[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 39/015 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680023139.1

[43] 公开日 2008 年 6 月 25 日

[11] 公开号 CN 101208100A

[22] 申请日 2006.6.29
[21] 申请号 200680023139.1
[30] 优先权
[32] 2005.6.30 [33] GB [31] 0513421.8
[86] 国际申请 PCT/EP2006/006407 2006.6.29
[87] 国际公布 WO2007/003384 英 2007.1.11
[85] 进入国家阶段日期 2007.12.27
[71] 申请人 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司
地址 比利时里克森萨特
[72] 发明人 J·D·科亨
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 郭文洁 梁 谋
权利要求书 4 页 说明书 21 页 序列表 1 页
附图 6 页

[54] 发明名称

抗疟疾疫苗

[57] 摘要

本发明提供一种在疟疾流行区的旅行者中预防增殖性疟疾感染的方法，包括施用适量的制剂，所述制剂包括疟原虫(Plasmodium)抗原或者其免疫原性片段或其衍生物和佐剂，所述佐剂是包括脂质 A(lipid A)衍生物和皂苷的脂质体制剂。

1. 疟原虫（*Plasmodium*）抗原或者其免疫原性片段或其衍生物和佐剂在制备用于免疫到流行区的旅行者以抵御增殖性疟疾感染的药物中的用途，所述佐剂是包括脂质A衍生物和皂苷的脂质体制剂。

2. 如权利要求1所述的用途，其特征在于疟原虫抗原是环子孢子蛋白或者其免疫原性片段或者其能够激发针对疟原虫免疫应答的衍生物。

3. 如权利要求2所述的用途，其特征在于CS蛋白或其片段与乙型肝炎表面抗原（HBsAg）融合。

4. 如权利要求3所述的用途，其特征在于CS蛋白或其片段为杂合蛋白的形式，所述杂合蛋白包括基本上全部的疟原虫CS蛋白C末端部分、CS蛋白免疫显性区的4个或者更多的串联重复和乙型肝炎表面抗原（HBsAg）。

5. 如权利要求1到4中任意一项所述的用途，其特征在于杂合蛋白包括恶性疟原虫（*P.falciparum*）CS蛋白的序列，该序列基本上对应于恶性疟原虫NF54株3D7克隆CS蛋白的207-395位氨基酸，所述CS蛋白通过线性接头与HBsAg的N端符合读框地融合。

6. 如权利要求5所述的用途，其特征在于杂合蛋白是RTS。

7. 如权利要求6所述的用途，其特征在于RTS为混合颗粒RTS,S的形式。

8. 如权利要求7所述的用途，其特征在于RTS,S的量是每剂量25或者50微克。

9. 如权利要求1到8中任意一项所述的用途，其特征在于佐剂包括3D-MPL和QS21。

10. 如权利要求9所述的用途，其特征在于QS21在含有胆固醇的脂质体中淬灭。

11. 如权利要求1-10中任意一项所述的用途，与编码疟原虫抗原或者其免疫原性片段或其衍生物的多核苷酸联用，其特征在于抗原/佐剂混合物和多核苷酸可以按任意次序顺序使用。

12. 如权利要求11所述的用途，其特征在于首先使用多核苷酸。

13. 一种用于免疫到流行区的旅行者以抵御增殖性疟疾感染制剂，包括疟原虫抗原或者其免疫原性片段或其衍生物和佐剂，所述佐剂是包括脂质A衍生

物和皂苷的脂质体制剂。

14. 如权利要求 13 所述的制剂，其特征在于疟原虫抗原是环子孢子蛋白或者其免疫原性片段或者其能够激发针对疟原虫的免疫应答的衍生物。

15. 如权利要求 14 所述的制剂，其特征在于 CS 蛋白或其片段与乙型肝炎表面抗原（HBsAg）融合。

16. 如权利要求 15 所述的制剂，其特征在于 CS 蛋白或其片段为杂合蛋白的形式，所述杂合蛋白包括基本上全部的疟原虫 CS 蛋白 C 末端部分、CS 蛋白免疫显性区的 4 个或者更多的串联重复和乙型肝炎表面抗原（HBsAg）。

17. 如权利要求 13 到 16 中任意一项所述的制剂，其特征在于杂合蛋白包括恶性疟原虫 CS 蛋白的序列，该序列基本上对应于恶性疟原虫 NF516 株 3D7 克隆 CS 蛋白的 207-395 位氨基酸，所述 CS 蛋白通过线性接头与 HBsAg 的 N 端符合读框地融合。

18. 如权利要求 17 所述的制剂，其特征在于杂合蛋白是 RTS。

19. 如权利要求 18 所述的制剂，其特征在于 RTS 为混合颗粒 RTS,S 的形式。

20. 如权利要求 19 所述的制剂，其特征在于 RTS,S 的量是每剂量 25 或者 50 微克。

21. 如权利要求 13 到 20 中任意一项所述的制剂，其特征在于佐剂包括 3D-MPL 和 QS213。

22. 如权利要求 21 所述的制剂，其特征在于 QS21 在含有胆固醇的脂质体中淬灭。

23. 如权利要求 13-22 中任意一项所述的制剂作为初始/加强疗法一部分的用途，其特征在于其他部分包括编码疟原虫抗原或者其免疫原性片段或其衍生物的多核苷酸，其中抗原/佐剂混合物和多核苷酸可以按任意次序顺序使用。

24. 如权利要求 23 所述的制剂，其特征在于首先使用多核苷酸。

25. 一种在疟疾流行区的旅行者中预防增殖性疟疾感染的方法，包括施用适量制剂，所述制剂包括疟原虫抗原或其免疫性片段或其衍生物和佐剂，所述佐剂是包括脂质 A 衍生物和皂苷的脂质体制剂。

26. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于疟原虫抗原是环子孢子蛋白或者其免疫原性片段或者其能够激发针对疟原虫的免疫应答的衍生物。

27. 如权利要求26所述的方法，其特征在于CS蛋白或其片段与乙型肝炎表面抗原（HBsAg）融合。

28. 如权利要求27所述的方法，其特征在于CS蛋白或其片段为杂合蛋白的形式，包括基本上全部的疟原虫CS蛋白C末端部分、CS蛋白免疫显性区的4个或者更多的串联重复和乙型肝炎表面抗原（HBsAg）。

29. 如权利要求25到28中任意一项所述的方法，其特征在于杂合蛋白包括恶性疟原虫CS蛋白的序列，该序列基本上对应于恶性疟原虫NF528株3D7克隆CS蛋白的207-395位氨基酸，所述CS蛋白通过线性接头与HBsAg的N端符合读框地融合。

30. 如权利要求29所述的方法，其特征在于杂合蛋白是RTS。

31. 如权利要求30所述的方法，其特征在于RTS为混合颗粒RTS,S的形式。

32. 如权利要求31所述的方法，其特征在于RTS,S的量是每剂量25或者50微克。

33. 如权利要求25到32中任意一项所述的方法，其特征在于佐剂包括3D-MPL和QS21。

34. 如权利要求33所述的方法，其特征在于QS21在含有胆固醇的脂质体中淬灭。

35. 如权利要求25到34中任意一项所述的方法，还包括施用编码疟原虫抗原或其免疫原性片段或其衍生物的多核苷酸，用于初始/加强疗法。

36. 如权利要求35所述的方法，其特征在于首先使用多核苷酸。

37. 疟原虫抗原或者其免疫原性片段或其衍生物和佐剂在制备用于免疫到流行区的旅行者以抵御疟疾感染的试剂盒中的用途，所述佐剂是包括脂质A衍生物和皂苷的脂质体制剂，其中提供的抗原是冻干形式，抗原和佐剂在施用前混合。

38. 如权利要求37所述的用途，其特征在于疟原虫抗原是环子孢子蛋白或者其免疫原性片段或者其能够激发针对疟原虫的免疫应答的衍生物。

39. 一种试剂盒，包括；

•以冻干形式提供的疟原虫抗原或者其免疫原性片段或其衍生物，

•包括脂质A衍生物和皂苷的脂质体剂型的佐剂，和

•说明书，该说明书详细说明在施用到流行区的旅行者前将抗原、佐剂和可选的载体混合，

从而保护所述旅行者免于增殖性疟疾感染。

40. 如权利要求 39 所述的试剂盒，还包括编码疟原虫抗原或者其免疫原性片段或其衍生物的多核苷酸；其中抗原/佐剂混合物和多核苷酸可以按任意次序顺序使用，但特别地，其中的多核苷酸用于初始，抗原/佐剂混合物用于加强。

41. 如权利要求 39 或者 40 所述的试剂盒，其特征在于疟原虫抗原是环子孢子蛋白或者其免疫原性片段或者其能够激发针对疟原虫的免疫应答的衍生物。

42. 一种评价候选疫苗，尤其是红细胞前期的候选疫苗，预防疟疾的效果的方法，该方法包括检测个体中激发的抵御候选疫苗的 CD4 细胞水平。

43. 一种评价候选疫苗，尤其是红特异抗体前期候选疫苗，预防疟疾的效果的方法，该方法包括检测个体中激发的抵御候选疫苗的特异抗体浓度。

44. 如权利要求 42 或者 43 所述的方法，其特征在于疫苗包括疟原虫抗原或者其免疫原性片段或其衍生物和佐剂，所述佐剂是包括脂质 A 衍生物和皂苷的脂质体制剂。

