGAAAGAAATATTAGAAAGAAAAT 359
MSP3.3C B5 CAACCAAGACATATTGGATGAGGAAGAGTATTAGAAAGAAATATTAGAAAGAAAAT 360
MSP3.3C D1 CAACCAAGACATATTGGATGAGGAAGAGTATTAGAAAGAAATATTAGAAAGAAAAT 360
MSP3.3C D2 CAACCAAGACATATTGGATGAGGAAGAGTATTAGAAAGAAATATTAGAAAGAAAAT 360
MSP3.3C D4 CAACCAAGACATATTGGATGAGGAAGAGTATTAGAAAGAAATATTAGAAAGAAAAT 360
MSP3.3C D5 CAACCAAGACATATTGGATGAGGAAGAGTATTAGAAAGAAATATTAGAAAGAAAAT 360
*****

MSP3.3C 3D7 AAAATGATACAGTAGATACAAGTGATTTAGAAAAGAAAATATACCAGATTTTATCAAAC 420
MSP3.3C B1 AAAATGATACAGTAGATACAAGTGATTTAGAAAAGAAAATATACCAGATTTTATCAAAC 420
MSP3.3C B2 AAAATGATACAGTAGATACAAGTGATTTAGAAAAGAAAATATACCAGATTTTATCAAAC 419
MSP3.3C B5 AAAATGATACAGTAGATACAAGTGATTTAGAAAAGAAAATATACCAGATTTTATCAAAC 420
MSP3.3C D1 AAAATGATACAGTAGATACAAGTGATTTAGAAAAGAAAATATACCAGATTTTATCAAAC 420
MSP3.3C D2 AAAATGATACAGTAGATACAAGTGATTTAGAAAAGAAAATATACCAGATTTTATCAAAC 420
MSP3.3C D4 AAAATGATACAGTAGATACAAGTGATTTAGAAAAGAAAATATACCAGATTTTATCAAAC 420
MSP3.3C D5 AAAATGATACAGTAGATACAAGTGATTTAGAAAAGAAAATATACCAGATTTTATCAAAC 420
*****

MSP3.3C 3D7 GATAATAAETATATAGTTTAATTTATAAGAACTATAAGGATAATGATAAATCAGAAAAA 480
MSP3.3C B1 GATAATAAETATATAGTTTAATTTATAAGAACTATAAGGATAATGATAAATCAGAAAAA 480
MSP3.3C B2 GATAATAAETATATAGTTTAATTTATAAGAACTATAAGGATAATGATAAATCAGAAAAA 479
MSP3.3C B5 GATAATAAETATATAGTTTAATTTATAAGAACTATAAGGATAATGATAAATCAGAAAAA 480
MSP3.3C D1 GATAATAAETATATAGTTTAATTTATAAGAACTATAAGGATAATGATAAATCAGAAAAA 480
MSP3.3C D2 GATAATAAETATATAGTTTAATTTATAAGAACTATAAGGATAATGATAAATCAGAAAAA 480
MSP3.3C D4 GATAATAAETATATAGTTTAATTTATAAGAACTATAAGGATAATGATAAATCAGAAAAA 480
MSP3.3C D5 GATAATAAETATATAGTTTAATTTATAAGAACTATAAGGATAATGATAAATCAGAAAAA 480
*****

MSP3.3C 3D7 ACTGCACAAACATTAAATCACAGCTCTGATAAGTTTATTAAATGGAAAAAATGAATTAGAT 540
MSP3.3C B1 ACTGCACAAACATTAAATCACAGCTCTGATAAGTTTATTAAATGGAAAAAATGAATTAGAT 540
MSP3.3C B2 ACTGCACAAACATTAAATCACAGCTCTGATAAGTTTATTAAATGGAAAAAATGAATTAGAT 539
MSP3.3C B5 ACTGCACAAACATTAAATCACAGCTCTGATAAGTTTATTAAATGGAAAAAATGAATTAGAT 540
MSP3.3C D1 ACTGCACAAACATTAAATCACAGCTCTGATAAGTTTATTAAATGGAAAAAATGAATTAGAT 540
MSP3.3C D2 ACTGCACAAACATTAAATCACAGCTCTGATAAGTTTATTAAATGGAAAAAATGAATTAGAT 540
MSP3.3C D4 ACTGCACAAACATTAAATCACAGCTCTGATAAGTTTATTAAATGGAAAAAATGAATTAGAT 540
MSP3.3C D5 ACTGCACAAACATTAAATCACAGCTCTGATAAGTTTATTAAATGGAAAAAATGAATTAGAT 540
*****

```



9L

```

MSP3.3C 3D7      GCTACCATAGAAGATTAAACATAGGTTTATGGAAATTTTACATATAATTAA 594
MSP3.3C B1       GCTACCATAGAAGATTAAACATAGGTTTATGGAAATTTTACATATAATTAA 594
MSP3.3C B2       GCTACCATAGAAGATTAAACATAGGTTTATGGAAATTTTACATATAATTAA 593
MSP3.3C B5       GCTACCATAGAAGATTAAACATAGGTTTATGGAAATTTTACATATAATTAA 594
MSP3.3C D1       GCTACCATAGAAGATTAAACATAGGTTTATGGAAATTTTACATATAATTAA 594
MSP3.3C D2       GCTACCATAGAAGATTAAACATAGGTTTATGGAAATTTTACATATAATTAA 594
MSP3.3C D4       GCTACCATAGAAGATTAAACATAGGTTTATGGAAATTTTACATATAATTAA 594
MSP3.3C D5       GCTACCATAGAAGATTAAACATAGGTTTATGGAAATTTTACATATAATTAA 594
*****

```

ClustalW 比对 **ORF3C** 核苷酸序列 (www.ebi.ac.uk/clustalw/) **MSP3-4**

CLUSTAL W (1.82) 多重序列比对

```

MSP3.4C 3D7      GATAATGTAAACTCTGTAAACGCAAGAGGAAATAATACTACAACAATAATTAGAGCGT 60
MSP3.4C B4       -ATAATGTAAACTCTGTAAACGCAAGAGGAAATAATACTACAACAATAATTAGAGCGT 59
MSP3.4C B1       GATAATGTAAACTCTGTAAACGCAAGAGGAAATAATACTACAACAATAATTAGAGCGT 60
MSP3.4C B5       GATAATGTAAACTCTGTAAACGCAAGAGGAAATAATACTACAACAATAATTAGAGCGT 60
MSP3.4C D4       GATAATGTAAACTCTGTAAACGCAAGAGGAAATAATACTACAACAATAATTAGAGCGT 60
MSP3.4C D5       GATAATGTAAACTCTGTAAACGCAAGAGGAAATAATACTACAACAATAATTAGAGCGT 60
MSP3.4C D2       GATAATGTAAACTCTGTAAACGCAAGAGGAAATAATACTACAACAATAATTAGAGCGT 60
MSP3.4C D1       GATAATGTAAACTCTGTAAACGCAAGAGGAAATAATACTACAACAATAATTAGAGCGT 60
*****

MSP3.4C 3D7      GGATTGGGTTCTGGTGCCTCTCTGGTACAAATATTATTACTGAAGAAAAATATTCCTA 120
MSP3.4C B4       GGATTGGGTTCTGGTGCCTCTCTGGTACAAATATTATTACTGAAGAAAAATATTCCTA 119
MSP3.4C B1       GGATTGGGTTCTGGTGCCTCTCTGGTACAAATATTATTACTGAAGAAAAATATTCCTA 120
MSP3.4C B5       GGATTGGGTTCTGGTGCCTCTCTGGTACAAATATTATTACTGAAGAAAAATATTCCTA 120
MSP3.4C D4       GGATTGGGTTCTGGTGCCTCTCTGGTACAAATATTATTACTGAAGAAAAATATTCCTA 120
MSP3.4C D5       GGATTGGGTTCTGGTGCCTCTCTGGTACAAATATTATTACTGAAGAAAAATATTCCTA 120
MSP3.4C D2       GGATTGGGTTCTGGTGCCTCTCTGGTACAAATATTATTACTGAAGAAAAATATTCCTA 120
MSP3.4C D1       GGATTGGGTTCTGGTGCCTCTCTGGTACAAATATTATTACTGAAGAAAAATATTCCTA 120
*****