45. 一种检测个体在施用了疟疾抗原组合物，尤其是红细胞前期疟疾抗原组合物后是否预防了疟疾的方法，该方法包括检测个体中激发的疟疾抗原特异的 CD4 T 细胞水平。

46. 一种检测个体施用了疟疾抗原组合物，尤其是红细胞前期疟疾抗原组合物后是否预防了疟疾的方法，该方法包括检测个体中激发的疟疾抗原特异的抗体浓度。

抗疟疾疫苗

本发明涉及疟疾抗原在进行免疫抵御疟疾感染和疾病中的新用途。本发明特别涉及子孢子抗原，特别是环子孢子（CS）蛋白或其免疫原性片段或衍生物，与合适佐剂联合免疫将到疟疾流行区旅行的未接触过疟疾的个体，以抵御疟疾感染的用途。

疟疾是世界范围内的主要健康问题之一。在20世纪，经济和社会发展以及抗疟疾运动已经使世界上的大部分地区都根除了疟疾，受影响的地区占地球陆地面积的比例从50%减少到27%。尽管如此，考虑到预期人口增长，估计到2010年大概一半的世界人口，接近35亿人，将生活在疟疾传染区（Hay，2004）。现在的估测表明每年超过1百万人死于疟疾，单是非洲的经济费用就是惊人的（Bremen，2004）。

这些数字突出了全球疟疾危机和摆在国际健康共同体面前的挑战。该危机的起因是多重的，从对现有的、负担的起和先前高效药物的普遍抗药性的出现，到医疗卫生系统的瘫痪和不完善以及资源的缺乏。除非发现控制这种疾病的途径，否则改善健康和儿童存活率，减少贫困，增强安全感和强化最脆弱社会的全球努力将会失败。

疟疾还给那些在疟疾流行区旅行或者工作的人带来危险，这些人通常居住在没有疟疾的地方。对这类旅行者人群来说危险可能更大，因为他们对来自自然接触的疟疾不具有任何基础免疫。到疟疾流行区的旅行者遭遇危险的另一个方面是，由于流行性感冒样症状，该疾病在其早期经常被误诊。当严重程度加重和疟疾最终被确诊时，可能就太晚了。在症状加重的几日内，就可能导致死亡，例如，源于脑型疟，或者有时是器官（例如肝或者肾）衰竭。

该疾病的一个最急性形式是由原生动物寄生恶性疟原虫（*Plasmodium falciparum*）引起的，恶性疟原虫导致大多数属于疟疾的死亡。该疾病的另一种形式是由间日疟原虫（*Plasmodium vivax*）引起的。间日疟原虫（*P. vivax*）是所有疟疾中分布最广泛的。除了存在于热带和亚热带地区外，该寄生虫在低至

15 摄氏度的温度下完成蚊体内循环的能力使其可以在温带气候中传播。但由于间日疟原虫感染极少致命，控制间日疟原虫疟疾的努力（通过疫苗开发）滞后于恶性疟原虫（*P. falciparum*）。

30 多年前做出的观察为下列看法提供了有力支持，即最终将开发出有效的疟疾疫苗。通过用活的、辐射灭活疟疾子孢子免疫，小鼠和人类可以预防疟疾。体内肝内期的维持是产生和保持保护性免疫所需的，但基本机理还没有完全明确。抗体、CD8 和 CD4 T 细胞已经暗示其作为关键效应免疫调节物（Hoffman，1996）。

疟原虫（例如恶性疟原虫或者间日疟原虫）的生活周期是复杂的，需要两个宿主，人和蚊子才能完成。人的感染是由受感染蚊子的唾液中子孢子的接种引起的。子孢子迁移到肝脏，在那里感染肝细胞（肝期），在肝细胞中通过红细胞外胞内期（exoerythrocytic intracellular stage），分化进入裂殖性孢子期（merozoite stage），裂殖性孢子感染红细胞（RBC）起始无性血液期（asexual blood stage）中的循环复制。通过大量 RBC 中的裂殖性孢子分化成有性期配子体，循环完成，所述配子体被蚊子摄取，在那里配子体在中肠经过一系列阶段的发育产生迁移到唾液腺的子孢子。

疟原虫（例如恶性疟原虫或者间日疟原虫）的子孢子期已经被鉴定为一种疟疾疫苗的潜在靶标。已知子孢子的主要表面蛋白是环子孢子蛋白（CS 蛋白）。已经对不同株系例如恶性疟原虫 NF54 株克隆 3D7 进行了该蛋白的克隆、表达和测序（Caspers，1989）。来自 3D7 株的该蛋白的特征是具有中心免疫显性重复区，包括重复 40 次的四肽 Asn-Ala-Asn- Pro，但其中散布 4 个较少重复的四肽 Asn-Val-Asp-Pro。在其他株系中，主要的和较少的重复的数目以及它们的相对位置是不同的。该中心部分位于 N 和 C 末端部分中间，所述 N 和 C 末端部分由非重复氨基酸序列组成，其被命名为 CS 蛋白的无重复部分。

基于 CS 蛋白的葛兰素史密斯克莱恩生物有限公司的（GlaxoSmith- Kline Biologicals'）RTS,S 疟疾疫苗从 1987 年开始研发，是当前研究中最有效的疟疾疫苗（Ballou，2004）。该疫苗特异的以恶性疟原虫的红细胞前期（pre-erythrocytic）作为靶标。

RTS,S/AS02A（RTS,S 加佐剂 AS02A，佐剂 AS02A 包括免疫刺激剂 QS21，3D-MPL 和水包油乳剂）被用于在冈比亚进行的连续 I 期研究，所述研究包括成

人(Doherty, 1999)，年龄在 6-11 和 1-5 岁的儿童(Bojang, 2005)，证实该疫苗是安全、良好耐受和产生免疫性的。随后选择儿科疫苗剂量，在包括 1-4 岁莫桑比克儿童的 I 期研究中发现它是安全、良好耐受和产生免疫性的（Macete）。

RTS,S/AS02A 疫苗在美国和西非地区的临床试验中也显示明显功效。RTS,S/AS02A 诱导针对恶性疟原虫环子孢子蛋白显著的 IgG 抗体应答和实质 T 细胞免疫（Lalvani，1999；Sun，2003）。在美国未接触过疟疾的志愿者中进行抗恶性疟原虫实验攻击的效果，据估算大约平均是 30－50％（Stoute，1997；Stoute，1998；Kester，2001）。这些研究（Stoute，1997）中的第一项在小规模试验中 86%有效，其中用 RTS,S/AS02A 免疫的 7 位个体中有 6 位得到保护。此外，在冈比亚进行的不完全免疫现场研究（在冈比亚成人中进行的安全性研究（Doherty，1999））显示在 15 周的传染季节期间内，总有效率达 34%，在随后的前 9 周内 71%的有效率，此后 0%的有效率(Bojang，2001)。这些研究(Stoute，1997；Stoute，1998；Bojang，2001；Kester，2001）显示了抗感染的效果。

最近报道了在年幼非洲儿童中利用 RTS,S/AS02A 进行试验的结果。人们发现基于 CS 蛋白的 RTS,S 疫苗不仅可以预防自然接触下的感染，而且可以预防恶性疟原虫引起的一系列临床疾病。接种 RTS,S 疫苗的儿童比对照组的儿童经历更少的严重有害事件、住院和严重的疟疾并发症，包括死亡（Alonso，2004）。

此外，RTS,S 疫苗抗新感染或者临床发作的效果似乎并不减弱或者作用缓慢。在试验后 6 个月，疫苗仍然是有效的，因为在感染患病率方面存在显著差异。这与先前在未接触过疟疾的志愿者或者冈比亚成人中的试验相反，先前试验表明 RTS,S 的疫苗效果是短暂的（Stoute，1998；Bojang，2001）。此外，在继续 12 个月后，观察到疫苗抗临床疟疾发作的效果没有显著减弱（Alonso，2005）。

尽管如上所述的疫苗制剂显示临床效果，仍然需要进一步改进，以便增加接受预防个体的数目以及预防的持久性。新的佐剂制剂，例如包含 QS21 和 3D-MPL 的脂质体制剂（本文称为佐剂 B），在不同临床前和临床调查中证实对增强 T 细胞免疫应答更强的潜能。

特别的，对于一个不是来自疟疾流行区但将到疟疾流行区做有限时间旅行的人来说，需要的是对感染更好的预防。只有当存在肝脏的增殖性感染时才会出现疟疾的临床表现，肝脏的增殖性感染导致裂殖性孢子的形成和它们从肝脏

期的释放。这些裂殖性孢子然后感染RBC，起始寄生虫的致病血液期，引起临床疟疾症状。如果接触后没有增殖性感染（即肝脏未受感染和/或没有肝裂殖性孢子的释放），则这称为无菌免疫。在蚊叮咬后将显著降低如上定义的增殖性肝感染风险的疫苗，对没有预先免疫的旅行者群体来说是非常需要的，因为通过阻止增殖性肝感染，疫苗将预防任何继发的临床表现。这可能与以流行区的儿童或者成人作为目标的疫苗开发的目的相反，这种开发的主要目的是降低疾病的严重程度和/或降低发病数量，但不需要完全预防它们。理论上，在流行区的人口中长期地维持无菌保护是不可能的，因此他们需要通过接触疟疾感染建立他们自己的免疫性。此外，对居住在流行区的人口给予长期但有限时段的无菌保护也不是可取的。

本文中我们描述了在未接触过疟疾的群体中由RTS,S/AS02A相对包含不同的佐剂（佐剂B）的RTS,S头对头（head to head）比较组成的攻击临床试验，所述佐剂是包含QS21和3D-MPL的含有胆固醇的脂质体制剂（参见实施例）。对T-和B-细胞介导的免疫均进行了研究。

结果显示在未接触过疟疾的成年群体中，在疟疾攻击后预防增殖性肝感染方面，RT5,S抗原与佐剂B组合比RTS,S/AS02A的有效率高50%。因此，RT5,S抗原与佐剂B组合对无菌保护是更有效的，到疟疾流行区旅行的未接触过疟疾的个体需要无菌保护。这种增强的效果源于佐剂B增强抗原特异性免疫应答（抗体和CD4-Th1 T细胞）。

因此本发明提供一种疟原虫抗原或者其免疫原性片段或其衍生物和佐剂在制备药物中的用途，所述药物用于免疫到流行区的旅行者以抵御增殖性疟疾感染，所述佐剂是包括脂质A（lipid A）衍生物和皂苷的脂质体制剂。

通常，到流行区的旅行者都是未接触过疟疾的。因此，本发明适用于未接触过疟疾的个体。

本发明尤其涉及降低到流行区的旅行者中增殖性疟疾感染的发病率，旅行者可以是任何年龄的，但尤其是成人。

本发明的第二个方面提供一种包括疟原虫抗原或者其免疫原性片段或其衍生物和佐剂的制剂，所述佐剂是包括脂质A衍生物和皂苷的脂质体制剂，用于免疫到流行区的旅行者以抵御增殖性疟疾感染。

本发明的第三个方面提供一种在流行区的旅行者中预防增殖性疟疾感染的

方法，包括施用适量制剂，所述制剂包括疟原虫抗原或者其免疫原性片段或其衍生物和佐剂，所述佐剂是包括脂质A衍生物和皂苷的脂质体制剂。

在本发明的一个实施例中，疟原虫抗原是恶性疟原虫抗原。在本发明的另一个实施例中，疟原虫抗原是间日疟原虫抗原。

合适地，抗原是红细胞前期抗原。

抗原可以例如选自在寄生虫的子孢子期或者其他红细胞前期例如肝脏期表达的任意抗原。例如抗原可以选自环子孢子(CS)蛋白, 肝期抗原（liver stage antigen）-1(LSA-1) (参见例如WO2004/044167), 肝期抗原-3 (LSA-3) (例如描述于EP0570489和EP0833917)，Pfs 16kD (描述于WO91/18922和EP597843), 输出抗原(Exported antigen)-1(Exp-1) (例如描述于 Meraldi 等人 2002, Parasite Immunol vol 24(3): 141)，子孢子-苏氨酸-天门冬酰胺-富集蛋白(STARP)，子孢子和肝期抗原(SALSA), 血小板反应素相关蛋白(thrombospondin related anonymous protein, TRAP) (描述于WO90/01496, WO91/11516和WO92/11868)和尖端裂殖性孢子抗原（apical merezoite antigen-1, AMA-1）(描述于EP0372019)，它们最近显示存在于肝期（除红细胞内期之外）。所有这些抗原都是本领域公知的。抗原可以是完整的蛋白或其免疫原性片段或者上述任一种的衍生物。疟疾抗原的免疫原性片段是公知的，例如AMA-1的胞外域（例如描述于WO02/077195）。衍生物包括例如与其他蛋白融合，其他蛋白可以是疟疾蛋白或者非疟疾蛋白例如HBsAg。本发明的衍生物能够激发抵御天然抗原的免疫应答。

疟原虫抗原可以与乙型肝炎的表面抗原（HBsAg）融合。

本发明使用的一种具体抗原来源于环子孢子(CS)蛋白，可以采用与HBsAg杂合蛋白的形式。抗原可以是完整的CS蛋白或者其一部分，包括CS蛋白的一个片段或者一些片段，其中这些片段可以融合。

基于 CS 蛋白的抗原可以采用杂合蛋白的形式，包括基本上全部的疟原虫CS蛋白C末端部分，4个或者更多CS蛋白免疫显性区的串联重复，和乙型肝炎表面抗原（HBsAg）。杂合蛋白可以包括一个包含至少160个氨基酸并且基本上与CS蛋白的C末端部分同源的序列。特别的，“基本上全部”CS蛋白的C末端部分包括缺少疏水性锚定序列的C末端。此外，就恶性疟原虫的抗原而言，它包括4个或者更多，例如10个或者更多，Asn-Ala-Asn-四肽重复模体。CS蛋白可以缺失C末端最后12个氨基酸。

本发明使用的杂合蛋白可以是包括恶性疟原虫 CS 蛋白一部分的蛋白，CS 蛋白的这个部分基本上对应于恶性疟原虫 3D7 克隆的 207-395 位氨基酸，来自通过线性接头与 HBsAg 的 N 端符合读框地（in frame）融合的 NF54 株（Caspers，1989）。接头可以包括来自 HBsAg 的 preS2 的一部分。

本发明使用的 CS 构建体概述于 WO93/10152。一种特异的构建体是称为 RTS 的杂合蛋白，在 WO93/10152（其中它被标注为 RTS*）和 WO98/05355 中有描述，这两篇在此整体引入作为参考。

本发明使用的特异杂合蛋白是称为 RTS 的杂合蛋白，RTS 由下列物质组成：

• 得自酿酒酵母（Sacchromyes cerevisiae）TDH3 基因序列的 1059 到 1061 位核苷酸编码的甲硫氨酸残基。(Musti, 1983)。

• 得自用于构建杂交基因的克隆过程产生的核苷酸序列（1062 到 1070）的 3 个氨基酸，Met Ala Pro。

• 核苷酸 1071 到 1637 位编码的 189 个氨基酸的一段序列，代表恶性疟原虫 3D7 株的环子孢子蛋白（CSP）的 207 到 395 位氨基酸（Caspers，1989）。

• 用于构建杂交基因的克隆过程编码的核苷酸 1638 到 1640 位的氨基酸（Gly）。

• 1641 到 1652 位核苷酸编码的 4 个氨基酸，Pro VaI Thr Asn，代表乙型肝炎病毒 adw 血清型）pres2 蛋白的 4 个羧基末端残基（Valenzuela，1979）。

• 核苷酸 1653 到 2330 位编码的 226 个氨基酸的一段序列，指定是乙型肝炎病毒（adw 血清型）的 S 蛋白。

RTS 可以是 RTS,S 混合颗粒的形式。

RTS,S 颗粒包括两个多肽 RTS 和 S，RTS 和 S 可以同时合成并自发形成组合微粒结构（RTS,S），例如在纯化期间。

RTS 蛋白可以在酵母，例如酿酒酵母（*S.cerevisiae*）中表达。 在这类宿主中，RTS 将表达为脂蛋白颗粒。受体酵母菌株可以在其基因组中携带乙型肝炎 S 表达盒的几个整合拷贝。所获菌株因此合成两个多肽：S 和 RTS，这两个多肽自发地共组装成混合（RTS，S）脂蛋白颗粒。这些颗粒可以在它们的表面呈现杂交分子的 CSP 序列。这些混合颗粒中的 RTS 和 S 可以特定比例存在，例如 1:4。

在本发明中其他疟疾抗原或者其片段或其衍生物的用途也包括在本发明范围内。其他的红细胞前期抗原例如 AMA-1，LSA-1，LSA-3（例如描述于EP0570489 和 EP0833917）和 Pfs 16kD，可以与 RTS,S 联用。此外，RTS,S 与血液期抗原例如裂殖性孢子表面蛋白-1（MSP-1）（例如描述于 US4,837,016）、红细胞结合抗原-175（EBA-175）或者 MSP一3(例如描述于 EP0666916)联用。

本文所述的任意抗原的免疫原性片段将包括至少一个抗原表位，并显示疟疾抗原性，当存在于合适构建体，例如融合到其他疟疾抗原或者其他非抗原或者存在于载体时，能够激发免疫应答，该免疫应答针对天然抗原。通常免疫原性片段包括来自疟疾抗原的至少 20，或者至少 50，或者至少 100 个连续氨基酸。