MSP3.4C 3D7      GAATTAATAAATAAAGTCAAGCATGAAGAGATATTATAAGCATAAATGAGGATGTG 180

```

图 9M

MSP3.4C B4 GAATTAATAAAATTAAACATCAAAGGATGAAGAAAGATATTATAAANGCATAATGAGGATGTG 179
 MSP3.4C B1 GAATTAATAAAATTAAACATCAAAGGATGAAGAAAGATATTATAAANGCATAATGAGGATGTG 180
 MSP3.4C B5 GAATTAATAAAATTAAACATCAAAGGATGAAGAAAGATATTATAAANGCATAATGAGGATGTG 180
 MSP3.4C D4 GAATTAATAAAATTAAACATCAAAGGATGAAGAAAGATATTATAAANGCATAATGAGGATGTG 180
 MSP3.4C D5 GAATTAATAAAATTAAACATCAAAGGATGAAGAAAGATATTATAAANGCATAATGAGGATGTG 180
 MSP3.4C D2 GAATTAATAAAATTAAACATCAAAGGATGAAGAAAGATATTATAAANGCATAATGAGGATGTG 180
 MSP3.4C D1 GAATTAATAAAATTAAACATCAAAGGATGAAGAAAGATATTATAAANGCATAATGAGGATGTG 180

MSP3.4C 3D7 AGAGAAGAAATAGAGAACAACAAGAAGACATCGAGGAAGNTGAAGANGAATTTGGAAAAAT 240
 MSP3.4C B4 AGAGAAGAAATAGAGAACAACAAGAAGACATCGAGGAAGNTGAAGANGAATTTGGAAAAAT 239
 MSP3.4C B1 AGAGAAGAAATAGAGAACAACAAGAAGACATCGAGGAAGNTGAAGANGAATTTGGAAAAAT 240
 MSP3.4C B5 AGAGAAGAAATAGAGAACAACAAGAAGACATCGAGGAAGNTGAAGANGAATTTGGAAAAAT 240
 MSP3.4C D4 AGAGAAGAAATAGAGAACAACAAGAAGACATCGAGGAAGNTGAAGANGAATTTGGAAAAAT 240
 MSP3.4C D5 AGAGAAGAAATAGAGAACAACAAGAAGACATCGAGGAAGNTGAAGANGAATTTGGAAAAAT 240
 MSP3.4C D2 AGAGAAGAAATAGAGAACAACAAGAAGACATCGAGGAAGNTGAAGANGAATTTGGAAAAAT 240
 MSP3.4C D1 AGAGAAGAAATAGAGAACAACAAGAAGACATCGAGGAAGNTGAAGANGAATTTGGAAAAAT 240

MSP3.4C 3D7 GAAGGAGAGAGAAACAAGAGAGAGATGATGAAGAAAGATGAACCAATGATACGGAA 300
 MSP3.4C B4 GAAGGAGAGAGAAACAAGAGAGAGATGATGAAGAAAGATGAACCAATGATACGGAA 299
 MSP3.4C B1 GAAGGAGAGAGAAACAAGAGAGAGATGATGAAGAAAGATGAACCAATGATACGGAA 300
 MSP3.4C B5 GAAGGAGAGAGAAACAAGAGAGAGATGATGAAGAAAGATGAACCAATGATACGGAA 300
 MSP3.4C D4 GAAGGAGAGAGAAACAAGAGAGAGATGATGAAGAAAGATGAACCAATGATACGGAA 300
 MSP3.4C D5 GAAGGAGAGAGAAACAAGAGAGAGATGATGAAGAAAGATGAACCAATGATACGGAA 300
 MSP3.4C D2 GAAGGAGAGAGAAACAAGAGAGAGATGATGAAGAAAGATGAACCAATGATACGGAA 300
 MSP3.4C D1 GAAGGAGAGAGAAACAAGAGAGAGATGATGAAGAAAGATGAACCAATGATACGGAA 300

MSP3.4C 3D7 GATACGGACGATACCTGAGATACCGAAGATATAGAGAGGAGAAATAAGGAAAAAGAACTC 360
 MSP3.4C B4 GATACGGACGATACCTGAGATACCGAAGATATAGAGAGGAGAAATAAGGAAAAAGAACTC 359
 MSP3.4C B1 GATACGGACGATACCTGAGATACCGAAGATATAGAGAGGAGAAATAAGGAAAAAGAACTC 360
 MSP3.4C B5 GATACGGACGATACCTGAGATACCGAAGATATAGAGAGGAGAAATAAGGAAAAAGAACTC 360
 MSP3.4C D4 GATACGGACGATACCTGAGATACCGAAGATATAGAGAGGAGAAATAAGGAAAAAGAACTC 360
 MSP3.4C D5 GATACGGACGATACCTGAGATACCGAAGATATAGAGAGGAGAAATAAGGAAAAAGAACTC 360
 MSP3.4C D2 GATACGGACGATACCTGAGATACCGAAGATATAGAGAGGAGAAATAAGGAAAAAGAACTC 360
 MSP3.4C D1 GATACGGACGATACCTGAGATACCGAAGATATAGAGAGGAGAAATAAGGAAAAAGAACTC 360



MSP3.4C	3D7	AGTAATCAACAAGTGAAAAAAGTATTTCAAAAGTTGACGAAGATTCATATCGA	420
MSP3.4C	B4	AGTAATCAACAAGTGAAAAAAGTATTTCAAAAGTTGACGAAGATTCATATCGA	419
MSP3.4C	B1	AGTAATCAACAAGTGAAAAAAGTATTTCAAAAGTTGACGAAGATTCATATCGA	420
MSP3.4C	B5	AGTAATCAACAAGTGAAAAAAGTATTTCAAAAGTTGACGAAGATTCATATCGA	420
MSP3.4C	D4	AGTAATCAACAAGTGAAAAAAGTATTTCAAAAGTTGACGAAGATTCATATCGA	420
MSP3.4C	D5	AGTAATCAACAAGTGAAAAAAGTATTTCAAAAGTTGACGAAGATTCATATCGA	420
MSP3.4C	D2	AGTAATCAACAAGTGAAAAAAGTATTTCAAAAGTTGACGAAGATTCATATCGA	420
MSP3.4C	D1	AGTAATCAACAAGTGAAAAAAGTATTTCAAAAGTTGACGAAGATTCATATCGA	420

MSP3.4C	3D7	ATACTATCAGTAAGTTATAAGGACAATAATGAAGTAAAAAATGTTGCTGAATCTATAGTG	480
MSP3.4C	B4	ATACTATCAGTAAGTTATAAGGACAATAATGAAGTAAAAAATGTTGCTGAATCTATAGTG	479
MSP3.4C	B1	ATACTATCAGTAAGTTATAAGGACAATAATGAAGTAAAAAATGTTGCTGAATCTATAGTG	480
MSP3.4C	B5	ATACTATCAGTAAGTTATAAGGACAATAATGAAGTAAAAAATGTTGCTGAATCTATAGTG	480
MSP3.4C	D4	ATACTATCAGTAAGTTATAAGGACAATAATGAAGTAAAAAATGTTGCTGAATCTATAGTG	480
MSP3.4C	D5	ATACTATCAGTAAGTTATAAGGACAATAATGAAGTAAAAAATGTTGCTGAATCTATAGTG	480
MSP3.4C	D2	ATACTATCAGTAAGTTATAAGGACAATAATGAAGTAAAAAATGTTGCTGAATCTATAGTG	480
MSP3.4C	D1	ATACTATCAGTAAGTTATAAGGACAATAATGAAGTAAAAAATGTTGCTGAATCTATAGTG	480

MSP3.4C	3D7	AAAAAAGTATTTAGTTTATTAATGATAATAATAATTTGGAAACTATTTTAAAGGTTTG	540
MSP3.4C	B4	AAAAAAGTATTTAGTTTATTAATGATAATAATAATTTGGAAACTATTTTAAAGGTTTG	539
MSP3.4C	B1	AAAAAAGTATTTAGTTTATTAATGATAATAATAATTTGGAAACTATTTTAAAGGTTTG	540
MSP3.4C	B5	AAAAAAGTATTTAGTTTATTAATGATAATAATAATTTGGAAACTATTTTAAAGGTTTG	540
MSP3.4C	D4	AAAAAAGTATTTAGTTTATTAATGATAATAATAATTTGGAAACTATTTTAAAGGTTTG	540
MSP3.4C	D5	AAAAAAGTATTTAGTTTATTAATGATAATAATAATTTGGAAACTATTTTAAAGGTTTG	540
MSP3.4C	D2	AAAAAAGTATTTAGTTTATTAATGATAATAATAATTTGGAAACTATTTTAAAGGTTTG	540
MSP3.4C	D1	AAAAAAGTATTTAGTTTATTAATGATAATAATAATTTGGAAACTATTTTAAAGGTTTG	540

MSP3.4C	3D7	ACAGAAGATATGACAGATTATTTTCAAAAATAA	573
MSP3.4C	B4	ACAGAAGATATGACAGATTATTTTCAAAAATAA	572
MSP3.4C	B1	ACAGAAGATATGACAGATTATTTTCAAAAATAA	573
MSP3.4C	B5	ACAGAAGATATGACAGATTATTTTCAAAAATAA	573
MSP3.4C	D4	ACAGAAGATATGACAGATTATTTTCAAAAATAA	573
MSP3.4C	D5	ACAGAAGATATGACAGATTATTTTCAAAAATAA	573
MSP3.4C	D2	ACAGAAGATATGACAGATTATTTTCAAAAATAA	573
MSP3.4C	D1	ACAGAAGATATGACAGATTATTTTCAAAAATAA	573

MSP3.4C D1 ACAGAAAGATATGACAGATTTTATTTCAAAAATAA 573

ClusterW 比对 ORF6C... 核苷酸序列 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/mSP3-7

CLUSTAL W (1.82) 多重序列比对

MSP3.7C	3D7	CCTGAAGGACCAAGAGGCAACCAATAGAAATGAAATANTCAAAATACAGATCCATATAAC 60
MSP3.7C	B1	CCTGAAGGACCAAGAGGCAACCAATAGAAATGAAATANTCAAAATACAGATCCATATAAC 60
MSP3.7C	B2	CCTGAAGGACCAAGAGGCAACCAATAGAAATGAAATANTCAAAATACAGATCCATATAAC 60
MSP3.7C	B3	CCTGAAGGACCAAGAGGCAACCAATAGAAATGAAATANTCAAAATACAGATCCATATAAC 60
MSP3.7C	B4	CCTGAAGGACCAAGAGGCAACCAATAGAAATGAAATANTCAAAATACAGATCCATATAAC 60
MSP3.7C	B5	CCTGAAGGACCAAGAGGCAACCAATAGAAATGAAATANTCAAAATACAGATCCATATAAC 60
MSP3.7C	D1	CCTGAAGGACCAAGAGGCAACCAATAGAAATGAAATANTCAAAATACAGATCCATATAAC 60
MSP3.7C	D2	CCTGAAGGACCAAGAGGCAACCAATAGAAATGAAATANTCAAAATACAGATCCATATAAC 60
MSP3.7C	D5	CCTGAAGGACCAAGAGGCAACCAATAGAAATGAAATANTCAAAATACAGATCCATATAAC 60
MSP3.7C	additional	*****
MSP3.7C	3D7	CACTATTTTGCATGGGAATTTGGAGGTGGTGTCTCCAACCTATATAAACCCGAGAACAAATAAG 120
MSP3.7C	B1	CACTATTTTGCATGGGAATTTGGAGGTGGTGTCTCCAACCTATATAAACCCGAGAACAAATAAG 120
MSP3.7C	B2	CACTATTTTGCATGGGAATTTGGAGGTGGTGTCTCCAACCTATATAAACCCGAGAACAAATAAG 120
MSP3.7C	B3	CACTATTTTGCATGGGAATTTGGAGGTGGTGTCTCCAACCTATATAAACCCGAGAACAAATAAG 120
MSP3.7C	B4	CACTATTTTGCATGGGAATTTGGAGGTGGTGTCTCCAACCTATATAAACCCGAGAACAAATAAG 120
MSP3.7C	B5	CACTATTTTGCATGGGAATTTGGAGGTGGTGTCTCCAACCTATATAAACCCGAGAACAAATAAG 120
MSP3.7C	D1	CACTATTTTGCATGGGAATTTGGAGGTGGTGTCTCCAACCTATATAAACCCGAGAACAAATAAG 120

图9P

CACTATTTGTCATGGGAAATTTGGAGGTGGTCTCCACGTTATTAACCCGAGAACCAATAAG 120
CACTATTTGTCATGGGAAATTTGGAGGTGGTCTCCACGTTATTAACCCGAGAACCAATAAG 120
CACTATTTGTCATGGGAAATTTGGAGGTGGTCTCCACGTTATTAACCCGAGAACCAATAAG 120

AAACGATAATATTTTGTCTAGAACACGTAATAAATTACCTCGTGGGATTAAGAAGATATAATT 180
AAACGATAATATTTTGTCTAGAACACGTAATAAATTACCTCGTGGGATTAAGAAGATATAATT 180
AAACGATAATATTTTGTCTAGAACACGTAATAAATTACCTCGTGGGATTAAGAAGATATAATT 180
AAACGATAATATTTTGTCTAGAACACGTAATAAATTACCTCGTGGGATTAAGAAGATATAATT 180
AAACGATAATATTTTGTCTAGAACACGTAATAAATTACCTCGTGGGATTAAGAAGATATAATT 180
AAACGATAATATTTTGTCTAGAACACGTAATAAATTACCTCGTGGGATTAAGAAGATATAATT 180
AAACGATAATATTTTGTCTAGAACACGTAATAAATTACCTCGTGGGATTAAGAAGATATAATT 180
AAACGATAATATTTTGTCTAGAACACGTAATAAATTACCTCGTGGGATTAAGAAGATATAATT 180
AAACGATAATATTTTGTCTAGAACACGTAATAAATTACCTCGTGGGATTAAGAAGATATAATT 180
AAACGATAATATTTTGTCTAGAACACGTAATAAATTACCTCGTGGGATTAAGAAGATATAATT 180

AAAGAAATATGAAGACACAAAACGCGAAGTTTCAGAAACTGAAGACACTGACGGAACCTGAA 240
AAAGAAATATGAAGACACAAAACGCGAAGTTTCAGAAACTGAAGACACTGACGGAACCTGAA 240
AAAGAAATATGAAGACACAAAACGCGAAGTTTCAGAAACTGAAGACACTGACGGAACCTGAA 240
AAAGAAATATGAAGACACAAAACGCGAAGTTTCAGAAACTGAAGACACTGACGGAACCTGAA 240
AAAGAAATATGAAGACACAAAACGCGAAGTTTCAGAAACTGAAGACACTGACGGAACCTGAA 240
AAAGAAATATGAAGACACAAAACGCGAAGTTTCAGAAACTGAAGACACTGACGGAACCTGAA 240
AAAGAAATATGAAGACACAAAACGCGAAGTTTCAGAAACTGAAGACACTGACGGAACCTGAA 240
AAAGAAATATGAAGACACAAAACGCGAAGTTTCAGAAACTGAAGACACTGACGGAACCTGAA 240
AAAGAAATATGAAGACACAAAACGCGAAGTTTCAGAAACTGAAGACACTGACGGAACCTGAA 240
AAAGAAATATGAAGACACAAAACGCGAAGTTTCAGAAACTGAAGACACTGACGGAACCTGAA 240
AAAGAAATATGAAGACACAAAACGCGAAGTTTCAGAAACTGAAGACACTGACGGAACCTGAA 240

GATACCTGACGAAACTGAAGAACACAGAGATATGGAAGATGAATAAACGAAATTTGTGGAAGAT 300
GATACCTGACGAAACTGAAGAACACAGAGATATGGAAGATGAATAAACGAAATTTGTGGAAGAT 300
GATACCTGACGAAACTGAAGAACACAGAGATATGGAAGATGAATAAACGAAATTTGTGGAAGAT 300
GATACCTGACGAAACTGAAGAACACAGAGATATGGAAGATGAATAAACGAAATTTGTGGAAGAT 300
GATACCTGACGAAACTGAAGAACACAGAGATATGGAAGATGAATAAACGAAATTTGTGGAAGAT 300
GATACCTGACGAAACTGAAGAACACAGAGATATGGAAGATGAATAAACGAAATTTGTGGAAGAT 300
GATACCTGACGAAACTGAAGAACACAGAGATATGGAAGATGAATAAACGAAATTTGTGGAAGAT 300
GATACCTGACGAAACTGAAGAACACAGAGATATGGAAGATGAATAAACGAAATTTGTGGAAGAT 300
GATACCTGACGAAACTGAAGAACACAGAGATATGGAAGATGAATAAACGAAATTTGTGGAAGAT 300
GATACCTGACGAAACTGAAGAACACAGAGATATGGAAGATGAATAAACGAAATTTGTGGAAGAT 300
GATACCTGACGAAACTGAAGAACACAGAGATATGGAAGATGAATAAACGAAATTTGTGGAAGAT 300

MSP3.7C D2
MSP3.7C D5
MSP3.7C additional

MSP3.7C 3D7
MSP3.7C B1
MSP3.7C B2
MSP3.7C B3
MSP3.7C B4
MSP3.7C B5
MSP3.7C D1
MSP3.7C D2
MSP3.7C D5
MSP3.7C additional

MSP3.7C 3D7
MSP3.7C B1
MSP3.7C B2
MSP3.7C B3
MSP3.7C B4
MSP3.7C B5
MSP3.7C D1
MSP3.7C D2
MSP3.7C D5
MSP3.7C additional

MSP3.7C 3D7
MSP3.7C B1
MSP3.7C B2
MSP3.7C B3
MSP3.7C B4
MSP3.7C B5
MSP3.7C D1
MSP3.7C D2
MSP3.7C D5

MSP3.7C	additional	CATACTGCGAAACTGAAGAAACAGAGATATGGAAGATGAAACCGAATTTGTGGAAGAT 300 ***** CAAATTACAAGAAAANTGAAGATGATGAGGATAATGTAAATTTAGAGATATTAATAAAAAAT 360 CAAATTACAAGAAAANTGAAGATGATGAGGATAATGTAAATTTAGAGATATTAATAAAAAAT 360 CAAATTACAAGAAAANTGAAGATGATGAGGATAATGTAAATTTAGAGATATTAATAAAAAAT 360 CAAATTACAAGAAAANTGAAGATGATGAGGATAATGTAAATTTAGAGATATTAATAAAAAAT 360 CAAATTACAAGAAAANTGAAGATGATGAGGATAATGTAAATTTAGAGATATTAATAAAAAAT 360 CAAATTACAAGAAAANTGAAGATGATGAGGATAATGTAAATTTAGAGATATTAATAAAAAAT 360 CAAATTACAAGAAAANTGAAGATGATGAGGATAATGTAAATTTAGAGATATTAATAAAAAAT 360 CAAATTACAAGAAAANTGAAGATGATGAGGATAATGTAAATTTAGAGATATTAATAAAAAAT 360 CAAATTACAAGAAAANTGAAGATGATGAGGATAATGTAAATTTAGAGATATTAATAAAAAAT 360 CAAATTACAAGAAAANTGAAGATGATGAGGATAATGTAAATTTAGAGATATTAATAAAAAAT 360 *****
MSP3.7C	3D7	
MSP3.7C	B1	
MSP3.7C	B2	
MSP3.7C	B3	
MSP3.7C	B4	
MSP3.7C	B5	
MSP3.7C	D1	
MSP3.7C	D2	
MSP3.7C	D5	
MSP3.7C	additional	
MSP3.7C	3D7	
MSP3.7C	B1	
MSP3.7C	B2	
MSP3.7C	B3	
MSP3.7C	B4	
MSP3.7C	B5	
MSP3.7C	D1	
MSP3.7C	D2	
MSP3.7C	D5	
MSP3.7C	additional	
MSP3.7C	3D7	
MSP3.7C	B1	
MSP3.7C	B2	
MSP3.7C	B3	
MSP3.7C	B4	
MSP3.7C	B5	
MSP3.7C	D1	
MSP3.7C	D2	
MSP3.7C	D5	

MSP3.7C	additional	CAGAAATTAATTCTTAATGAATATAAAAAAAGTGAAGAAAAAATCATTTAGAAGATCAT 480 *****
MSP3.7C	3D7	GTAATCTATTATTTAATTTTTTACAAACAAATAACCAACTAGATCCTTCACTAAAAGAT 540
MSP3.7C	B1	GTAATCTATTATTTAATTTTTTACAAACAAATAACCAACTAGATCCTTCACTAAAAGAT 540
MSP3.7C	B2	GTAATCTATTATTTAATTTTTTACAAACAAATAACCAACTAGATCCTTCACTAAAAGAT 540
MSP3.7C	B3	GTAATCTATTATTTAATTTTTTACAAACAAATAACCAACTAGATCCTTCACTAAAAGAT 540
MSP3.7C	B4	GTAATCTATTATTTAATTTTTTACAAACAAATAACCAACTAGATCCTTCACTAAAAGAT 540
MSP3.7C	B5	GTAATCTATTATTTAATTTTTTACAAACAAATAACCAACTAGATCCTTCACTAAAAGAT 540
MSP3.7C	D1	GTAATCTATTATTTAATTTTTTACAAACAAATAACCAACTAGATCCTTCACTAAAAGAT 540
MSP3.7C	D2	GTAATCTATTATTTAATTTTTTACAAACAAATAACCAACTAGATCCTTCACTAAAAGAT 540
MSP3.7C	D5	GTAATCTATTATTTAATTTTTTACAAACAAATAACCAACTAGATCCTTCACTAAAAGAT 540
MSP3.7C	additional	*****

MSP3.7C	3D7	TTAGAAAATGAGTTAACTTTTTTTTAAATAACTATTGA 579
MSP3.7C	B1	TTAGAAAATGAGTTAACTTTTTTTTAAATAACTATTGA 579
MSP3.7C	B2	TTAGAAAATGAGTTAACTTTTTTTTAAATAACTATTGA 579
MSP3.7C	B3	TTAGAAAATGAGTTAACTTTTTTTTAAATAACTATTGA 579
MSP3.7C	B4	TTAGAAAATGAGTTAACTTTTTTTTAAATAACTATTGA 579
MSP3.7C	B5	TTAGAAAATGAGTTAACTTTTTTTTAAATAACTATTGA 579
MSP3.7C	D1	TTAGAAAATGAGTTAACTTTTTTTTAAATAACTATTGA 579
MSP3.7C	D2	TTAGAAAATGAGTTAACTTTTTTTTAAATAACTATTGA 579
MSP3.7C	D5	TTAGAAAATGAGTTAACTTTTTTTTAAATAACTATTGA 579
MSP3.7C	additional	*****

ClustalW 比对 ORF7C 核苷酸序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) MSP3-8.

CLUSTAL W (1.82) 多重序列比对, 除MSP3.8C以外

图9S

MSP3.8C	3D7	CATGAAAGTAATGTTGGTAGCATCCAAGAAGTAAACCAAGGTAGCGTAGCGAAGAATCA	60
MSP3.8C	B1	CATGAAAGTAATGTTGGTAGCATCCAAGAAGTAAACCAAGGTAGCGTAGCGAAGAATCA	60
MSP3.8C	B4	CATGAAAGTAATGTTGGTAGCATCCAAGAAGTAAACCAAGGTAGCGTAGCGAAGAATCA	60
MSP3.8C	B5	CATGAAAGTAATGTTGGTAGCATCCAAGAAGTAAACCAAGGTAGCGTAGCGAAGAATCA	60
MSP3.8C	D1	CATGAAAGTAATGTTGGTAGCATCCAAGAAGTAAACCAAGGTAGCGTAGCGAAGAATCA	60
MSP3.8C	D2	CATGAAAGTAATGTTGGTAGCATCCAAGAAGTAAACCAAGGTAGCGTAGCGAAGAATCA	60
MSP3.8C	D4	CATGAAAGTAATGTTGGTAGCATCCAAGAAGTAAACCAAGGTAGCGTAGCGAAGAATCA	60

MSP3.8C	3D7	CATTCTAAAACTATAGATCCTTCTTAGATTGACGACCGTTTGGAAATTAAGTAGTGGGTCA	120
MSP3.8C	B1	CATTCTAAAACTATAGATCCTTCTTAGATTGACGACCGTTTGGAAATTAAGTAGTGGGTCA	120
MSP3.8C	B4	CATTCTAAAACTATAGATCCTTCTTAGATTGACGACCGTTTGGAAATTAAGTAGTGGGTCA	120
MSP3.8C	B5	CATTCTAAAACTATAGATCCTTCTTAGATTGACGACCGTTTGGAAATTAAGTAGTGGGTCA	120
MSP3.8C	D1	CATTCTAAAACTATAGATCCTTCTTAGATTGACGACCGTTTGGAAATTAAGTAGTGGGTCA	120
MSP3.8C	D2	CATTCTAAAACTATAGATCCTTCTTAGATTGACGACCGTTTGGAAATTAAGTAGTGGGTCA	120
MSP3.8C	D4	CATTCTAAAACTATAGATCCTTCTTAGATTGACGACCGTTTGGAAATTAAGTAGTGGGTCA	120

MSP3.8C	3D7	TCATCTCTTGAACAACACTCTAAGGAAGATGTAAAAAGGGATGTGCTTTAGAAATTGGTA	180
MSP3.8C	B1	TCATCTCTTGAACAACACTCTAAGGAAGATGTAAAAAGGGATGTGCTTTAGAAATTGGTA	180
MSP3.8C	B4	TCATCTCTTGAACAACACTCTAAGGAAGATGTAAAAAGGGATGTGCTTTAGAAATTGGTA	180
MSP3.8C	B5	TCATCTCTTGAACAACACTCTAAGGAAGATGTAAAAAGGGATGTGCTTTAGAAATTGGTA	180
MSP3.8C	D1	TCATCTCTTGAACAACACTCTAAGGAAGATGTAAAAAGGGATGTGCTTTAGAAATTGGTA	180
MSP3.8C	D2	TCATCTCTTGAACAACACTCTAAGGAAGATGTAAAAAGGGATGTGCTTTAGAAATTGGTA	180
MSP3.8C	D4	TCATCTCTTGAACAACACTCTAAGGAAGATGTAAAAAGGGATGTGCTTTAGAAATTGGTA	180

MSP3.8C	3D7	CCTTTATCTTTATCGGATATTGAAACAGATAGCTAATGAAAGCGAAGATGTACTGGAAGAG	240
MSP3.8C	B1	CCTTTATCTTTATCGGATATTGAAACAGATAGCTAATGAAAGCGAAGATGTACTGGAAGAG	240
MSP3.8C	B4	CCTTTATCTTTATCGGATATTGAAACAGATAGCTAATGAAAGCGAAGATGTACTGGAAGAG	240
MSP3.8C	B5	CCTTTATCTTTATCGGATATTGAAACAGATAGCTAATGAAAGCGAAGATGTACTGGAAGAG	240
MSP3.8C	D1	CCTTTATCTTTATCGGATATTGAAACAGATAGCTAATGAAAGCGAAGATGTACTGGAAGAG	240
MSP3.8C	D2	CCTTTATCTTTATCGGATATTGAAACAGATAGCTAATGAAAGCGAAGATGTACTGGAAGAG	240
MSP3.8C	D4	CCTTTATCTTTATCGGATATTGAAACAGATAGCTAATGAAAGCGAAGATGTACTGGAAGAG	240

MSP3.8C	3D7	ATAGAAAGAAGAAATTAAATCAGATGGGAAATAGAAATATATATAACAGAAAGAAATAAAA	300

B1	ATAGAAGAGAAANTTAATACAGATGGGGAAATAGAATATATAACAGAAGAAATAAAAA	300
B4	ATAGAAGAGAAANTTAATACAGATGGGGAAATAGAATATATAACAGAAGAAATAAAAA	300
B5	ATAGAAGAGAAANTTAATACAGATGGGGAAATAGAATATATAACAGAAGAAATAAAAA	300
D1	ATAGAAGAGAAANTTAATACAGATGGGGAAATAGAATATATAACAGAAGAAATAAAAA	300
D2	ATAGAAGAGAAANTTAATACAGATGGGGAAATAGAATATATAACAGAAGAAATAAAAA	300
D4	ATAGAAGAGAAANTTAATACAGATGGGGAAATAGAATATATAACAGAAGAAATAAAAA	300

3D7	mSP3.8C	GAAGATATAGGAAGAAGAAACAGAAAGAGATATATAGAAAGAGAAAACAGAAAGAGAAACAGAA	360
B1	mSP3.8C	GAAGATATAGGAAGAAGAAATATAAAGAGATATATAGAAAGAGAAAACAGAAAGAGATATAGAA	360
B4	mSP3.8C	GAAGATATAGGAAGAAGAAACAGAAAGAGATATATAGAAAGAGAAAACAGAAAGAGAAACAGAA	360
B5	mSP3.8C	GAAGATATAGGAAGAGAGAAAATATAAAGAGATATATAGAAAGAGAAAACAGAAAGAGATATAGAA	360
D1	mSP3.8C	GAAGATATAGGAAGAGAGAAAACAGAAAGAGATATATAGAAAGAGAAAACAGAAAGAGAAACAGAA	360
D2	mSP3.8C	GAAGATATAGGAAGAGAGAAAACAGAAAGAGATATATAGAAAGAGAAAACAGAAAGAGAAACAGAA	360
D4	mSP3.8C	GAAGATATAGGAAGAAGAAAACAGAAAGAGATATATAGAAAGAGAAAACAGAAAGAGAAACAGAA	360

	3D7	MSp3.8C
B1	GAAGAAACAGAA	GAAGAAACAGAAAGCAGATGAAAGAAACAGTAAAGAAATAGAA 408
B4	GAAGAAACAGAA	GAAGAAACAGAAAGCAGATGAAAGAAACAGTAAAGAAATAGAA 420
B5	GAAGAAACAGAA	GAAGAAACAGAAAGCAGATGAAAGAAACAGTAAAGAAATAGAA 408
D1	GAAGAAACAGAA	GAAGAAACAGAAAGCAGATGAAAGAAACAGTAAAGAAATAGAA 420
D2	GAAGAAACAGAA	GAAGAAACAGAAAGCAGATGAAAGAAACAGTAAAGAAATAGAA 420
D4	GAAGAAACAGAA	GAAGAAACAG--TAAAGAAATAGAA 396
.	GAAGAAACAGAA	GAAGAAACAGTAAAGAAATAGAA 408

3D7	MSP3.8C	GACAAACGAGAAACAAGAAATTAAATAATAAATCGCTAGAGAGAAAAAA	CAAATAGATATAAAAAAT	468
B1	MSP3.8C	GACAAACGAGAAACAAGAAATTAAATAATAAATCGCTAGAGAGAAAAAA	CAAATAGATATAAAAAAT	480
B4	MSP3.8C	GACAAACGAGAAACAAGAAATTAAATAATAAATCGCTAGAGAGAAAAAA	CAAATAGATATAAAAAAT	468
B5	MSP3.8C	GACAAACGAGAAACAAGAAATTAAATAATAAATCGCTAGAGAGAAAAAA	CAAATAGATATAAAAAAT	480
D1	MSP3.8C	GACAAACGAGAAACAAGAAATTAAATAATAAATCGCTAGAGAGAAAAAA	CAAATAGATATAAAAAAT	480
D2	MSP3.8C	GACAAACGAGAAACAAGAAATTAAATAATAAATCGCTAGAGAGAAAAAA	CAAATAGATATAAAAAAT	456
D4	MSP3.8C	GACAAACGAGAAACAAGAAATTAAATAATAAATCGCTAGAGAGAAAAAA	CAAATAGATATAAAAAAT	468

MSP3.8C 3D7 ACAGATACCAAGTGAAGAAAGGATTAAATAATTGAGAAATAAGATGAAATAAGCTCGAAAT 528

9U

MSP3.8C	B1	ACAGATACCAGTGAAAGAAAGGATTTAATAATTTCAGAAAAAGATGAAAAAGCTCGAAAT	540
MSP3.8C	B4	ACAGATACCAGTGAAAGAAAGGATTTAATAATTTCAGAAAAAGATGAAAAAGCTCGAAAT	528
MSP3.8C	B5	ACAGATACCAGTGAAAGAAAGGATTTAATAATTTCAGAAAAAGATGAAAAAGCTCGAAAT	540
MSP3.8C	D1	ACAGATACCAGTGAAAGAAAGGATTTAATAATTTCAGAAAAAGATGAAAAAGCTCGAAAT	540
MSP3.8C	D2	ACAGATACCAGTGAAAGAAAGGATTTAATAATTTCAGAAAAAGATGAAAAAGCTCGAAAT	516
MSP3.8C	D4	ACAGATACCAGTGAAAGAAAGGATTTAATAATTTCAGAAAAAGATGAAAAAGCTCGAAAT	528

MSP3.8C	3D7	TTAATTCTAAAAATTATAAAATTATAATGAACCTAGATAAAAACGTTTCATACCTTTAGTA	588
MSP3.8C	B1	TTAATTCTAAAAATTATAAAATTATAATGAACCTAGATAAAAACGTTTCATACCTTTAGTA	600
MSP3.8C	B4	TTAATTCTAAAAATTATAAAATTATAATGAACCTAGATAAAAACGTTTCATACCTTTAGTA	588
MSP3.8C	B5	TTAATTCTAAAAATTATAAAATTATAATGAACCTAGATAAAAACGTTTCATACCTTTAGTA	600
MSP3.8C	D1	TTAATTCTAAAAATTATAAAATTATAATGAACCTAGATAAAAACGTTTCATACCTTTAGTA	600
MSP3.8C	D2	TTAATTCTAAAAATTATAAAATTATAATGAACCTAGATAAAAACGTTTCATACCTTTAGTA	576
MSP3.8C	D4	TTAATTCTAAAAATTATAAAATTATAATGAACCTAGATAAAAACGTTTCATACCTTTAGTA	588
		**** *****	
MSP3.8C	3D7	AATTCAATTATTAGTTTATTAGAAGAAGGTAATGGAAGTGATTTCTACCTTGAATAGTTTA	648
MSP3.8C	B1	AATTCAATTATTAGTTTATTAGAAGAAGGTAATGGAAGTGATTTCTACCTTGAATAGTTTA	660
MSP3.8C	B4	AATTCAATTATTAGTTTATTAGAAGAAGGTAATGGAAGTGATTTCTACCTTGAATAGTTTA	648
MSP3.8C	B5	AATTCAATTATTAGTTTATTAGAAGAAGGTAATGGAAGTGATTTCTACCTTGAATAGTTTA	660
MSP3.8C	D1	AATTCAATTATTAGTTTATTAGAAGAAGGTAATGGAAGTGATTTCTACCTTGAATAGTTTA	660
MSP3.8C	D2	AATTCAATTATTAGTTTATTAGAAGAAGGTAATGGAAGTGATTTCTACCTTGAATAGTTTA	636
MSP3.8C	D4	AATTCAATTATTAGTTTATTAGAAGAAGGTAATGGAAGTGATTTCTACCTTGAATAGTTTA	648

MSP3.8C	3D7	TCAAAAAGATATTACAAATTTATTAAAAATTAA	681
MSP3.8C	B1	TCAAAAAGATATTACAAATTTATTAAAAATTAA	693
MSP3.8C	B4	TCAAAAAGATATTACAAATTTATTAAAAATTAA	681
MSP3.8C	B5	TCAAAAAGATATTACAAATTTATTAAAAATTAA	693
MSP3.8C	D1	TCAAAAAGATATTACAAATTTATTAAAAATTAA	693
MSP3.8C	D2	TCAAAAAGATATTACAAATTTATTAAAAATTAA	669
MSP3.8C	D4	TCAAAAAGATATTACAAATTTATTAAAAATTAA	681



MSP3-1

CLUSTAL W (1.82) 多重 ClustalW 比对

氨基酸序列比对 - V:\www.ebl.ac.uk/clustalw/

CLUSTAL W (1.82) 多重序列比对