本文所述的抗原或其片段的衍生物类似地将包括至少一个抗原表位，并显示疟疾抗原性，能够激发免疫应答，该免疫应答针对天然抗原。衍生物包括例如疟疾抗原与另一种蛋白的融合，该蛋白可能是也可能不是另一种疟疾蛋白，可以是例如 HBsAg。

根据本发明，纯化的杂合蛋白水溶液可以直接使用，并与本发明的合适佐剂组合。或者，该蛋白可以在与佐剂混合前冻干。佐剂可以是一种液体，因此可用于将抗原重组成液体疫苗形式。

因此本发明还提供如本文所述的疟原虫抗原或者其免疫原性片段或其衍生物和佐剂在制备用于免疫到流行区的旅行者以抵御疟疾感染的试剂盒中的用途，所述佐剂是包括脂质 A 衍生物和皂苷的脂质体制剂，其中提供的抗原是冻干形式，抗原和佐剂在施用前混合。

根据本发明的疫苗剂量可以在每剂量 1-100 微克 RTS,S 之间，例如 25 到 75 微克 RTS,S，例如一次剂量 50 微克 RTS,S，其可以存在于 500 微升中（最终液体制剂）。这是供成人使用的合适剂量。供儿童使用的合适剂量是成人剂量的一半，即 25 微克 RTS,S，其可以存在于 250 微升中（最终液体制剂）。相似的剂量可以用于其他抗原。

本发明的抗原与佐剂组合，所述佐剂是包括脂质 A 衍生物和皂苷的脂质体制剂。

本发明的合适佐剂是来自任意来源的脱毒脂质 A 和脂质 A 的无毒衍生物，它是 Th1 细胞应答的优选刺激剂（本文也称为 Th1 型应答）。

免疫应答可以大致分为两个大类，体液或者细胞介导的免疫应答（通常分

别表征为保护的抗体机制和细胞效应机理）。这些类型的应答被称为 Th1 型应答（细胞介导的应答）和 Th2 型免疫应答（体液应答）。

极端 Th1 型免疫应答可以表征为抗原特异的、单倍型限制的细胞毒 T 淋巴细胞和天然杀伤细胞应答的产生。在小鼠中，Th1 型应答通常表征为 IgG2a 亚型抗体的产生，而在人中这些对应于 IgG1 型抗体。Th2 型免疫应答表征为一系列免疫球蛋白同种型的产生，包括小鼠中的 IgG1。

人们认为这两种类型免疫应答发展背后的推动力是细胞因子。高水平的 Th1 型细胞因子倾向于诱导针对给定抗原的细胞介导的免疫应答，而高水平的 Th2 型细胞因子则倾向于诱导针对抗原的体液免疫应答。

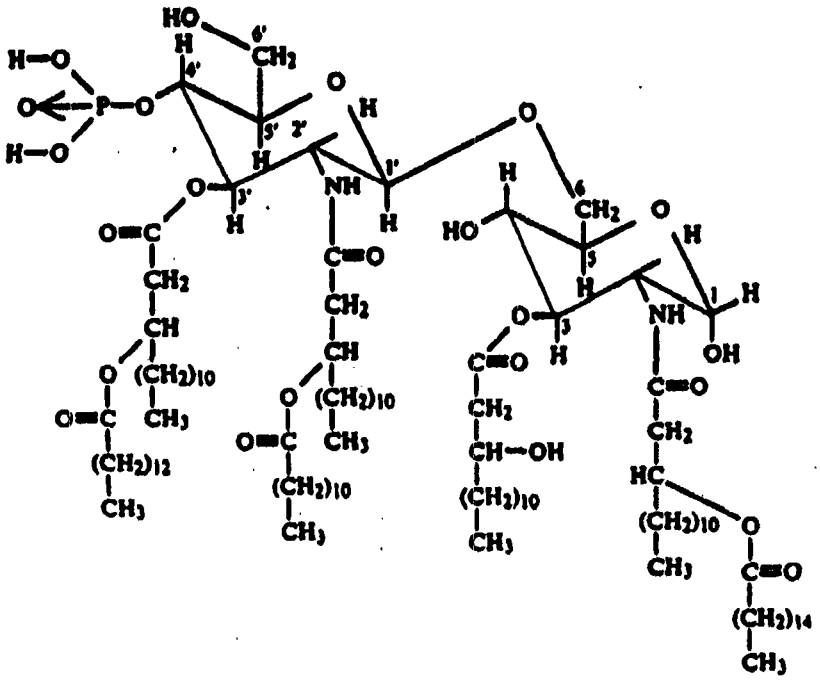
Th1 和 Th2 型免疫应答的区别不是绝对的，可以采取这两种极端间的连续形式。实际上，个体将支持被描述为主要的 Th1 或者主要的 Th2 的免疫应答。但是，常常方便的依据 Mosmann 和 Coffman 在小鼠 CD4+ve T 细胞克隆中的描述来考虑细胞因子家族（Mosmann，1989）。通常，Th1 型应答与 T 淋巴细胞产生的 INF-γ 细胞因子有关。通常与 Th1 型免疫应答的诱导直接相关的其他细胞因子不是由 T 细胞产生的，例如 IL-12。相反，Th2 型应答与 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 和肿瘤坏死因子-β (TNF-beta)的分泌相关。

众所周知某些疫苗佐剂特别适合于刺激 Th1 或者 Th2 型细胞因子应答。通常，疫苗接种或者感染后免疫应答 Th1:Th2 平衡的指示包括，体外抗原再刺激后 T 淋巴细胞产生 Th1 或者 Th2 细胞因子的直接测量，和/或抗原特异抗体应答的 IgGl:IgG2a 比例的检测（至少在小鼠中）。

因此，Th1 型佐剂是一种刺激独立 T 细胞群在接受体外抗原再刺激后产生高水平的 Th1 型细胞因子的佐剂，该佐剂还诱导与 Th1 型同种型相关的抗原特异免疫球蛋白应答。

能够优先的刺激 Th1 细胞应答的佐剂描述于 WO94/00153 和 WO95/17209。

很早就已经知道肠道菌脂多糖（LPS）是免疫系统的有效刺激剂，虽然因为毒性其作为佐剂的用途已经减少。通过从还原端葡糖胺去除核心糖类基团和磷酸酯产生的 LPS 的无毒衍生物，单磷酸脂 A（MPL），已经有相关报道（Ribi，1986），并具有下列结构：



MPL 的其他脱毒形式源自从二糖骨架的 3-位置去除酰基链，被称为 3-O-脱酰基单磷酸脂 A（3D-MPL）。可以根据 GB2122204B 教导的方法纯化和制备 3-O-脱酰单磷酸脂 A，该参考文献还公开了二磷酸脂 A 和其 3-O-脱酰变体的制备。

本发明使用的 3D-MPL 的特殊形式是乳剂形式，其微粒直径小于 0.2 微米，WO94/21292 公开了其制备方法。WO98/43670 已经描述了包括单磷酸脂 A 和表面活性剂的水剂。

本发明使用的细菌脂多糖来源的佐剂可以从细菌来源纯化和制备，或者它们也可以是合成的。例如，Ribi 等人（Ribi，1986）描述了纯化的单磷酸脂 A，GB2220211 和 US4912094 描述了来源于沙门氏菌（*Salmonella sp*）的 3-O-脱酰单磷酸或者二磷酸脂 A 。其他纯化和合成的脂多糖也已经有描述(Hilgers，1986；Hilgers，1987；EP0549074B1）。本发明使用的一个特异细菌脂多糖是 3D-MPL。

因此，可用于本发明的 LPS 衍生物是那些与 LPS 或者 MPL 或者 3D-MPL 结构相似的免疫刺激剂。在另一种选择中，LPS 衍生物可以是酰化单糖，这是 MPL 上述结构的亚基。

皂苷也是 Th1 免疫刺激剂。皂苷是公知的佐剂（Lacaille-Dubois，1996）。本发明使用的合适皂苷包括免疫活性皂苷，例如，Quil A（来源于南美 Quillaja Saponaria Molina 树的树皮），及其免疫活性部分，描述于 US5,057,540 和“Saponins

as vaccine adjuvants”（Kensil，1996）和 EP0362279B1。溶血皂苷 QS21 和 QS17（Quil A 的 HPLC 纯化部分）已经被描述为有效的全身性佐剂，美国专利号 5,057,540 和 EP0362279B1 公开了它们的生产方法。这些参考文献还描述了 QS7（Quil-A 的非溶血部分）的用途，QS7 是全身性疫苗的有效佐剂。Kensil 等人（Kensil，1991）也描述了 QS21 的用途。QS21 和聚山梨酯 80 或者环糊精的组合也是已知的（WO99/10008）。WO96/33739 和 WO96/11711 描述了包括 QuilA 部分例如 QS21 和 QS7 的微粒佐剂系统。

用于本发明的上述脂多糖和皂苷免疫刺激剂与脂质体载体一起配制。例如，如 WO96/33739 所述，载体可以由含有胆固醇的脂质体组成。

单磷酸脂 A 和皂苷衍生物的组合描述于 WO94/00153；WO95/17210；WO96/33739；WO98/56414；WO99/12565；WO99/11241，QS21 和 3D-MPL 的组合公开于 WO94/00153。

因此，本发明使用的合适佐剂系统包括，例如，单磷酸脂 A，例如 3D-MPL，与皂苷衍生物的组合，尤其是 WO94/00153 公开的 QS21 和 3D-MPL 的组合。佐剂系统包括脂质体载体，例如含有胆固醇的脂质体，例如 WO96/33739 公开的在组合物中，QS21 在含有胆固醇的脂质体（DQ）中被淬灭。

因此如 WO96/33739 所述，皂苷例如 QS21 可能存在于脂质体膜上或者与脂质体膜结合。3D-MPL 或者其他脂质 A 衍生物可以固定于脂质体膜，或者出现在脂质体外，或者两种情况都存在。本发明使用的一种特殊佐剂包括两种免疫刺激剂 QS21 和 3D-MPL，在含有胆固醇的脂质体制剂中，其中 3D-MPL 位于脂质体内，而 QS21 与脂质体结合。

选择各个疫苗剂量中存在的本发明蛋白的量为诱导免疫保护应答而没有典型疫苗中显著不良副作用的量。这种量将根据所使用的具体免疫原和具体佐剂而不同。通常，可以预期每次剂量将含有 1-1000 微克蛋白，例如 1-200 微克，例如 10-100 微克。特殊疫苗最适量可以通过标准研究确定，包括观察受试者的抗体滴度和其他应答来确定。

本发明使用的合适免疫方案是到疟疾流行区旅行前的初始免疫，这可以在到达该区域前例如至少 2-4 周完成。这个初始免疫可能包括 1 到 3 次剂量，例如 2 次或者 3 次剂量，在施用各次剂量之间间隔至少 7 天，或者 1 到 4 周之间或者例如 1 个月。只要感染风险仍然存在，在初始免疫后，可以每隔 6 个月重复加

强。在反复到流行区旅行前进行周期性加强免疫是合适的。每次剂量中 RT5,S 蛋白的合适量如本文上面所述。

本发明的疫苗可以通过任意各种途径施用，例如口服的、局部的、皮下的、粘膜的（通常阴道内的）、静脉的、肌肉的、鼻内的、舌下的、真皮内的和通过栓剂。

本发明还可用于异源初始-加强（prime-boost）疗法。

替代或者除了包含 RTS,S 或者其他多肽的组合物的重复剂量之外，不同形式的疫苗可以采用异源“初始-加强”免疫方式施用。初始组合物和加强组合物应具有至少一个共同抗原，尽管它不需要是相同形式的抗原；它可能是相同抗原的不同形式。

本发明的初始-加强免疫可以利用蛋白和多核苷酸的组合进行，尤其是基于 DNA 的制剂。这样一个策略被认为可有效诱导广谱免疫应答。佐剂化蛋白疫苗主要诱导抗体和 T 辅助免疫应答，而作为质粒或者活载体输送的 DNA 诱导强的细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）应答。因此，蛋白和 DNA 免疫的组合可适用于广谱的免疫应答。

因此本发明还提供如本文所述的疟原虫抗原或者其免疫原性片段或其衍生物和佐剂，以及编码疟原虫抗原或者其免疫原性片段或其衍生物的多核苷酸，在制备用于免疫到流行区的旅行者以抵御增殖性疟疾感染的试剂盒中的用途，所述佐剂是包括脂质 A 衍生物和皂苷的脂质体制剂。

本发明还提供一种试剂盒，包括以冻干形式提供的疟原虫抗原或者其免疫原性片段或其衍生物，包括脂质 A 衍生物和皂苷的脂质体剂型的佐剂，和说明书，该说明书详细说明在施用到流行区的旅行者前将抗原、佐剂和可选的载体混合，从而保护所述旅行者免于增殖性疟疾感染。

因此当 RTS,S 或者另一种基于 CS 蛋白的多肽被用作初始-加强疗法的多肽组分时，多核苷酸组分将编码 CS 蛋白或者其免疫原性片段或其衍生物。

DNA 可以作为裸 DNA 例如质粒 DNA 输送，或者采用重组活载体的形式。本发明使用的活载体可以是复制缺陷型的。可使用活载体的实例是痘病毒载体，包括修饰的痘病毒载体，例如修饰的病毒安卡拉（Modified Virus Ankara，MVA），甲病毒载体例如 Venezuelian Equine Encephalitis 病毒载体，或者腺病毒载体例如非人类腺病毒载体例如黑猩猩腺病毒载体，或者任意其他合适的活载体。

在本发明初始-加强疫苗中作为活载体使用的合适腺病毒是一种低血清阳性率的人腺病毒，例如 Ad5 或者 Ad35，或者非人类起源腺病毒例如非人类灵长类动物腺病毒例如猿腺病毒。载体可以是复制缺陷型的。通常这些病毒含有 E1 缺陷，可以在转化了 E1 基因的细胞系中生长。合适的猿腺病毒是从黑猩猩分离的病毒。尤其是，C68 (也称为 Pan 9) (参见美国专利号 6083716)和 Pan 5, 6 和 Pan 7 (WO 03/046124)也可在本发明中使用。因此可以对这些载体进行操作以插入本发明的异源多核苷酸，以便能够表达本发明的多肽。这类重组腺病毒载体的使用、制剂和制备详细描述于 WO03/046142。

可以在注射蛋白抗原一次或者数次后，施用一次或者多次 DNA，或者首先施用一次或者多次 DNA，然后进行一次或者多次蛋白免疫。首先施用 DNA，然后施用蛋白可能是有益的。

因此本发明初始-加强免疫的一个特定实施例涉及用单一剂量的多核苷酸初始免疫，该多核苷酸采用例如上述任意的重组活载体形式，然后使用一次或者多次剂量的，例如 2 次或者 3 次剂量的，佐剂化蛋白例如 RTS,S 与本文描述的佐剂加强免疫。该多核苷酸编码相同的蛋白（例如 CS 蛋白）或者其免疫原性片段或其衍生物。

因此本发明还提供一种药物试剂盒，包括：

a) 疟原虫抗原或者其免疫原性片段或其衍生物和佐剂，所述佐剂是包括脂质 A 衍生物和皂苷的脂质体制剂，和

b) 编码疟原虫抗原或者其免疫原性片段或其衍生物的多核苷酸；

其中 a)和 b)可以按任意次序顺序使用，但特别的，其中 b)被用作初始而 a)被用作加强。本发明还提供所述试剂盒的说明书，说明关于 a)，在给到流行区的旅行者施用前，混合抗原、佐剂和可选的载体。

组合物 a）可以是在本文所述合适佐剂中的任意本文所述多肽组合物。例如 a)可以是包括 RTS,S 和佐剂的组合物，所述佐剂是包括 QS21 和 3D-MPL 的脂质体制剂，和 b)可以是本文描述的活载体例如腺病毒载体，例如黑猩猩腺病毒载体，编码 CS 蛋白或者其免疫原性片段或其衍生物。

初始组合物和加强组合物可以施用不止一次剂量。此外，初始引发和加强剂量后可以采用更高的剂量，这可以交替以产生例如 DNA 初始/蛋白加强/更高的 DNA 剂量/更高的蛋白剂量。

本发明使用的合适的药学上可接受的稀释剂或者赋形剂是本领域公知的，包括例如水或者缓冲液。疫苗制备方法被广泛报道（Powell，1995；Voller，1978）。例如 Fullerton，美国专利 4,235,877 描述了脂质体内的包裹。例如 Likhite，美国专利 4,372,945 和 Armor 等人，美国专利 4,474,757 公开了蛋白与高分子的结合。

在另一方面，本发明提供一种在给个体施用疟疾抗原组合物，尤其是红细胞前期疟疾抗原组合物后，检测个体是否预防疟疾的方法，该方法包括检测个体中激发的疟疾抗原特异的 CD4 T 细胞水平。本发明还提供一种在给个体施用疟疾抗原组合物，尤其是红细胞前期疟疾抗原组合物后，检测个体是否预防疟疾的方法，该方法包括检测个体中激发的疟疾抗原特异的抗体浓度。

在另一方面，本发明提供一种评价候选疫苗，尤其是红细胞前期候选疫苗，预防疟疾的效果的方法，该方法包括检测个体中激发的抗候选疫苗的 CD4 细胞水平。在另一方面，本发明提供一种评价候选疫苗，尤其是红细胞前期特异抗体候选疫苗，预防疟疾的效果的方法，该方法包括检测个体中激发的抗候选疫苗的特异抗体浓度。在更具体的实施例中，这类疫苗包括疟原虫抗原或者其免疫原性片段或其衍生物和佐剂，所述佐剂是包括脂质 A 衍生物和皂苷的脂质体制剂。