```

MSP3.1C 3D7      YEKAKNAYQKANOAVLKAKESASYDYLGMFQGGVPEHKKEENMLSHLYVSSKOKENIS 60
MSP3.1C B2      YEKAKNAYQKANOAVLKAKESASYDYLGMFQGGVPEHKKEENMLSHLYVSSKOKENIS 60
MSP3.1C B3      YEKAKNAYQKANOAVLKAKESASYDYLGMFQGGVPEHKKEENMLSHLYVSSKOKENIS 60
MSP3.1C B4      YEKAKNAYQKANOAVLKAKESASYDYLGMFQGGVPEHKKEENMLSHLYVSSKOKENIS 60
MSP3.1C B5      YEKAKNAYQKANOAVLKAKESASYDYLGMFQGGVPEHKKEENMLSHLYVSSKOKENIS 60
MSP3.1C D2      YEKAKNAYQKANOAVLKAKESASYDYLGMFQGGVPEHKKEENMLSHLYVSSKOKENIS 60
MSP3.1C D3      YEKAKNAYQKANOAVLKAKESASYDYLGMFQGGVPEHKKEENMLSHLYVSSKOKENIS 60
MSP3.1C D4      YEKAKNAYQKANOAVLKAKESASYDYLGMFQGGVPEHKKEENMLSHLYVSSKOKENIS 60
MSP3.1C D5      YEKAKNAYQKANOAVLKAKESASYDYLGMFQGGVPEHKKEENMLSHLYVSSKOKENIS 60
*****

MSP3.1C 3D7      KENDDVLDKEKEAETTESELEKKEEETSEISSEDESEEH-EESEKEEENDKKQOK 119
MSP3.1C B2      KENDDVLDKEKEAETTESELEKKEEETSEISSEDESEEH---SEKERE---KQOK 113
MSP3.1C B3      KENDDVLDKEKEAETTESELEKKEEETSEISSEDESEEH---SEKERE---KQOK 113
MSP3.1C B4      KENDDVLDKEKEAETTESELEKKEEETSEISSEDESEEH---SEKERE---KQOK 113
MSP3.1C B5      KENDDVLDKEKEAETTESELEKKEEETSEISSEDESEEH---SEKERE---KQOK 113
MSP3.1C D2      KENDDVLDKEKEAETTESELEKKEEETSEISSEDESEEH-EKE-KKEENDKKQOK 118
MSP3.1C D3      KENDDVLDKEKEAETTESELEKKEEETSEISSEDESEEH-ESESEKEENDKKQOK 119
MSP3.1C D4      KENDDVLDKEKEAETTESELEKKEEETSEISSEDESEEH-ESESEKEENDKKQOK 120
MSP3.1C D5      KENDDVLDKEKEAETTESELEKKEEETSEISSEDESEEH-ESESEKEENDKKQOK 120
*****

MSP3.1C 3D7      EQSWENNDQKDWEAQNLIISKQNNNEKNVKEAAESIIMKTLAGLIKNNQIDSTLADLVE 179
MSP3.1C B2      EQSWENNDQKDWEAQNLIISKQNNNEKNVKEAAESIIMKTLAGLIKNNQIDSTLADLVE 173
MSP3.1C B3      EQSWENNDQKDWEAQNLIISKQNNNEKNVKEAAESIIMKTLAGLIKNNQIDSTLADLVE 173
MSP3.1C B4      EQSWENNDQKDWEAQNLIISKQNNNEKNVKEAAESIIMKTLAGLIKNNQIDSTLADLVE 173
MSP3.1C B5      EQSWENNDQKDWEAQNLIISKQNNNEKNVKEAAESIIMKTLAGLIKNNQIDSTLADLVE 178
MSP3.1C D2      EQSWENNDQKDWEAQNLIISKQNNNEKNVKEAAESIIMKTLAGLIKNNQIDSTLADLVE 179
MSP3.1C D3      EQSWENNDQKDWEAQNLIISKQNNNEKNVKEAAESIIMKTLAGLIKNNQIDSTLADLVE 179
MSP3.1C D4      EQSWENNDQKDWEAQNLIISKQNNNEKNVKEAAESIIMKTLAGLIKNNQIDSTLADLVE 180
MSP3.1C D5      EQSWENNDQKDWEAQNLIISKQNNNEKNVKEAAESIIMKTLAGLIKNNQIDSTLADLVE 180
***.*****

MSP3.1C 3D7      ELSKYFKNH 188
MSP3.1C B2      ELSKYFKNH 182
MSP3.1C B3      ELSKYFKNH 182
MSP3.1C B4      ELSKYFKNH 182
MSP3.1C B5      ELSKYFKNH 182
MSP3.1C D2      ELSKYFKNH 187
MSP3.1C D3      ELSKYFKNH 188
MSP3.1C D4      ELSKYFKNH 189
MSP3.1C D5      ELSKYFKNH 189

```

图 10A


```

MSP3.2FL 3D7      LFNEKNEIDSTINNLVQEMIHLSNN 371
MSP3.2FL B1       LFNEKNEIDSTINNLVQEMIHLSNN 371
MSP3.2FL B3       LFNEKNEIDSTINNLVQEMIHLSNN 371
MSP3.2FL B4       LFNEKNEIDSTINNLVQEMIHLSNN 371
MSP3.2FL B5       LFNEKNEIDSTINNLVQEMIHLSNN 371
MSP3.2FL D1       LFNEKNEIDSTINNLVQEMIHLSNN 371
MSP3.2FL D2       LFNEKNEIDSTINNLVQEMIHLSNN 371
MSP3.2FL D3       LFNEKNEIDSTINNLVQEMIHLSNN 371
MSP3.2FL D4       LFNEKNGIDSTINNLVQEMIHLSNN 376
MSP3.2FL D5       LFNEKNEIDSTINNLVQEMIHLSNN 371
*****

```

ClustalW 比对氨基酸序列 ORF2C (<http://chla.ac.uk/clusterw/>) MSP3-3

CLUSTAL W (1.82) 多重序列比对