实施例

实施例 1：使用 RTS,S 和佐剂 B 的免疫和实验性疟疾攻击。

疫苗

RTS,S：RTS 是含 424 个氨基酸（a.a.)的 51 kDa 杂合多肽链，由来源于疟疾寄生恶性疟原虫 NF54 株（CSP 抗原，氨基酸 207 到 395）的子孢子表面抗原（CS 蛋白中心串联重复和羧基末端区域，总共 189 个氨基酸）融合到乙型肝炎病毒 S 蛋白的氨基末端组成。S 是对应于乙型肝炎病毒表面抗原（HBsAg）的 24 kDa 的多肽（长 226 氨基酸），用作 GSK Biologicals Engerix-B®疫苗中的抗原。

这两个蛋白在酵母（酿酒酵母（*S. cerevisiae*））胞内产生，自发组装成混合聚合微粒结构，该微粒结构估计包含大约 100 个多肽。

WO93/10152 描述了 RTS,S 的制备。

RTS,S/AS02A (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium)的完整剂量，包含构建于 500 微升 AS02A 佐剂-水包油乳剂中的 50 微克冻干 RTS,S 抗原，AS02A 佐剂-水包油乳剂包含免疫刺激剂 3D-MPL®(GlaxoSmithKline Biologicals,

Montana, USA)和 QS21 各 50 微克。

RTS,S/佐剂 B (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium)的完整剂量，包含构建于 500 微升佐剂 B 中的 50 微克冻干 RTS,S 抗原，佐剂 B 是包含免疫刺激剂 3D-MPL®(GlaxoSmithKline Biologicals, Montana, USA)和 QS21（各 50 微克)的含有胆固醇的脂质体制剂。可以从有机溶剂中的脱油磷脂酰胆碱(DOPC)、胆固醇和 3D-MPL 的混合物制备脂质体，其中混合物被脱水。然后添加水溶液以悬浮脂质。悬浮液被微流体化（microfluidised），直到脂质体大小缩小到可以无菌地通过 0.2μm 滤器。通常胆固醇：磷脂酰胆碱比例是 1:4（w/w），添加水溶液到最终胆固醇浓度为 5 到 50 毫克/毫升。添加 QS21 到包含胆固醇的脂质体中。

方法

该临床试验评价一种疟疾疫苗的安全性，致反应力，免疫原性和初步效果，所述疟疾疫苗包含抗原 RTS,S 并添加 AS02A 或者佐剂 B。

103 位受试者被分为两组，根据 0、1、2 个月免疫方案随机接种 3 次剂量的任一疫苗。因为涉及大量受试者，所招募的各组依次接受抗原攻击。

各个组中，第 3 次剂量后，志愿者被要求接受标准化初始疟疾攻击（Chulay，1986）2 到 4 周。初始攻击包括让 5 只感染恶性疟原虫子孢子的斑须按蚊（*Anophelese stevensi* mosquitos）对攻击志愿者叮咬 5 分钟。每组中，12 个未免疫的对照志愿者也被攻击。

在初始攻击大概 6 个月后，在初始攻击中受到保护的志愿者被要求接受重复攻击。在攻击之间没有施用额外剂量的疫苗。重复攻击按照初始攻击的方式进行。每组中，6 个未免疫对照志愿者也被攻击。

在每次攻击后的至少 30 天内，每天检测受试者是否被疟疾感染。检测感染的主要方法是鉴定Giesma染色外周血涂片，通过光学显微镜检测无性期寄生虫。这表示受试者已经遭受增殖性感染，寄生虫已经从肝脏释放并进入红细胞内期。因此没有实现抵御攻击的无菌保护。一旦出现感染症状时，受试者被宣布为疟疾阳性的，接受治疗量的氯喹。主要疗效体现为无菌保护，即受试者从不发生无性期寄生虫血症（parasitaemia）。此外，记录在攻击和那些未被完全保护的受试者中出现寄生虫血症之间的时间。

此外，在免疫前、II 次免疫后 2 周和 III 次免疫后 14-28 天(攻击日期：DOC)，

收集外周血单核细胞（PBMC）样品。

通过细胞因子流式细胞仪，检测PBMCs样品中的CD4和CD8 T细胞应答。流式细胞技术可以对给定抗原特异的T细胞定量。在对细胞表型进行常规免疫荧光标记以及产生胞内细胞因子后，通过流式细胞仪计数抗原特异的CD4和CD8 T细胞。简单来说，当与其相应抗原孵育时，外周血中抗原特异的CD4和CD8 T细胞可以在体外被再次刺激，产生IL-2、CD40L、TNF-α或者IFN-γ。肽的HBs（乙型肝炎表面抗原）和CSP库都可用作再刺激抗原特异T细胞的抗原。结果可以表示为CD4或者CD8 T细胞亚群中表达CD40L、IL-2、TNF-α或者IFN-γ中至少两个不同细胞因子的CD4或者CD8 T细胞的表达频率。

利用重组蛋白R32LR作为捕获抗原的标准ELISA方法检测对恶性疟原虫CS重复区的抗体（IgG）应答，确定抗体水平。简单的说，在96孔板上包被R32LR蛋白[对应于恶性疟原虫环子孢子蛋白（CSP）的重复区（NANP）]。在板被饱和后，直接向板上添加血清样品的连续稀释液。血清样品中的R32LR抗体将结合预包被的R32LR。洗板。添加过氧化物酶标记的山羊抗人IgG(γ)，它将结合抗CS IgG抗体。在另一个洗涤步骤后，过氧化物酶特异生色底物的添加提供一种检测与预包被抗原结合的抗CS IgG的方法。过氧化物酶催化显色反应。形成的颜色强度与血清中含有的抗CS IgG抗体的滴度成正比。相对每块板上的已知的血清标准确定抗重复抗体水平，表示为微克/毫升。

结果

组1：

佐剂	接受免疫的志愿者数目	接受攻击的志愿者数目（受保护的数目）	接受再攻击的志愿者数目（受保护的数目）
佐剂B	26	17 (10)	5 (3)
AS02A	25	24 (9)	5 (1)
TOTAL:	51	41	10

组2：

佐剂	接受免疫的志愿者数目	接受攻击的志愿者数目（受保护的数目）	接受再攻击的志愿者数目（受保护的数目）
佐剂B	数字未提供	19（8）	未进行
AS02A	数字未提供	20（5）	未进行
总数：	52	39	

对于初始攻击的组1 & 2组合：

佐剂	接受免疫和攻击的志愿者数目（初始攻击）	受保护的志愿者数目	受感染的志愿者数目	疫苗有效率
佐剂B	36	18	18	50%
AS02A	44	14	30	32%

因此在这项试验中，佐剂B能够更有效的保护未接触过疟疾的个体抵御疟疾感染。佐剂B组50%的受攻击个体得到保护，AS02A组32%的受攻击个体得到保护。这代表两种佐剂间保护的提高超过50%。

此外，在组1中，发现佐剂B比AS02A能够更高效的诱导针对RTS，S中抗原的CD4 T细胞应答（图1，p=0.01663）。组1和2的组合数据是不显著的（图2，p＝0.07）。

在免疫前，没有可检测的针对HBs或者CSP的CD4/CD8 T细胞应答。与此相反，在II次免疫后2周以及III次免疫后2周（DOC：攻击日期），在大多数接种两种制剂的个体中发现HBs和CSP特异的CD4 T细胞。在相同时间点，没有观察到可检测的CD8 T细胞应答。这些观察证明用于T细胞免疫监控的方法是特异和敏感的，而这是在接受不同疫苗制剂的组间进行正式比较的前提条件。

图1显示在II次免疫后和III次免疫后2周（DOC），组1中接种RTS,S/佐剂B的个体相对那些接种RTS,S/AS02A的个体具有更高频率的CSP特异的

CD4 T 细胞。对 HBs 特异的 CD4 T 细胞可以得出相似的结论，该细胞在 II 次免疫后 2 周产生 IFN - γ 和另一种来自 IL-2、CD40L、TNF-α 其中之一的细胞因子（数据未显示）。

图 2 显示和图 1 相同的研究，只是其包含两组的数据。

在图 1 和 2 中，结果可以表示为 10^6 个 CD4 T 细胞中表达 CD40L、IL-2、TNF-α 或者 IFN-γ 中至少两个不同细胞因子的 CD4 T 细胞的表达频率。

在抗 CSP 特异抗体应答中可以看到相似的图象。从图 5 可知 RTS,S/佐剂 B 激发的抗体浓度显著大于 RTS,S/AS02A 激发的浓度（特别参见 DOC－III 次免疫后 2 周（P=0.00793），但 II 次免疫后 2 周的效果显著）。结果表示为几何平均浓度（GMC）。前（Pre）是指施用任意剂量前的起始时间点。