```

MSP3.3C 3D7      YEKKNENKNSVNSDKTSNEKGRPPPTSPILDDGIEFSGGLYFNEKKSTEENKQKNVLE 60
MSP3.3C B1       YEKKNKKNNSVNSDKTSNEKGRPPPTSPILDDGIEFSGGLYFNEKKSTEENKQKNVLE 60
MSP3.3C B2       YEKKNENKNSVNSDKTSNEKGRPPPTSPILDDGIEFSGGLYFNEKKSTEENKQKNVLE 60
MSP3.3C B5       YEKKNENKNSVNSDKTSNEKGRPPPTSPILDDGIEFSGGLYFNEKKSTEENKQKNVLE 60
MSP3.3C D1       YEKKNENKNSVNSDKTSNEKGRPPPTSPILDDGIEFSGGLYFNEKKSTEENKQKNVLE 60
MSP3.3C D2       YEKKNENKNSVNSDKTSNEKGRPPPTSPILDDGIEFSGGLYFNEKKSTEENKQKNVLE 60
MSP3.3C D4       YEKKNENKNSVNSDKTSNEKGRPPPTSPILDDGIEFSGGLYFNEKKSTEENKQKNVLE 60
MSP3.3C D5       YEKKNENKNSVNSDKTSNEKGRPPPTSPILDDGIEFSGGLYFNEKKSTEENKQKNVLE 60
*****

```

```

MSP3.3C 3D7      SVNLTSDWKEDIVKENEDVKDEKDEDEDEEEKYENEIIKQPEDILDEEEVLEEEILEEN 120
MSP3.3C B1       SVNLTSDWKEDIVKENEDVKDEKDEDEDEEEKYENEIIKQPEDILDEEEVLEEEILEEN 120
MSP3.3C B2       SVNLTSDWKEDIVKENEDVKDEKDEDEDEEEKYENEIIKQPEDILDEEEVLEEEILEEN 120
MSP3.3C B5       SVNLTSDWKEDIVKENEDVKDEKDEDEDEEEKYENEIIKQPEDILDEEEVLEEEILEEN 120
MSP3.3C D1       SVNLTSDWKEDIVKENEDVKDEKDEDEDEEEKYENEIIKQPEDILDEEEVLEEEILEEN 120
MSP3.3C D2       SVNLTSDWKEDIVKENEDVKDEKDEDEDEEEKYENEIIKQPEDILDEEEVLEEEILEEN 120
MSP3.3C D4       SVNLTSDWKEDIVKENEDVKDEKDEDEDEEEKYENEIIKQPEDILDEEEVLEEEILEEN 120
MSP3.3C D5       SVNLTSDWKEDIVKENEDVKDEKDEDEDEEEKYENEIIKQPEDILDEEEVLEEEILEEN 120
*****

```

Figure 10D displays a multiple sequence alignment of MSP3.3C variants (3D7, B1, B2, B5, D1, D2, D4, D5) using ClustalW. The alignment shows high conservation across all variants, with identical sequences for most positions. The alignment is presented in a standard ClustalW format with sequence identifiers on the left and positions on the right.

MSP3.7C	D2	PEGPRANRNNONTDPYNHYFAMEIGGAPTYKPENNRKNDNILLEHVKITSWDKEDII	60
MSP3.7C	D5	PEGPRANRNNONTDPYNHYFAMEIGGAPTYKPENNRKNDNILLEHVKITSWDKEDII	60
MSP3.7C	additional	PEGPRANRNNONTDPYNHYFAMEIGGAPTYKPENNRKNDNILLEHVKITSWDKEDII	60

MSP3.7C	3D7	KENEDTKREVQETEDTETEDTETEDMEDENEIVEDQLOQENEDDEDNVNLEDINKN	120
MSP3.7C	B1	KENEDTKREVQETEDTETEDTETEDMEDENEIVEDQLOQENEDDEDNVNLEDINKN	120
MSP3.7C	B2	KENEDTKREVQETEDTETEDTETEDMEDENEIVEDQLOQENEDDEDNVNLEDINKN	120
MSP3.7C	B3	KENEDTKREVQETEDTETEDTETEDMEDENEIVEDQLOQENEDDEDNVNLEDINKN	120
MSP3.7C	B4	KENEDTKREVQETEDTETEDTETEDMEDENEIVEDQLOQENEDDEDNVNLEDINKN	120
MSP3.7C	B5	KENEDTKREVQETEDTETEDTETEDMEDENEIVEDQLOQENEDDEDNVNLEDINKN	120
MSP3.7C	D1	KENEDTKREVQETEDTETEDTETEDMEDENEIVEDQLOQENEDDEDNVNLEDINKN	120
MSP3.7C	D2	KENEDTKREVQETEDTETEDTETEDMEDENEIVEDQLOQENEDDEDNVNLEDINKN	120
MSP3.7C	D5	KENEDTKREVQETEDTETEDTETEDMEDENEIVEDQLOQENEDDEDNVNLEDINKN	120
MSP3.7C	additional	KENEDTKREVQETEDTETEDTETEDMEDENEIVEDQLOQENEDDEDNVNLEDINKN	120

MSP3.7C	3D7	TRNDIFEEQIKLDSTQDDKAQKLI SNEYKKEEKKSL EDHVNLLFNFLQTNNQLDPSLKO	180
MSP3.7C	B1	TRNDIFEEQIKLDSTQDDKAQKLI SNEYKKEEKKSL EDHVNLLFNFLQTNNQLDPSLKO	180
MSP3.7C	B2	TRNDIFEEQIKLDSTQDDKAQKLI SNEYKKEEKKSL EDHVNLLFNFLQTNNQLDPSLKO	180
MSP3.7C	B3	TRNDIFEEQIKLDSTQDDKAQKLI SNEYKKEEKKSL EDHVNLLFNFLQTNNQLDPSLKO	180
MSP3.7C	B4	TRNDIFEEQIKLDSTQDDKAQKLI SNEYKKEEKKSL EDHVNLLFNFLQTNNQLDPSLKO	180
MSP3.7C	B5	TRNDIFEEQIKLDSTQDDKAQKLI SNEYKKEEKKSL EDHVNLLFNFLQTNNQLDPSLKO	180
MSP3.7C	D1	TRNDIFEEQIKLDSTQDDKAQKLI SNEYKKEEKKSL EDHVNLLFNFLQTNNQLDPSLKO	180
MSP3.7C	D2	TRNDIFEEQIKLDSTQDDKAQKLI SNEYKKEEKKSL EDHVNLLFNFLQTNNQLDPSLKO	180
MSP3.7C	D5	TRNDIFEEQIKLDSTQDDKAQKLI SNEYKKEEKKSL EDHVNLLFNFLQTNNQLDPSLKO	180
MSP3.7C	additional	TRNDIFEEQIKLDSTQDDKAQKLI SNEYKKEEKKSL EDHVNLLFNFLQTNNQLDPSLKO	180

MSP3.7C	3D7	LENELTFFFLNNY	192
MSP3.7C	B1	LENELTFFFLNNY	192
MSP3.7C	B2	LENELTFFFLNNY	192
MSP3.7C	B3	LENELTFFFLNNY	192
MSP3.7C	B4	LENELTFFFLNNY	192
MSP3.7C	B5	LENELTFFFLNNY	192
MSP3.7C	D1	LENELTFFFLNNY	192
MSP3.7C	D2	LENELTFFFLNNY	192
MSP3.7C	D5	LENELTFFFLNNY	192

MSP3.7C additional LENELTFFLNRY 192

图10H

ClustalW 比对氨基酸序列 **ORF7C** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncbi/ncbi/>) MSP3-8

CLUSTAL W (1.82) 多重序列比对, 除MSP3. 8C以外

B2

```

MSP3.8C      3D7      HESNVGSIQEVNQGVSEESHKTI DP SKIDDRLELSGGSSSLRQHSKEDVKKGCALELV 60
MSP3.8C      B1       HESNVGSIQEVNQGVSEESHKTI DP SKIDDRLELSGGSSSLRQHSKEDVKKGSALELV 60
MSP3.8C      B4       HESNVGSIQEVNQGVSEESHKTI DP SKIDDRLELSGGSSSLRQHSKEDVKKGSALELV 60
MSP3.8C      B5       HESNVGSIQEVNQGVSEESHKTI DP SKIDDRLELSGGSSSLRQHSKEDVKKGSALELV 60
MSP3.8C      D1       HESNVGSIQEVNQGVSEESHKTI DP SKIDDRLELSGGSSSLRQHSKEDVKKGSALELV 60
MSP3.8C      D2       HESNVGSIQEVNQGVSEESHKTI DP SKIDDRLELSGGSSSLRQHSKEDVKKGSALELV 60
MSP3.8C      D4       HESNVGSIQEVNQGVSEESHKTI DP SKIDDRLELSGGSSSLRQHSKEDVKKGSALELV 60
*****

```

```

MSP3.8C      3D7      PLSLSDIEQIANESDVLSEIEEINTDGEIEYITSEIKEDIEEETERDIEEETERETE 120
MSP3.8C      B1       PLSLSDIEQIANESDVLSEIEEINTDGEIEYITSEIKEDIEEETERDIEEETERDIE 120
MSP3.8C      B4       PLSLSDIEQIANESDVLSEIEEINTDGEIEYITSEIKEDIEEETERDIEEETERETE 120
MSP3.8C      B5       PLSLSDIEQIANESDVLSEIEEINTDGEIEYITSEIKEDIEEETERDIEEETERDIE 120
MSP3.8C      D1       PLSLSDIEQIANESDVLSEIEEINTDGEIEYITSEIKEDIEEETERDIEEETERETE 120
MSP3.8C      D2       PLSLSDIEQIANESDVLSEIEEINTDGEIEYITSEIKEDIEEETERDIEEETERETE 120
MSP3.8C      D4       PLSLSDIEQIANESDVLSEIEEINTDGEIEYITSEIKEDIEEETERDIEEETERETE 120
*****

```

```

MSP3.8C      3D7      EETEEAD---EETVKGIEDKPEQEIKNKSLEEKQIDKNVDTSEKKGFNNSKDEKARN 176
MSP3.8C      B1       EETEEETEEADRETVKGIEDKPEQEIKNKSLEEKQIDKNVDTSEKKGFNNSKDEKARN 180
MSP3.8C      B4       EETEEAD---EETVKGIEDKPEQEIKNKSLEEKQIDKNVDTSEKKGFNNSKDEKARN 176
MSP3.8C      B5       EETEEETEEADRETVKGIEDKPEQEIKNKSLEEKQIDKNVDTSEKKGFNNSKDEKARN 180
MSP3.8C      D1       EETEEETEEADRETVKGIEDKPEQEIKNKSLEEKQIDKNVDTSEKKGFNNSKDEKARN 180
MSP3.8C      D2       EETEEET---EETVKGIEDKPEQEIKNKSLEEKQIDKNVDTSEKKGFNNSKDEKARN 172
MSP3.8C      D4       EETEEAD---EETVKGIEDKPEQEIKNKSLEEKQIDKNVDTSEKKGFNNSKDEKARN 176
*****

```