M1 是指第一次剂量后 2 周的时间点。

M2 是指第二次剂量后 2 周的时间点。

DOC 是指“攻击的日期”，是第三次剂量后 2 周。

抵御疟疾攻击的保护与显著更高的 CD4 T 细胞应答和对 CSP 的特异抗体应答有关。

RTS,S/佐剂 B 相对 RTS,S/AS02A 免疫原性的增强并不一定表示它将转化成生物相关的效果。但是，本试验中接种 RTS,S/佐剂 B 的个体（36 位个体中的 18 位：50％）相对那些接种 RTS,S/AS02A 的个体（44 位个体中的 14 位：32%），显示抵御疟疾攻击保护水平的提高。因此发现了 CD4 T 细胞应答变幅和对疟疾的防护之间的可能联系。

如果上述假设成立，受保护的个体比接种 RTS,S/AS02A 或者甚至比 RTS,S/佐剂 B 的个体具有更高的 CD4 T 细胞应答。分别针对第 1 组和合并组（和两个佐剂组库）的图 3 和 4，明确的证实了上述假设，并支持以下观点，即 CSP 特异的 CD4 T 细胞在保护作用中起重要作用。与此一致，对 II 次免疫后 2 周以及 III 次免疫后 2 周收集样品的统计分析证明受保护和未受保护的个体间频率的差异是统计上有显著意义的。

在图 3 和 4 中，结果可以表示为 10^6 个 CD4 T 细胞中表达 CD40L、IL-2、TNF-α 或者 IFN-γ 中至少两个不同细胞因子的 CD4 T 细胞的表达频率。免疫原性分析还显示，与 CSP 特异的 CD4 T 细胞相反，HBs 特异的 CD4 T 细胞与 II 次免疫后 2 周以及 III 次免疫后 2 周的抵御疟疾的保护作用无关（分别为 p=0.14

和 p=0.053）。这进一步证实了上述结果的可靠性，强烈表明保护作用是与能够识别 CSP 而不是 HBs 肽的 CD4 T 细胞的存在特异相关的。

最后，因为没有可检测的 CD8 T 细胞应答，还可以得出结论，即最有可能的是，用佐剂 B 或者 AS02A 佐剂化的 RTS,S 引发的疟疾红细胞前期保护不像是因为免疫后 CSP 特异的 CD8 T 细胞的诱导造成的。

在监控抗 CSP 抗体应答中可以观察到相似的图象。图 6 显示受保护和未受保护个体中的抗体浓度（结果涉及使用两种佐剂组库的两个组）。很明显那些受保护的个体比那些未受保护的个体显示明显更高的抗体浓度（P<0.0001）。

讨论

上述结果一方面清楚表明 CSP 特异的 CD4 T 细胞和抗体应答之间的关联，另一方面表明存在抵御疟疾攻击的保护状态。CSP 特异的 CD4 T 细胞或者抗体产生抵御寄生效果的机制还是未知的。但是，分析还是清楚地鉴定出少数未受保护的个体具有高 CD4 T 细胞或者高抗体应答。这表明仅由对 CSP 的强 CD4 T 细胞应答或者高抗体应答不能预示抵御疟疾攻击的保护作用。

已经开发出不同的监控 T 细胞应答的技术，例如淋巴细胞增殖（lymphoproloferation）、细胞因子分泌、四聚体染色（tetramer staining）、Elipsot 或者细胞因子流式细胞术。基于良好的重复性/重现性数据以及相关标记物检测 (CD4, CD8, CD40L, IL-2, TNF, IFNg)，最近后者被选为先导技术。此外还鉴定了一种特异的分析方法学，这解决了细胞因子流式细胞术方法中常见的高背景问题。本文证明了在人临床试验中利用细胞因子流式细胞术稳定监控 T 细胞应答的可行性。此外，它还证明了有可能鉴定不是与体液免疫直接相关的保护标记物。

尽管已经证明佐剂 B 比 AS02A 制剂能够明显更有效的诱导 CSP 特异的 CD4 T 细胞和抗体，但 CD4 T 细胞频率和抗体浓度的差异是相对适中的，可以得出结论，即它们不是生物相关的。该临床试验中获得的数据允许利用抵御疟疾的数据作为生物相关标记物正式鉴定这类差异的生物关联性。分析清楚地显示，佐剂之间关于 T 细胞频率和抗体浓度的适中但显著的差异转化为显著地更高程度的抵御疟疾攻击的保护作用。

参考文献

- Alonso P 等人(2004) *Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against Plasmodium falciparum infection and disease in young African children: randomised controlled trial.* Lancet Oct;364:1411-1420.
- Alonso 等人(2005) *Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of Plasmodium falciparum disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial.* Lancet. Dec 10;366(9502):2012-8.
- Ballou WR, Arevalo-Herrera M, Carucci D, Richie TL, Corradin G, Diggs C, 等人 (2004) *Update on the clinical development of candidate malaria vaccines.* Am J Trop Med Hyg;71(2_suppl):239-247.
- Bojang KA, Milligan PJM, Pinder M, Vigneron L, Alloueche A, Kester KE, 等人 (2001) *Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against Plasmodium falciparum infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial.* The Lancet; 358(9297):1927-1934.
- Bojang KA,, Olodude F, Pinder M, Ofori-Anyinam O, Vigneron L, Fitzpatrick S, Njie F, Kassanga A, Leach A, Milman J, Rabinovich R, McAdam KPWJ, Kester KE, Heppner DG, Cohen JD, Tornieporth N, and Milligan PJM. (2005) *Safety and immunogenicity of RTS,S/AS02A candidate malaria vaccine in Gambian children.* Vaccine 23(32):4148-57..
- Breman JG, Alilio MS, Mills A. (2004) *The intolerable burden of malaria: what's new, what's needed.* Am J Trop Med Hyg;71(2_suppl):0-i-.
- Caspers 等人(1989) *The circumsporozoite protein gene from NF54, a Plasmodium falciparum isolate used in malaria vaccine trials.* Mol. Biochem. Parasitol 35, 185-190.
- Chulay et al, (1986) *Malaria transmitted to humans by mosquitoes infected from cultured Plasmodium falciparum.* Am J Trop Med Hyg. Jan:35(1):66-8
- Doherty J, Pinder M, Tornieporth N, Carton C, Vigneron L, Milligan P, 等人 (1999) *A phase I safety and immunogenicity trial with the candidate malaria vaccine RTS,S/SBAS2 in semi-immune adults in The Gambia.* Am J Trop Med Hyg;61(6):865-868.

- Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. (2004) *The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future.* The Lancet Infectious Diseases;4(6):327-336.
- Hilgers 等人 (1986). *Synergistic effects of synthetic adjuvants on the humoral immune response.* Int.Arch.Allergy.Immunol., 79(4):392-6
- Hilgers 等人 (1987). *Synthetic sulpholipopolysaccharides: novel adjuvants for humoral immune responses.* Immunology, 60(1):141-6.
- Hoffman SL (1996) "Malaria Vaccine Development: a multi-immune response approach" Am Soc Microbiol Press Ed Hoffman SL, Chapter 3 "Attacking the infected hepatocyte"
- Kensil CR, Patel U, Lennick M, Marciani D.(1991) *Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from Quillaja saponaria Molina cortex.* J. Immunology vol 146, 431-437
- Kensil, C. R. (1996) *Saponins as vaccine adjuvants.* Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 12 (1-2):1-55
- Kester KE, McKinney DA, Tornieporth N, 等人(2001) *Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental Plasmodium falciparum malaria.* J.Infect.Dis.;183(4):640-7.
- Lacaille-Dubois, M and Wagner H.,(1996) *A review of the biological and pharmacological activities of saponins.* Phytomedicine vol 2 pp 363-386
- Lalvani A, Moris P, Voss G, 等人(1999) *Potent induction of focused Th1-type cellular and humoral immune responses by RTS,S/SBAS2, a recombinant Plasmodium falciparum malaria vaccine.* J.Infect.Dis.;180(5):1656-64.
- Macete E, Aponte JJ, Guinovart C, Sacarlal J, Mandomando I, Espasa M, 等人 *Safety, reactogenicity and immunogenicty of the RTS,S/AS02A candidate malaria vaccine in children aged 1 to 4 years in Mozambique.* Vaccine submitted.
- Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) *Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.* Annual Review of Immunology, 7, p145-173

- Musti A.M. 等人, (1983) *Transcriptional mapping of two yeast genes coding for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isolated by sequence homology with the chicken gene.* Gene 1983, 25 133-143.
- Powell and Newman (Editors) (1995) *Vaccine Design - the subunit and adjuvant approach.* Pharmaceutical Biotechnology, Vol.61, Plenum Press New York.
- Ribi等人, (1986) *Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by a structurally established nontoxic lipid A.* Immunobiology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins. Plenum Publ. Corp., NY, p407-420
- Stoute J, Slaoui M, Heppner D, Momin P, Kester K, Desmons P, 等人(1997) *A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against Plasmodium falciparum malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group.* N Engl J Med;336(2):86-91.
- Stoute, JA, Kester KE, Krzych U, Wellde BT, Hall T, White K, Glenn G, Ockenhouse CF, Garçon N, Schwenk R, Lanar DE, Momin P, Golenda C, Slaoui M, Wortmann G, Cohen J, Ballou WR. (1998) *Long Term Efficacy and Immune Responses Following Immunization with the RTS,S Malaria Vaccine.* J Infect Dis 178:1139-44.
- Sun P, Schwenk R, White K, Stoute JA, Cohen J, Ballou WR, Voss G, Kester KE, Heppner DG, Krzych U. (2003) *Protective immunity induced with malaria vaccine, RTS,S, is linked to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-specific CD4(+) and CD8(+) T cells producing IFN-gamma.* J Immunol. Dec 15; 171(12): 6961-7.
- Valenzuela P, Gray P, Quiroga M, Zaldivar J, Goodman H, Rutter W. (1979) *Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen.* Nature 280, 815 – 819.
- Voller 等人(Editor) (1978) *New Trends and Developments in Vaccines.* University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A.