```

MSP3.8C      3D7      LISKNYKNYNELDKNVHTLVNSIISLLEEGNGSDSTLNSLSKDIITNLFKN 226
MSP3.8C      B1       LISKNYKNYNELDKNVHTLVNSIISLLEEGNGSDSTLNSLSKDIITNLFKN 230
MSP3.8C      B4       LISKNYKNYNELDKNVHTLVNSIISLLEEGNGSDSTLNSLSKDIITNLFKN 226
MSP3.8C      B5       LISKNYKNYNELDKNVHTLVNSIISLLEEGNGSDSTLNSLSKDIITNLFKN 230
MSP3.8C      D1       LISKNYKNYNELDKNVHTLVNSIISLLEEGNGSDSTLNSLSKDIITNLFKN 230
MSP3.8C      D2       LISKNYKNYNELDKNVHTLVNSIISLLEEGNGSDSTLNSLSKDIITNLFKN 222
MSP3.8C      D4       LTSKNYKNYNELDKNVHTLVNSIISLLEEGNGSDSTLNSLSKDIITNLFKN 226

```

图101

MSP3.1 V8 MSP3.2:

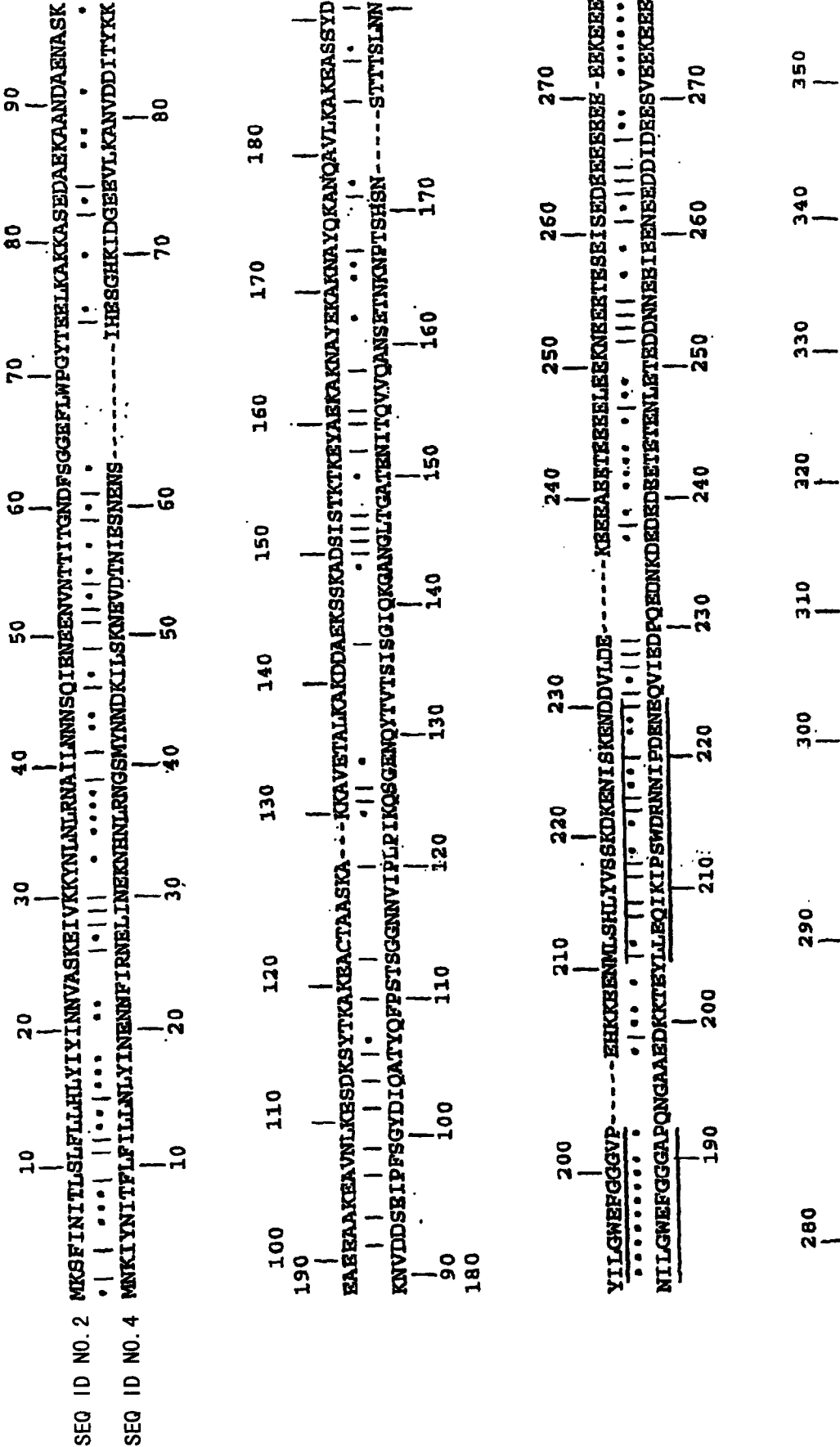


图 11A

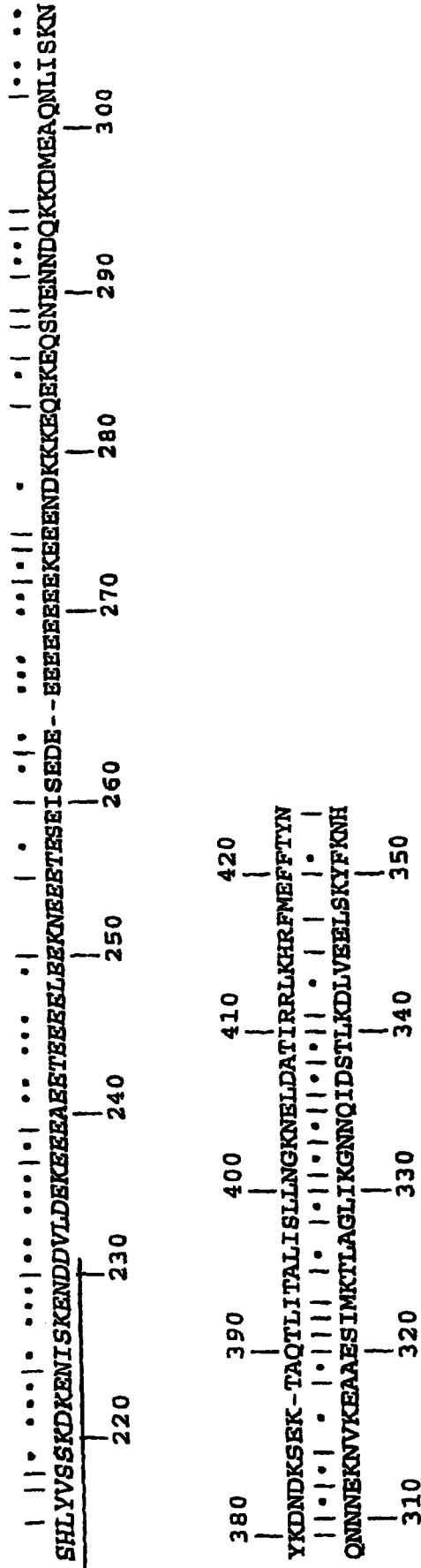


图11D

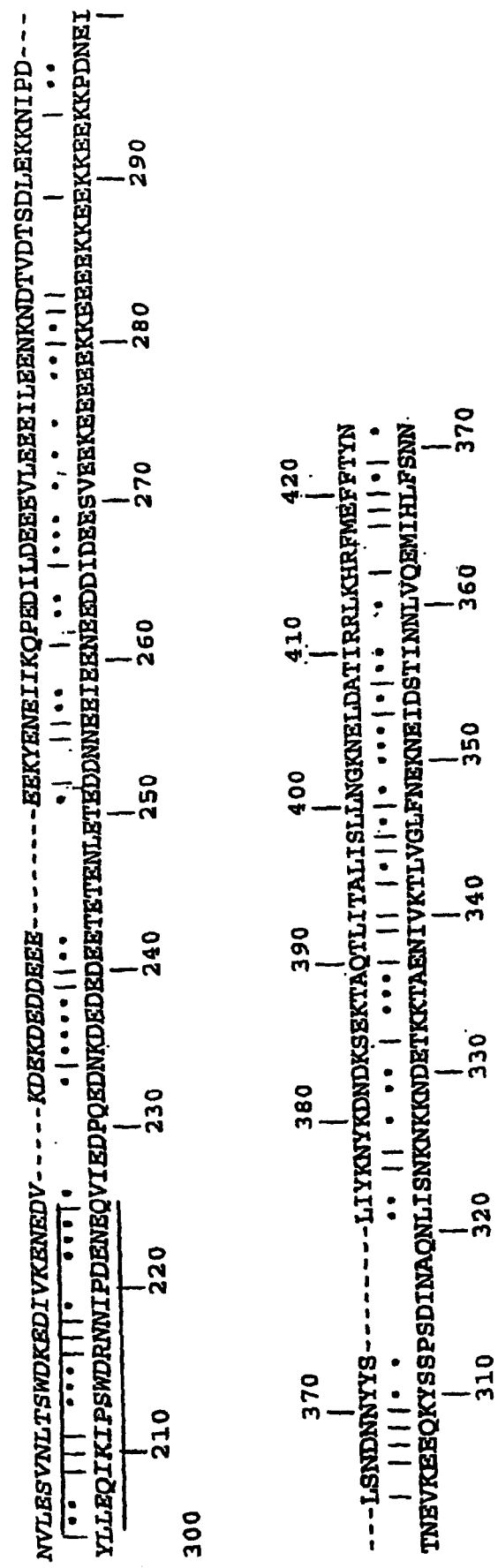


图11F

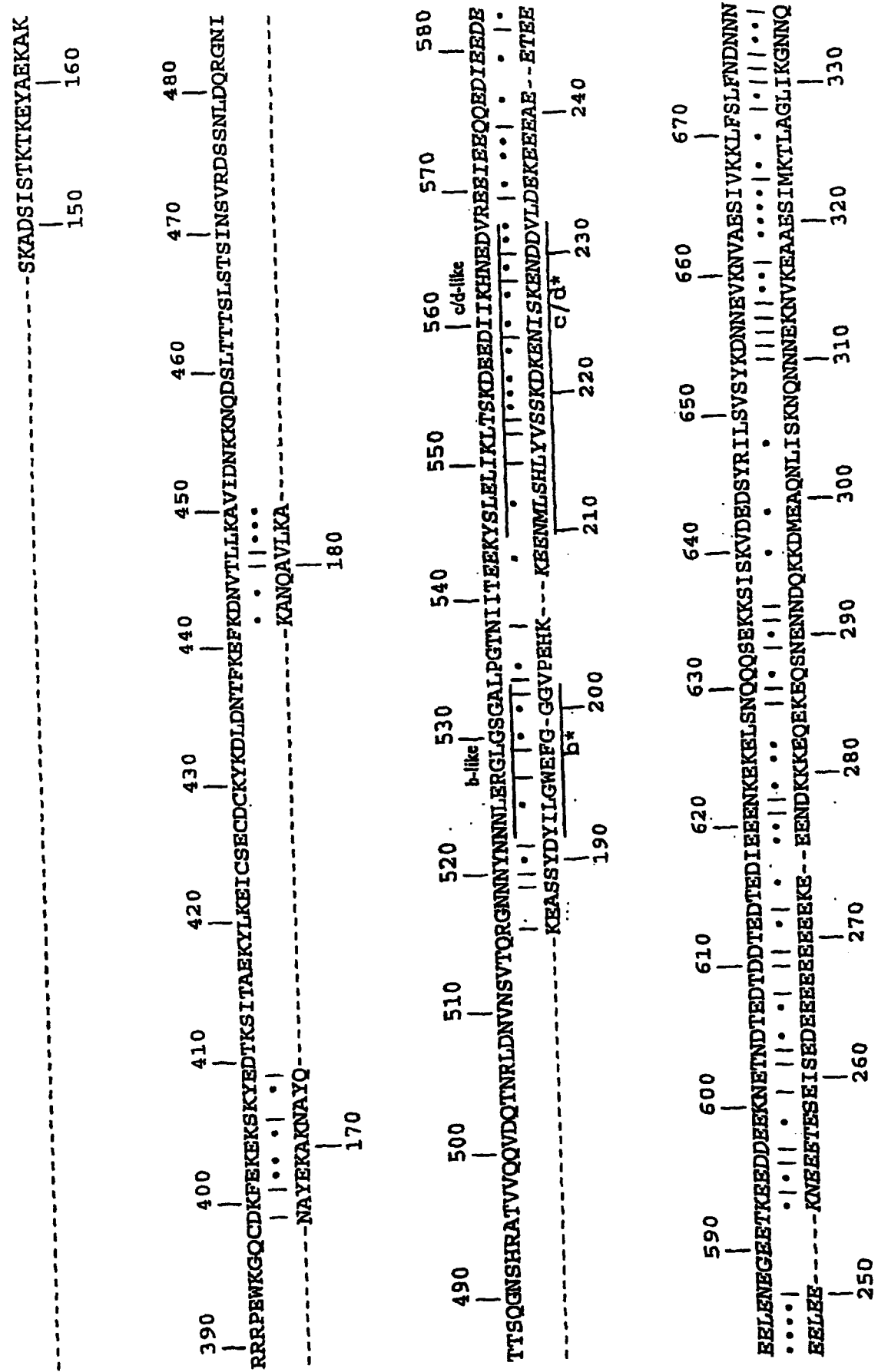


图11H

680 690


```
-----VSYKD--NNEVKNVAESIVKKLPSLFNDNNLETIPKGLTEDMTDLF-QK
|. . |. . |. . |. . |. . |. . |. . |. . |. . |. . |||
NAQNLI SNKNKKND ETKCTAENIVKT LVGLFN EKNEIDSTINN LVOEMIHLFSNN
```

圖 11L

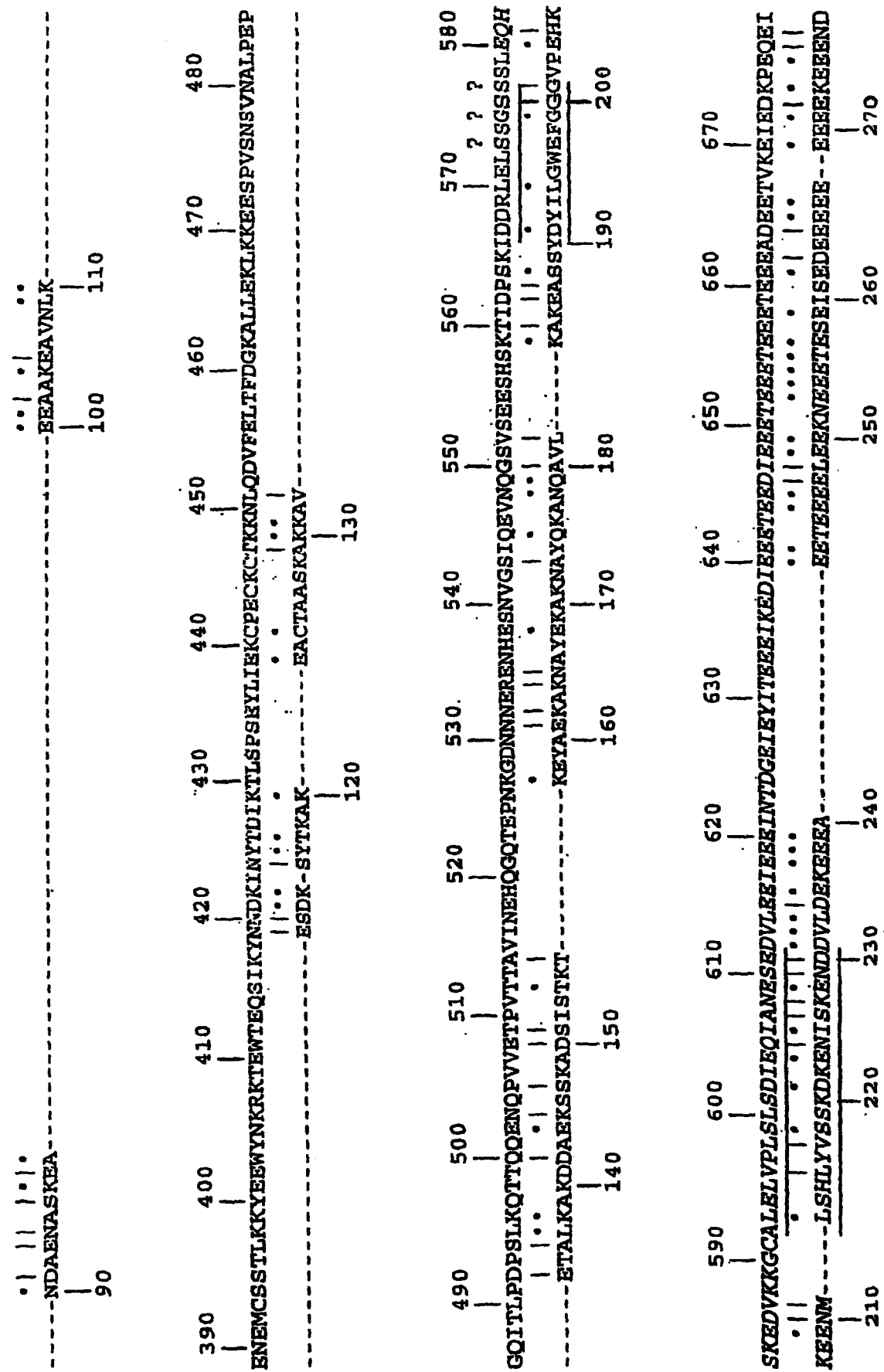


图 11R

680	690	700	710	720	730	740	750	760
KNKSLEEKQIDKNTOTSEKGFNSEKDEKARNLISKVYKNYN-ELDKNVHTLVNSIISLLEECSGSDSTLNSLSKDIITNLFKN-								
..	..	..	..	..	..	..	..	..
..	..	..	..	..	..	..	..	..
KKK---EQEKEQSNENNNDQK-----KDEMAQNLSKQNNNEKNVKEAESSIMKTLAGLIKNNQIDSTLKOLVEELSKEYFKNH								
280	290	300	310	320	330	340	350	

115

MSP3.6 Vs MSP3.2:

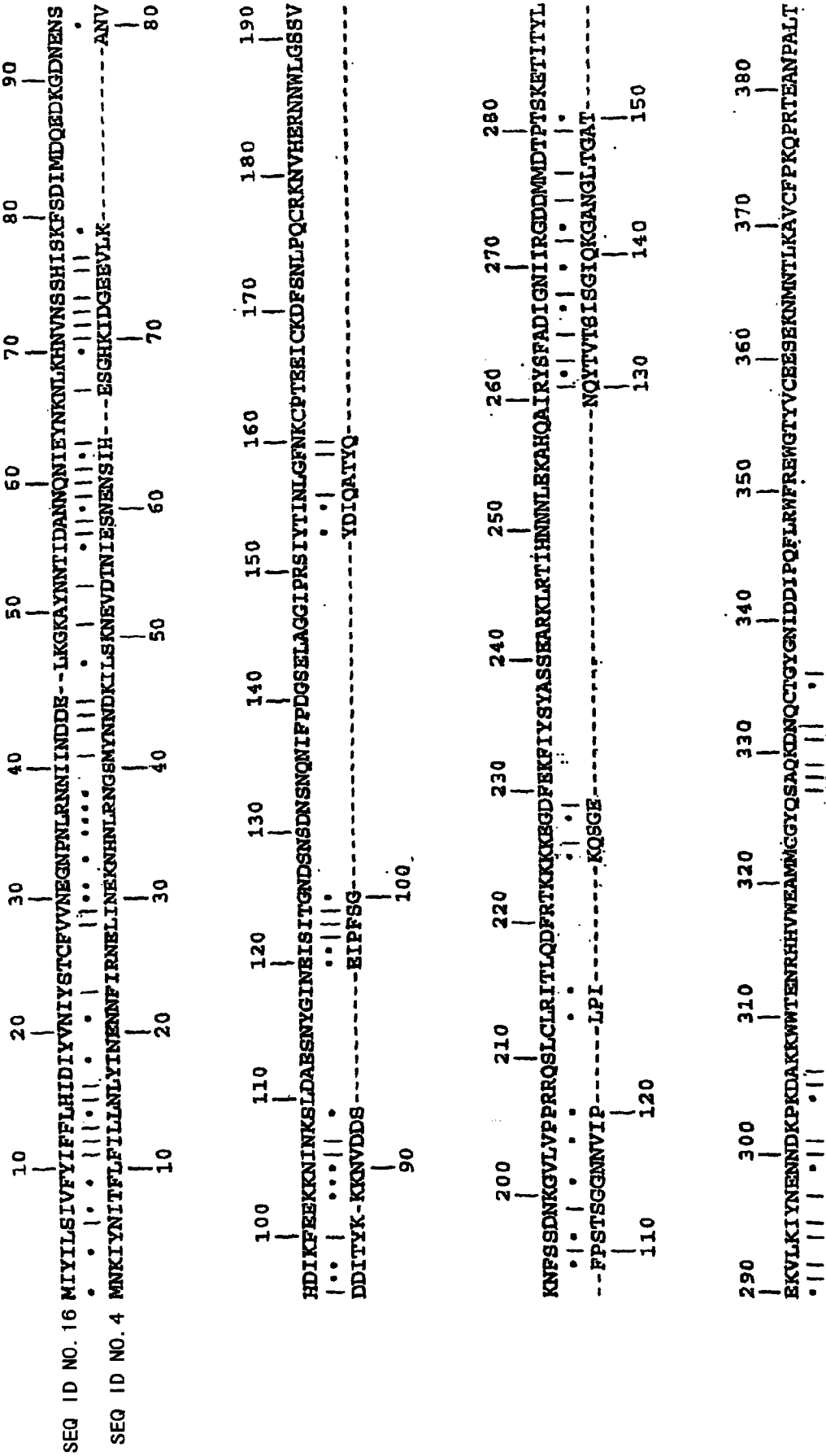


图11T

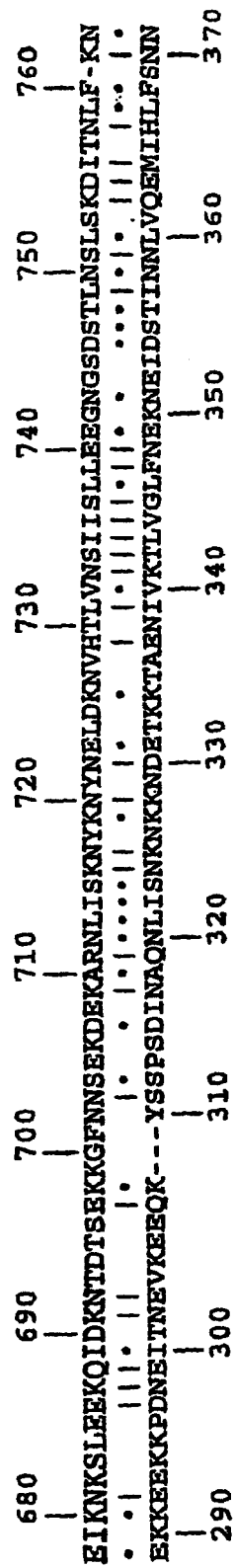


图 11V

MSP3b- 样基序

10
|
|•|

seq.4/MSP3	IL--GWEFGGGVP
seq.5/MSP6	IL--GWEFGGGAP
seq.3	YF--AWEIGGGAP
seq.1 c-term	-LER-GLGSGALP
seq.1 n-term	--DDGSAFGGGLP
seq.8	ILDDGIEFSGGLYF
seq.7 n-term	--PDGSELAGGIP
seq.7 c-term	---RLELSSGSSLE

MSP3b:

密码子: ATT TTA GGT TGG GAA TTT GGA GGA GGC GT
a.a. I L G W E F G GG V P

MSP6 等价物:

密码子: ATA CTT GGA TGG GAA TTT GGA GGA GGT GC
a.a. I L G W E F G GG A P

图12

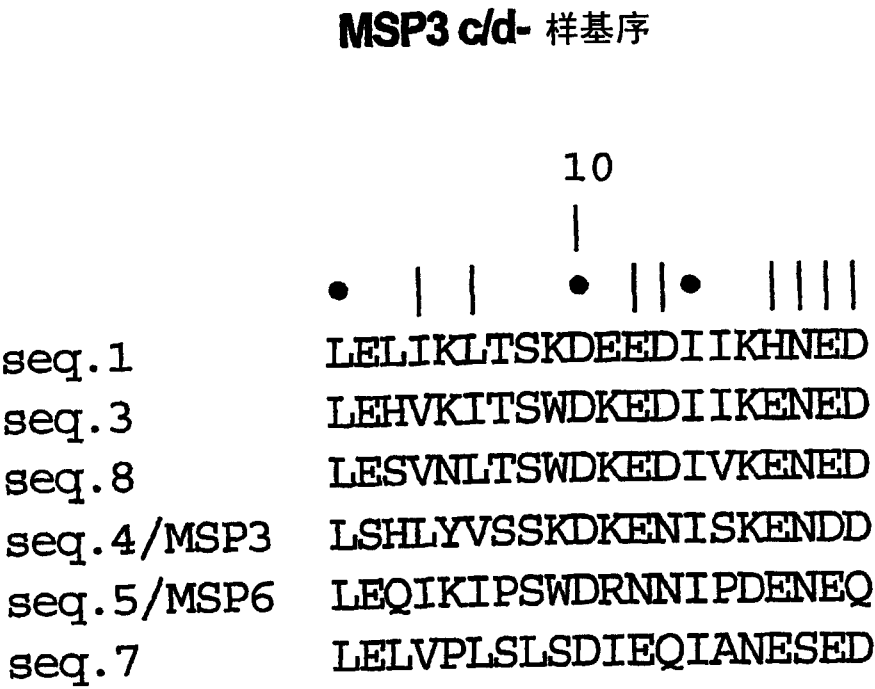
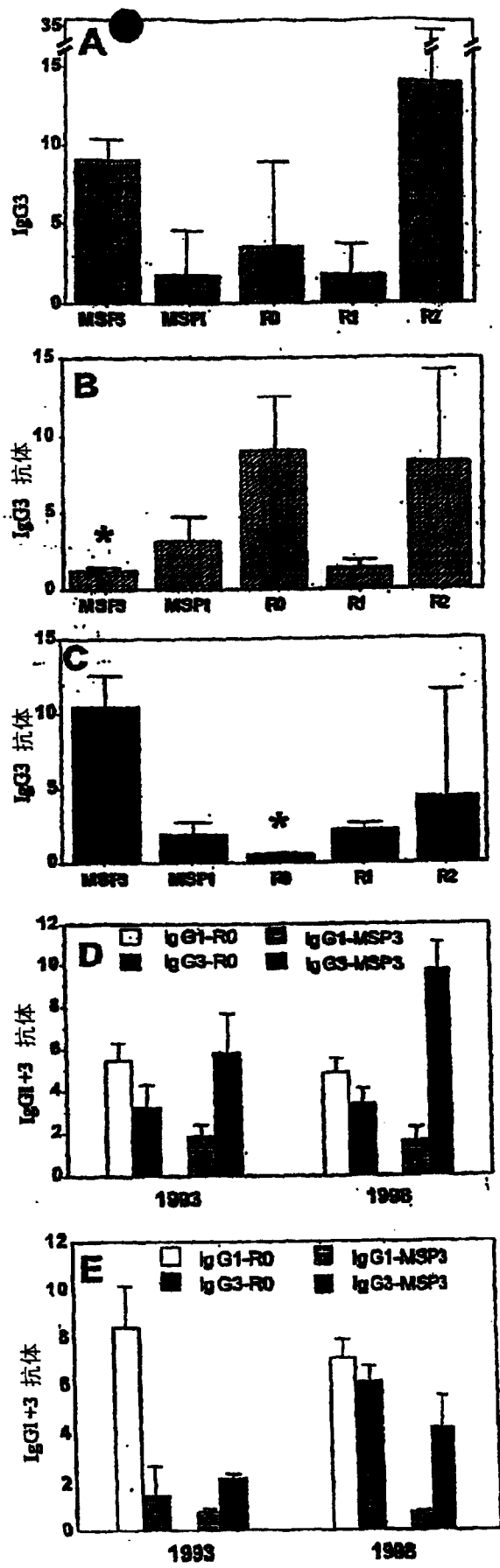


图13



14

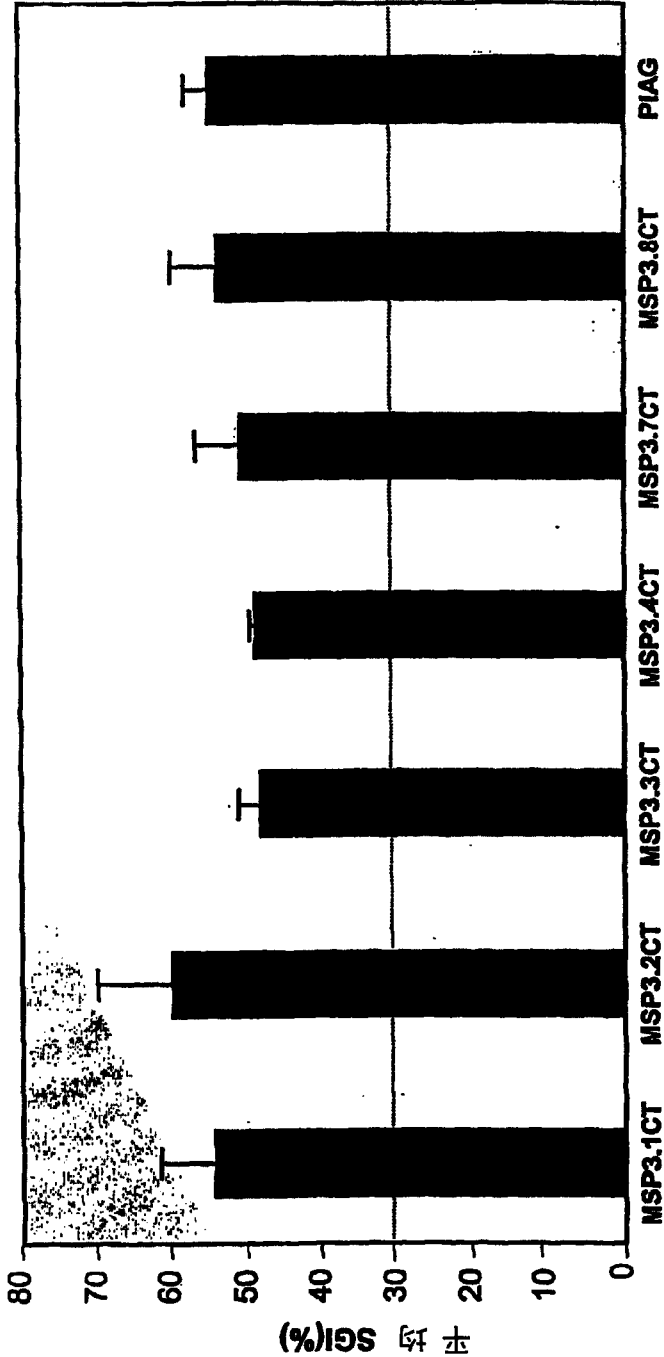


图15

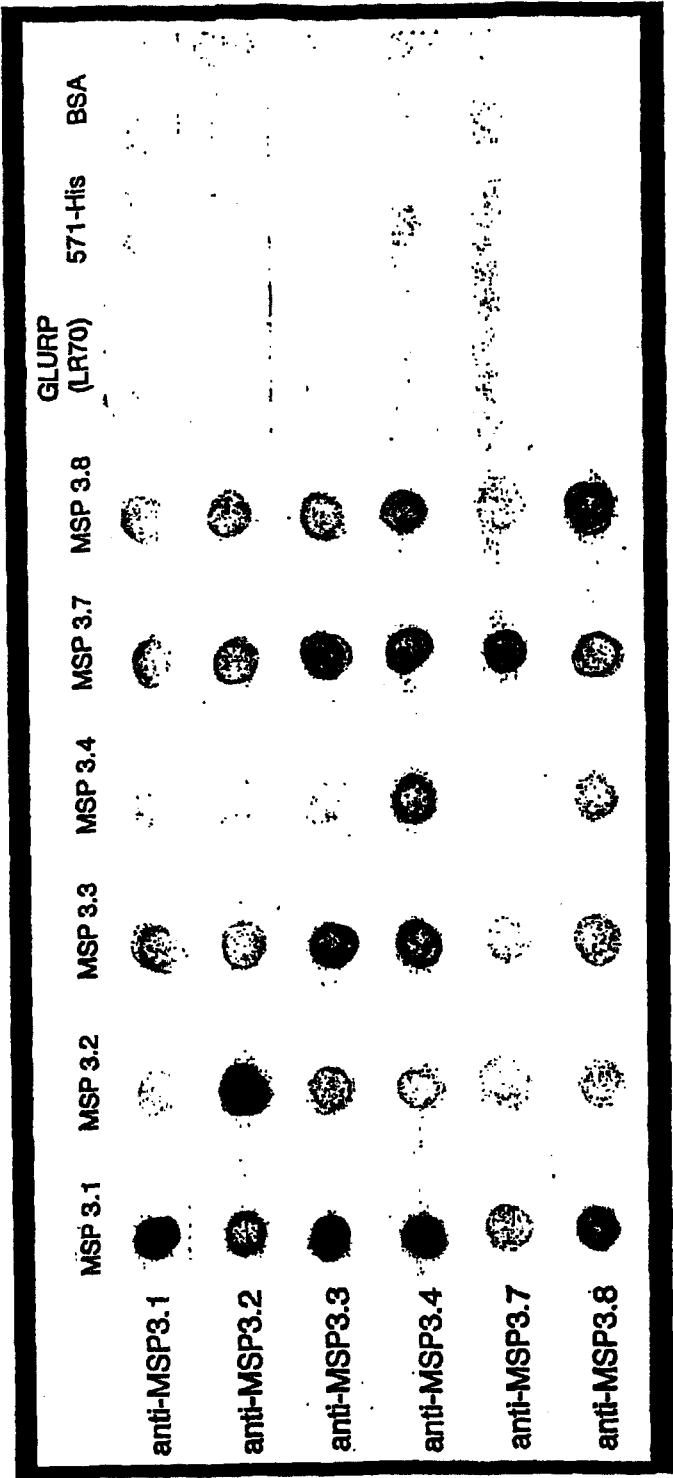


图16

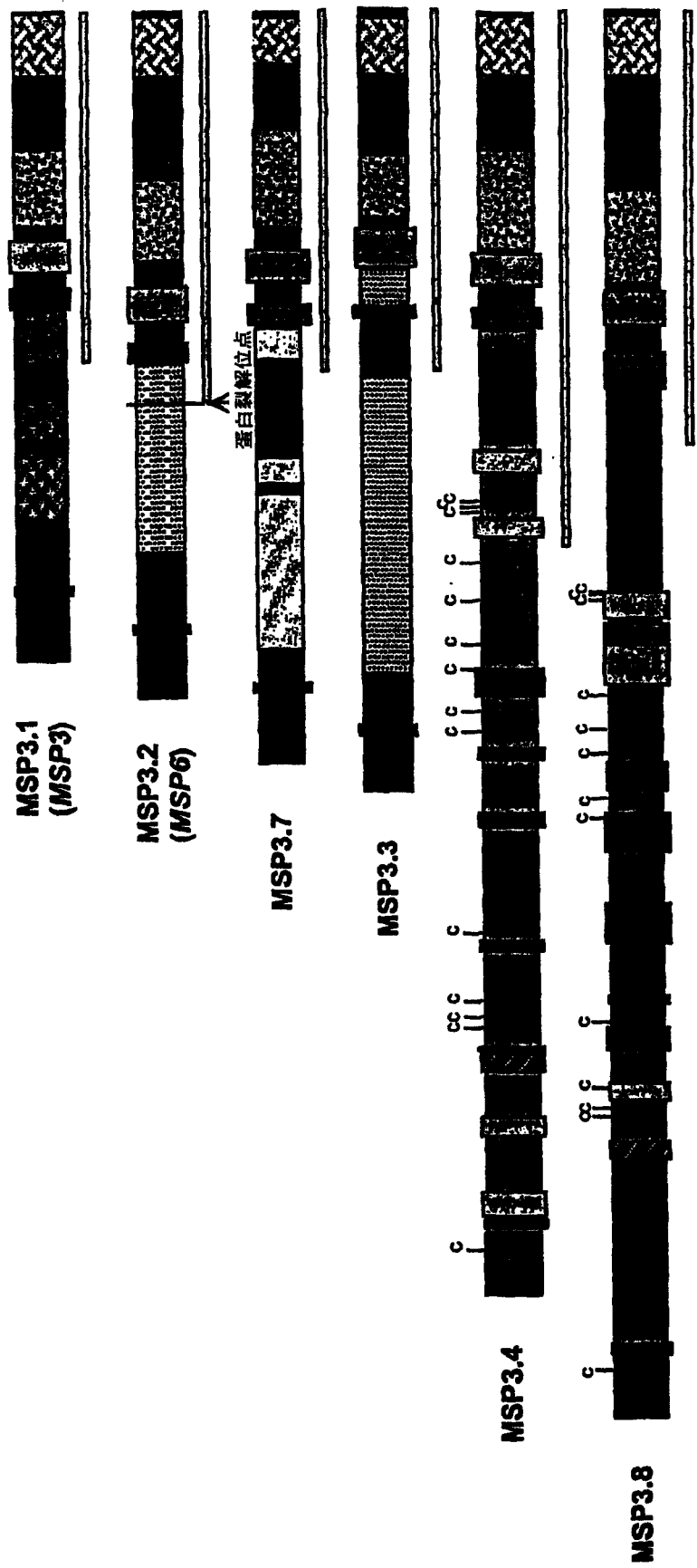


图18

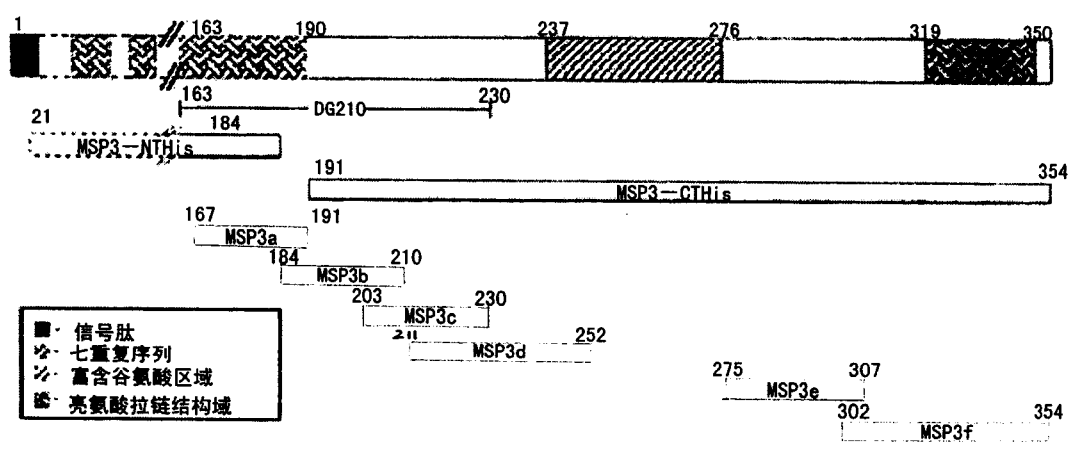


图19

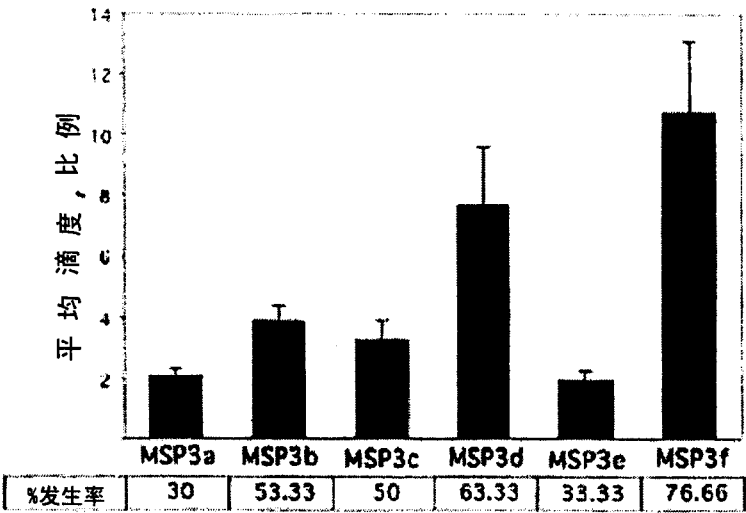


图20

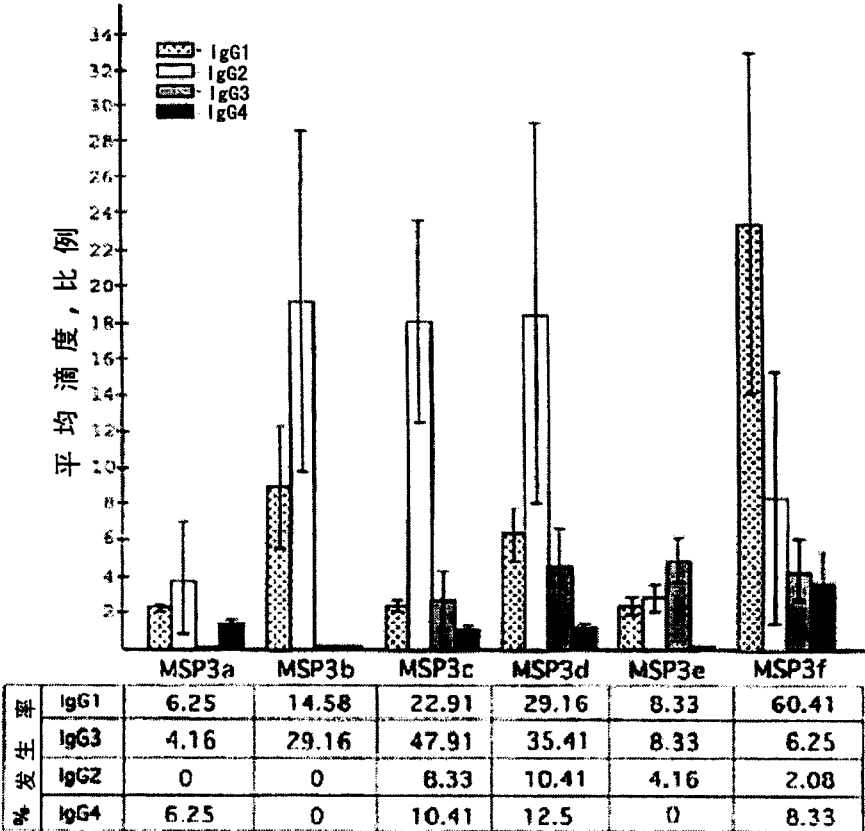


图21

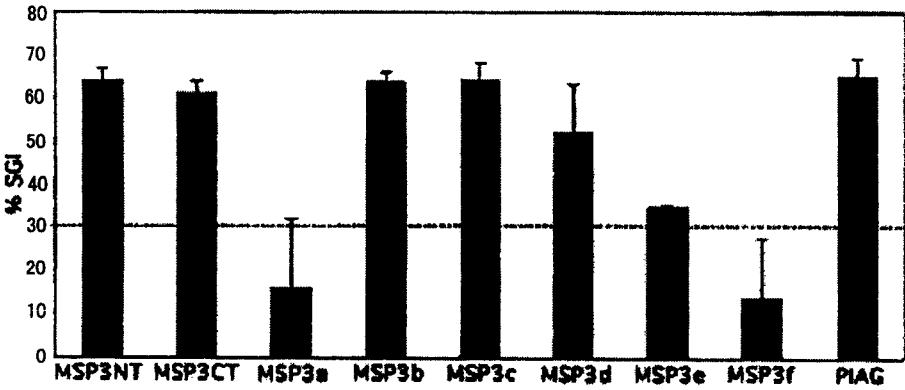


图22

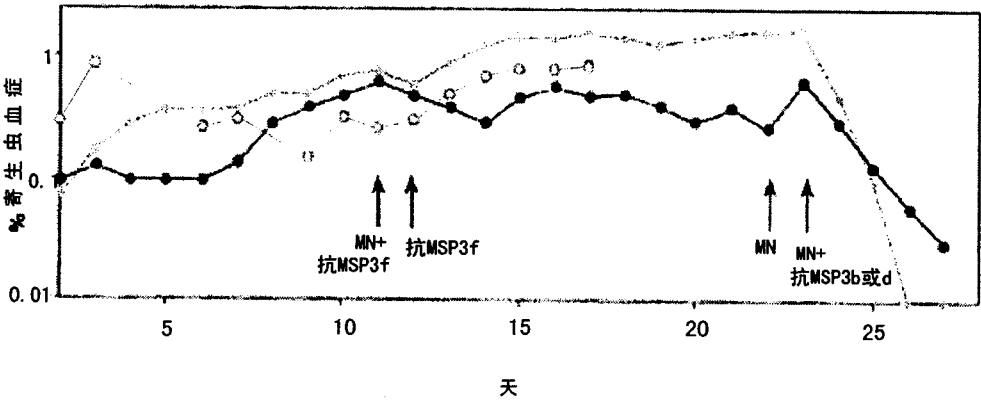


图23

MSP3a

TAT GAA AAG GCA AAA AAT GCT TAT CAA AAA GCA AAC CAA
Y E K A K N A Y Q K A N Q

GCT GTT TTA AAA GCA AAA GAA GCT TCT AGT TAT GAT
A V L K A K E A S S Y D

MSP3b

GCA AAA GAA GCT TCT AGT TAT GAT TAT ATT TTA GGT TGG
A K E A S S Y D Y I L G W

GAA TTT GGA GGA GGC GTT CCA GAA CAC AAA AAA GAA GAA
E F G G G V P E H K K E E

AAT
N

MSP3c

CCA GAA CAC AAA AAA GAA GAA AAT ATG TTA TCA CAT TTA
P E H K K E E N M L S H L

TAT GTT TCT TCA AAG GAT AAG GAA AAT ATA TCT AAG GAA
Y V S S K D K E N I S K E

AAT GAT
N D

图24

MSP3d

ATG TTA TCA CAT TTA TAT GTT TCT TCA AAG GAT AAG GAA
 M L S H L Y V S S K D K E
AAT ATA TCT AAG GAA AAT GAT GAT GTA TTA GAT GAG AAG
 N I S K E N D D V L D E K
GAA GAA GAG GCA GAA GAA ACA GAA GAA GAA GAA CTT GAA
 E E E A E E T E E E E L E
GAA AAA
 E K

MSP3e

GAA GAA AAT GAC AAA AAA AAA GAA CAA GAA AAA GAA CAA
 E E N D K K K E Q E K E Q
AGT AAT GAA AAT AAT GAT CAA AAA AAA GAT ATG GAA GCA
 S N E N N D Q K K D M E A
CAG AAT TTA ATT TCT AAA AAC
 Q N L I S K N

MSP3f

AAT TTA ATT TCT AAA AAC CAG AAT AAT AAT GAG AAA AAC
 N L I S K N Q N N N E K N
GTA AAA GAA GCT GCT GAA AGC ATC ATG AAA ACT TTA GCT
 V K E A A E S I M K T L A
GGT TTA ATC AAG GGA AAT AAT CAA ATA GAT TCT ACC TTA
 G L I K G N N Q I D S T L
AAA GAT TTA GTA GAA GAA TTA TCC AAA TAT TTT AAA AAT
 K D L V E E L S K Y F K N
CAT
 H

图25

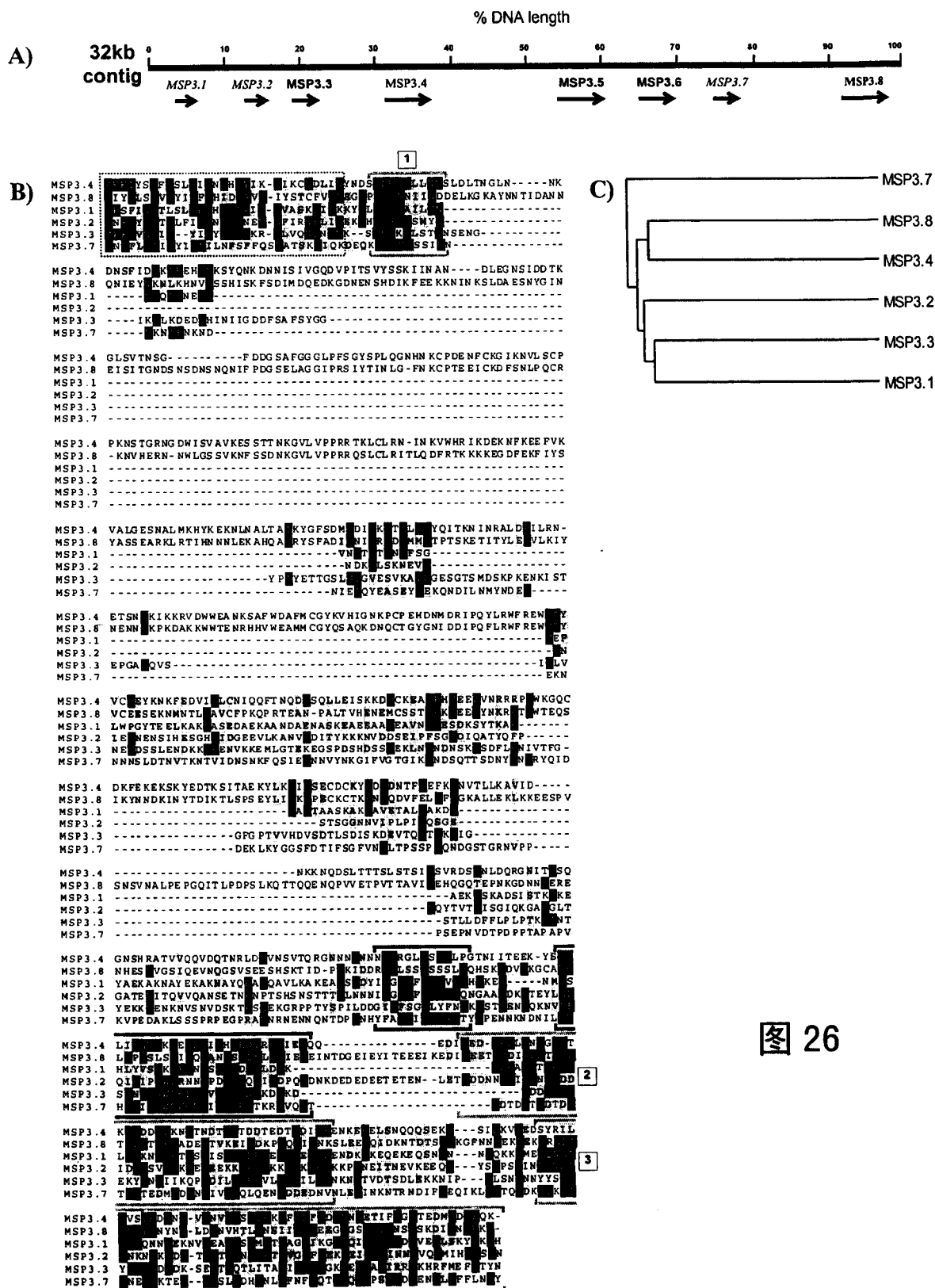
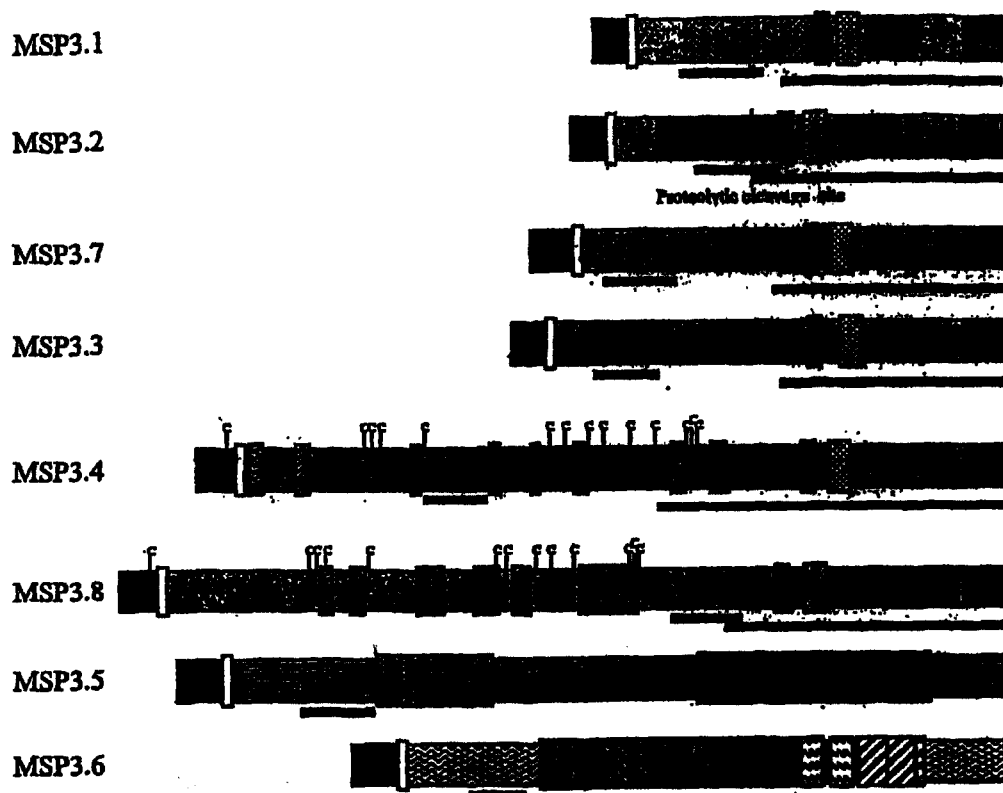


图 26



由MSP3样ORF编码的蛋白质序列的示意图。各个分子的N-末端区域具有 (■) - 信号肽和 (□) - 4-6个氨基酸的特征标记基序。除MSP3.5和MSP3.6以外的所有MSP3家族成员的C-末端部分具有与MSP3.1相似的序列组织结构。(■) - 和 (■) 代表在MSP3.1中鉴定的与保护性抗体的靶位共享序列相关性的区域。(■) - 和 (■) 分别代表富含谷氨酸的区域和推定的亮氨酸拉链结构域。

(■) - 代表与MSP3.1具有相似性的区域。在不同成员中观察到的其他特征为：

(■) - MSP3.1中的七重复序列 (heptad repeats)；其他ORF中的与MSP3.1具有序列不一致性的区域：(■), (■) 和 (■) 位于MSP3.2、MSP3.7和MSP3.3中。(■) - 代表MSP3.4和MSP3.8中的与var和ebl-蛋白质家族中的DBL结构域具有相似性的区域及半胱氨酸残基的位置。

(■) 和 (■) - 分别是MSP3.4和MSP3.8中的与MSP3.1无关的区域，它们彼此具有相似性。

(■) 和 (■) - 分别代表MSP3.5和MSP3.6中的区域及其他被遮蔽的区域，它们与其他MSP3样ORF不具有相似性。粗线代表 (■) - 覆盖在各个成员中鉴定到的独特区域的重组蛋白质，它们与其他恶性疟原虫蛋白质不具有序列相似性，和 (■) - 覆盖除MSP3.5和MSP3.6以外的所有成员中的相关C-末端区域的重组蛋白质。

图27

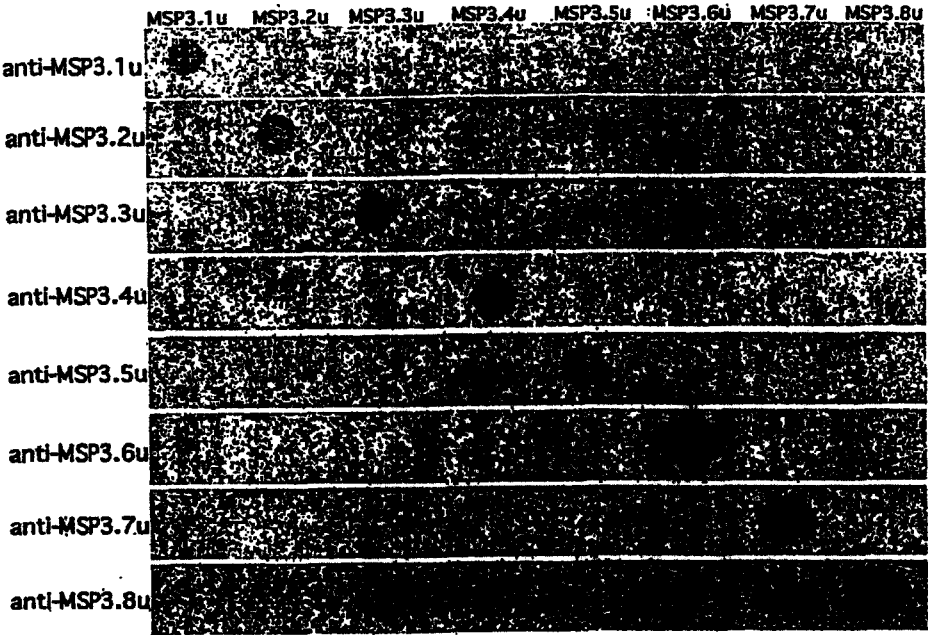


图28

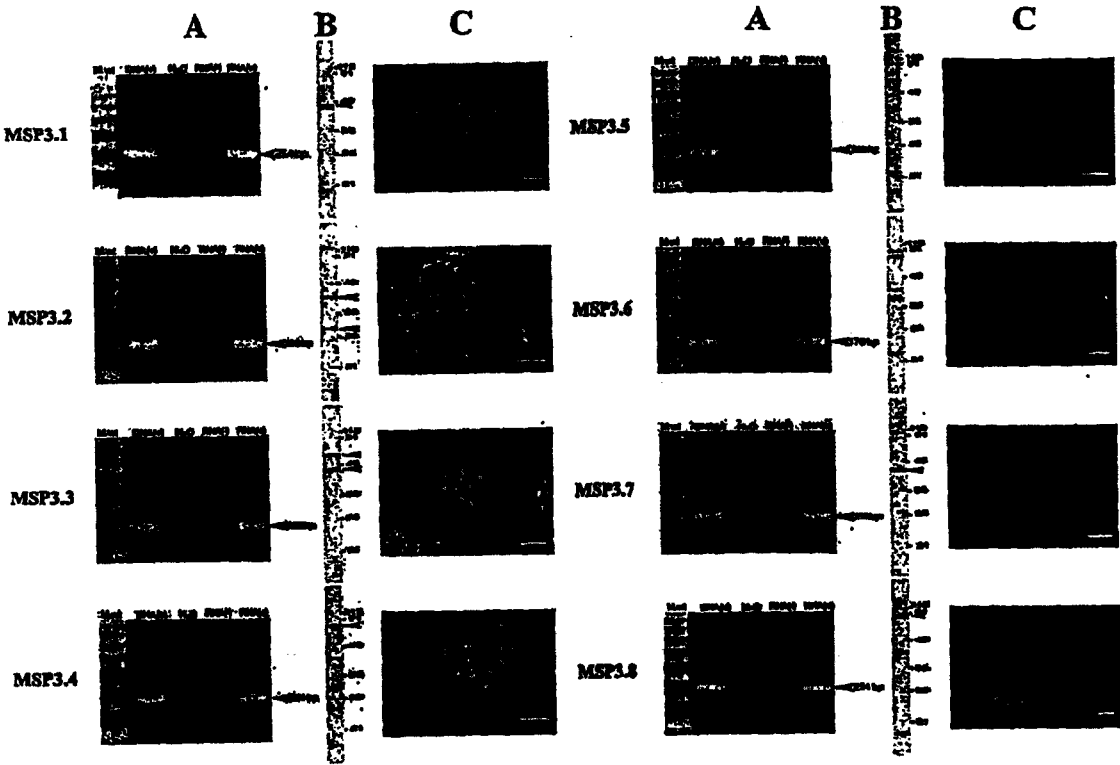


图29

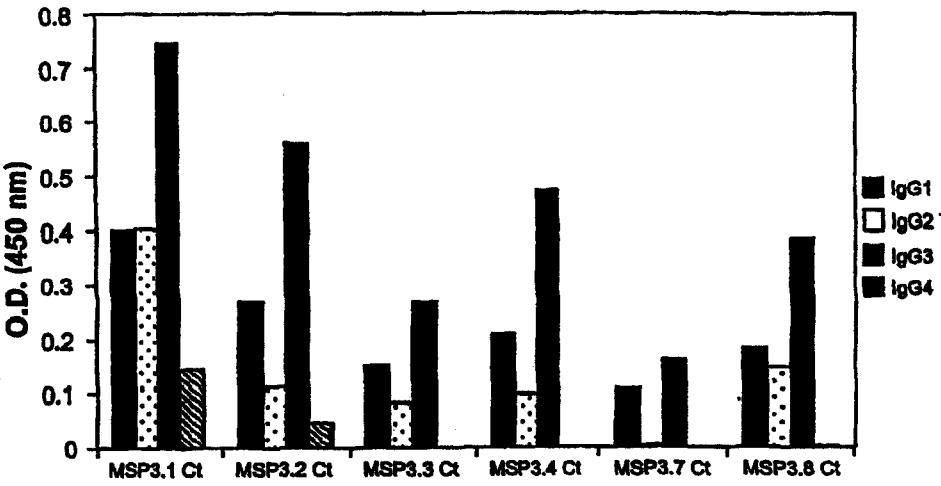


图30

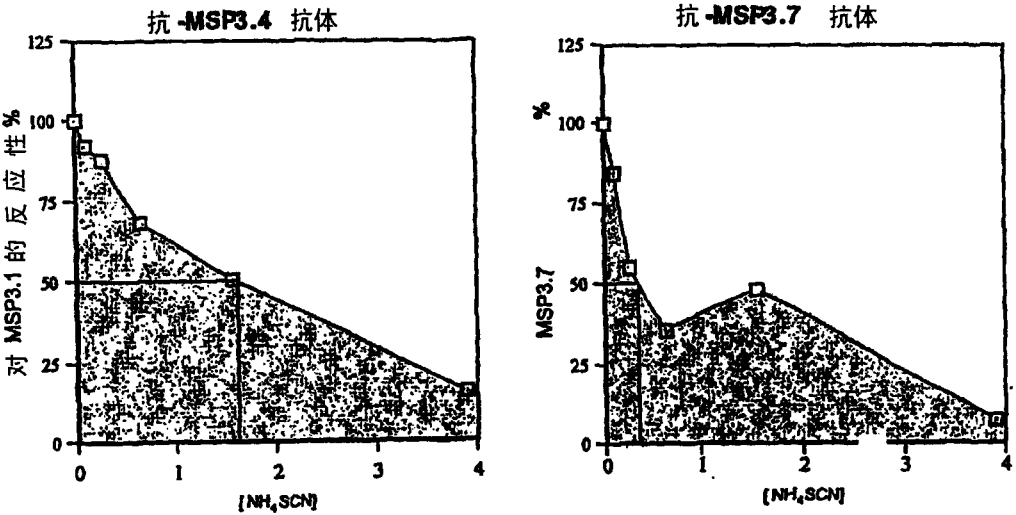


图31

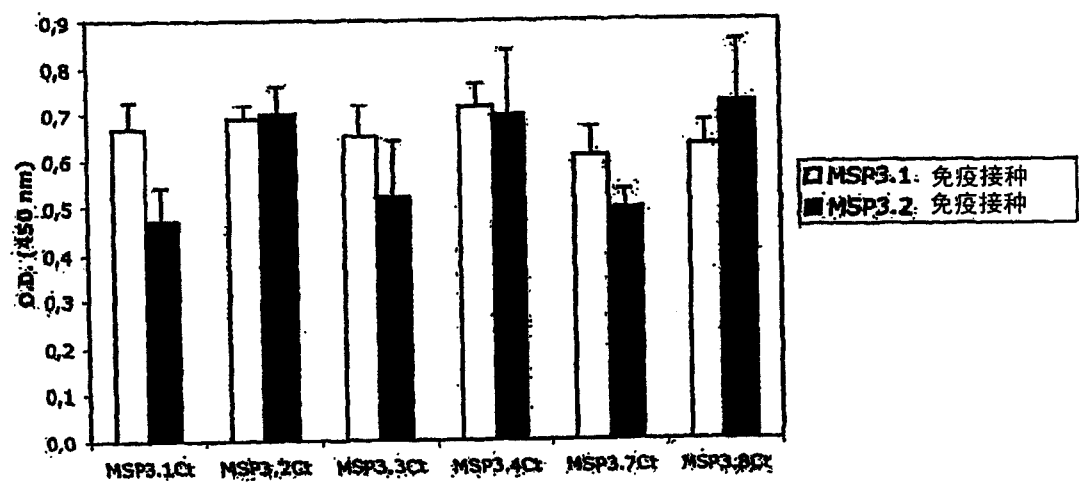


图32

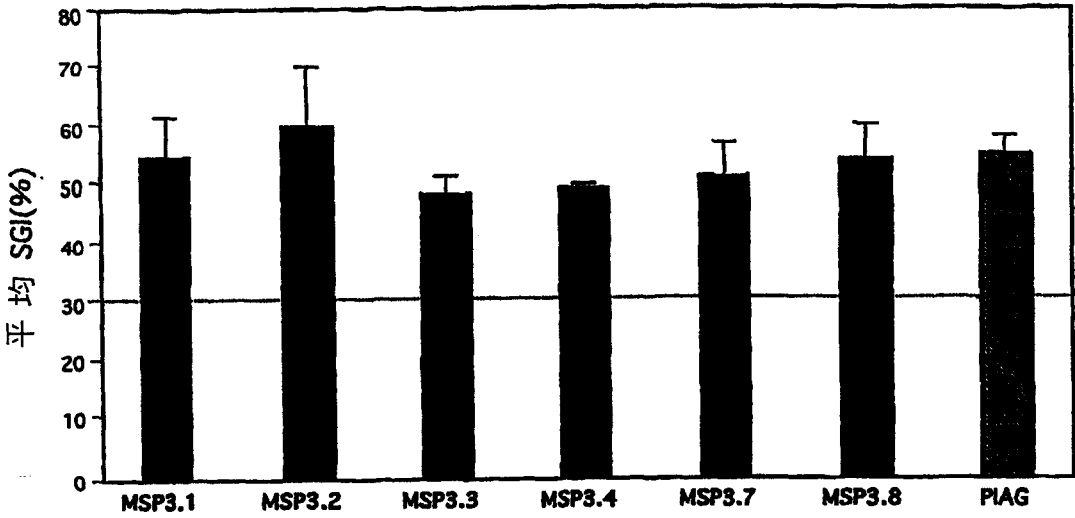
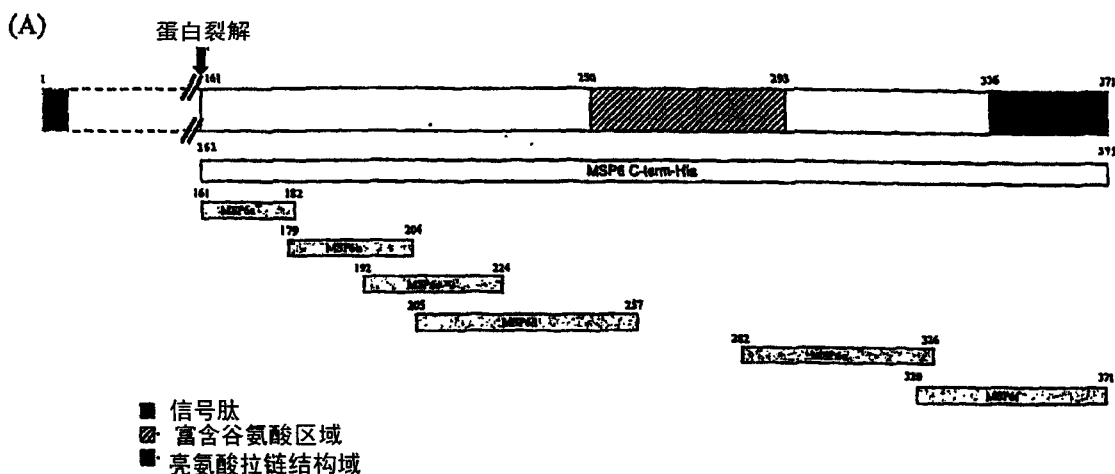


图33



(B) MSP6a: 161-SETNKNPTSHSNSTTTSLNN-----N-181
 MSP3a: 167-YEKAKNAYQKANQAVLKAEASSYD-191
 MSP6b: 178-LNN-----N-ILGWEGGGAPQNGAAEDKKTEY-204
 MSP3b: 184-AKEASSYDYILGWEGGGVP-----EHKKEEN-210
 MSP6c: 192-PQNGAAEDKKTEYLLEQIKIPSNDRNNIPDENE-224
 MSP3c: 203-P-----EHKKEENMLSHLYVSSKDKENISKEND-230
 MSP6d: 205-LLEQIKIPSNDRNNIPDENEQVIEDPQEDKDEDEEETETENLETEDDNEE-257
 MSP3d: 211-MLSHLYVSSKDKENISKENDVLOE-----KEEEAEETEEEEELE-----EK-251
 MSP6e: 274-EEEEKEEKKEEKKPDNEITNEVKEEQYSSPSDINAQNLIS-N-307
 MSP3e: 283-EEENDKKKEQEKEQSNENNDQKK-----DMEAQNLISK-N-324
 MSP6f: 320-NLIS-NKNKKNDETKKAENIVKTLVGLFNEKNEIDSTINLVQENIHLFSNN-371
 MSP3f: 302-NLISKNNNNKKNYKEAAESTIKTLAGLIKGNQIDSTLKDVLVELSKYFKNH-354

图 34

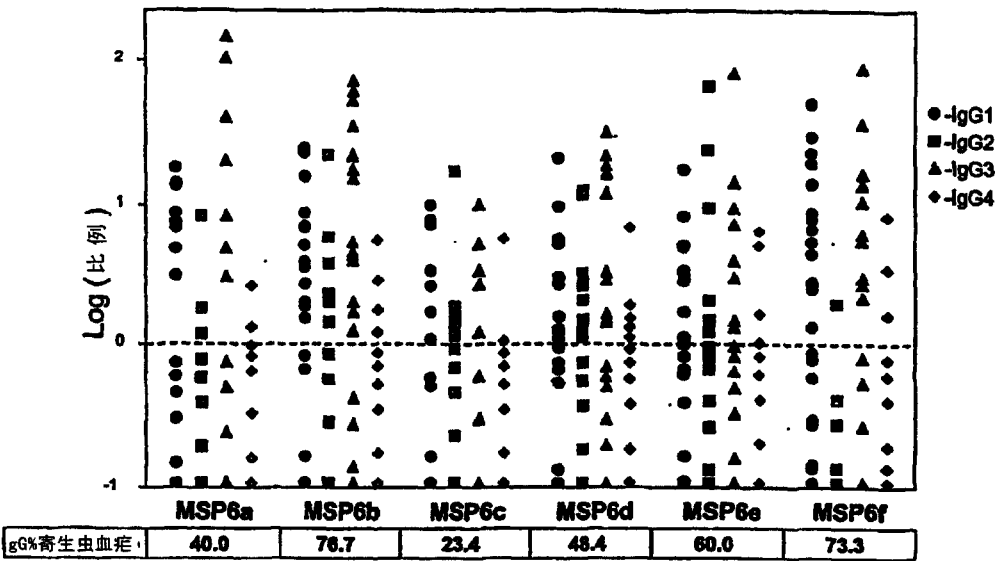


图35

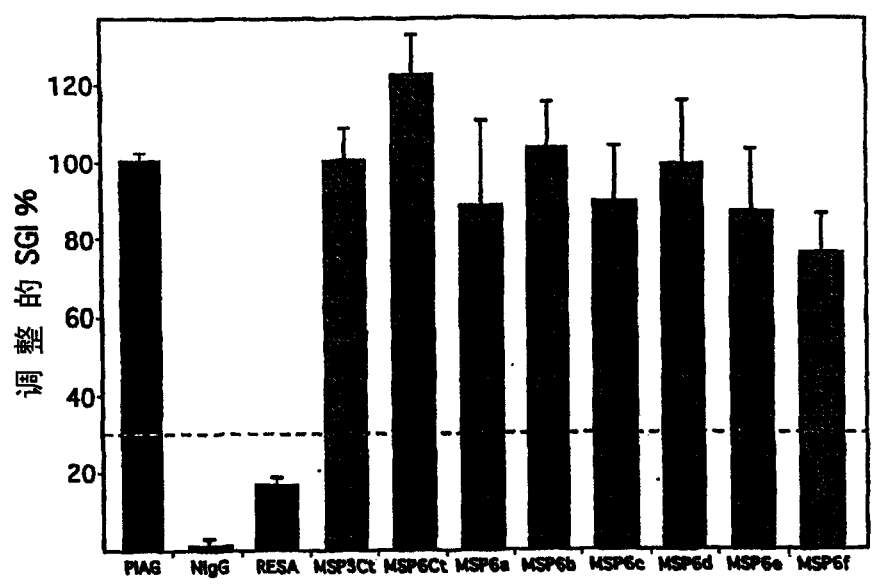


图36