<110> GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.
Cohen, Joseph

<120> 抗疟疾疫苗

<130> VB61495/PCT

<150> GB 0513421.8
<151> 2005-06-30

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 4
<212> PRT
<213> 恶性疟原虫 (Plasmodium falciparum)

<400> 1

Asn Ala Asn Pro
1

<210> 2
<211> 4
<212> PRT
<213> 恶性疟原虫

<400> 2

Asn Val Asp Pro
1

<210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> 乙型肝炎病毒

<400> 3

Pro Val Thr Asn
1

图1-针对CSP的CD4T细胞应答(第1组)

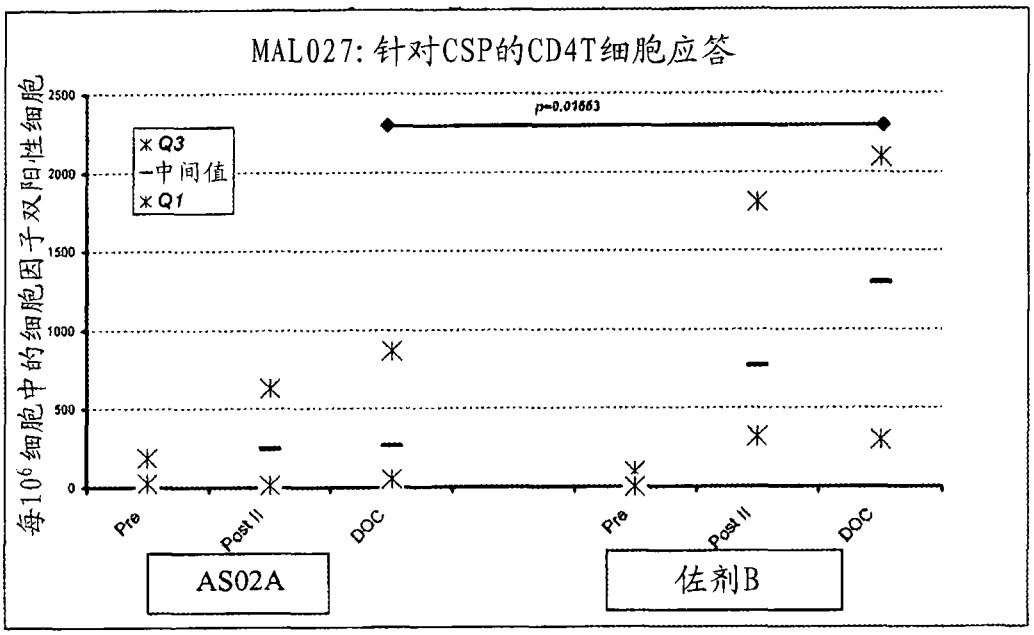


图2-针对CSP的CD4T细胞应答(两个组)

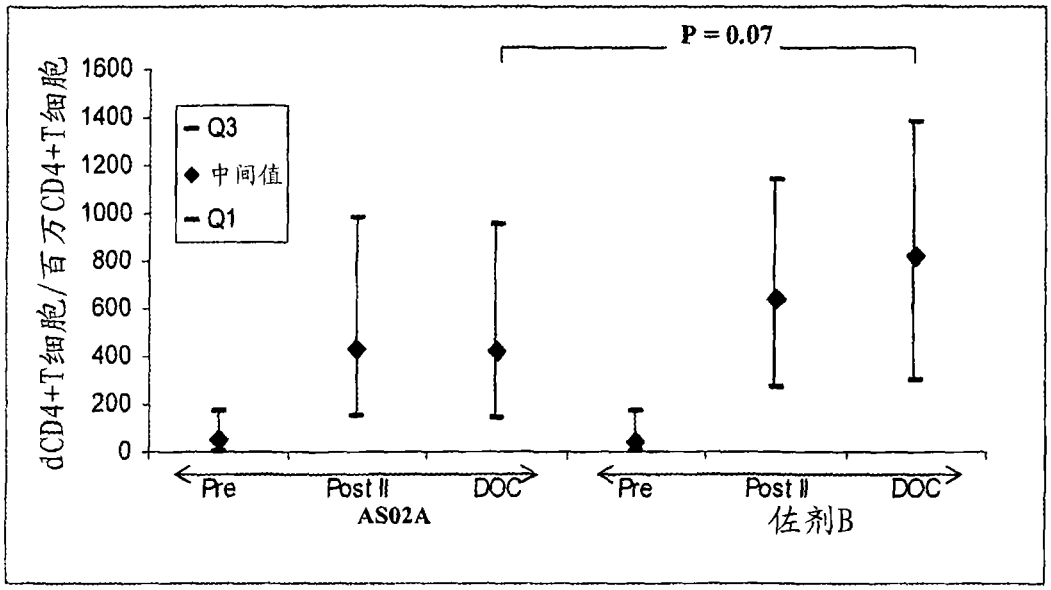


图3-针对CSP的CD4T细胞应答(第1组)

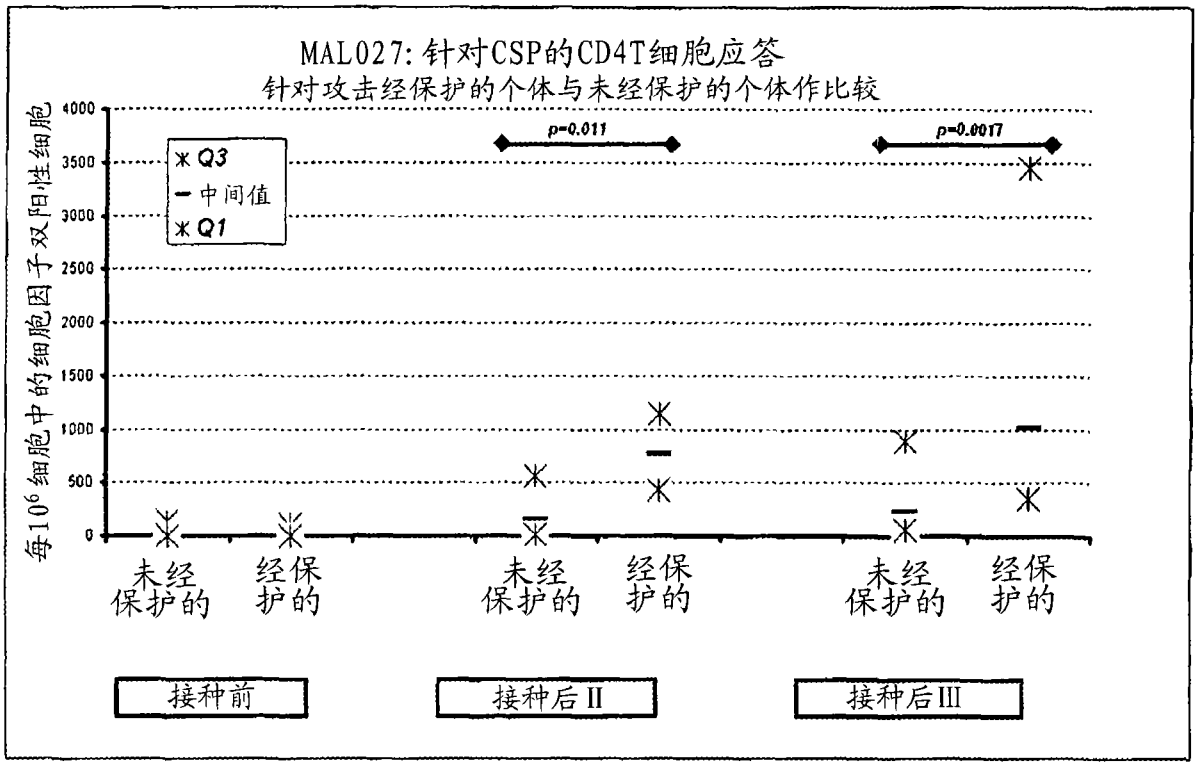


图4-针对CSP的CD4T细胞应答(两个组)

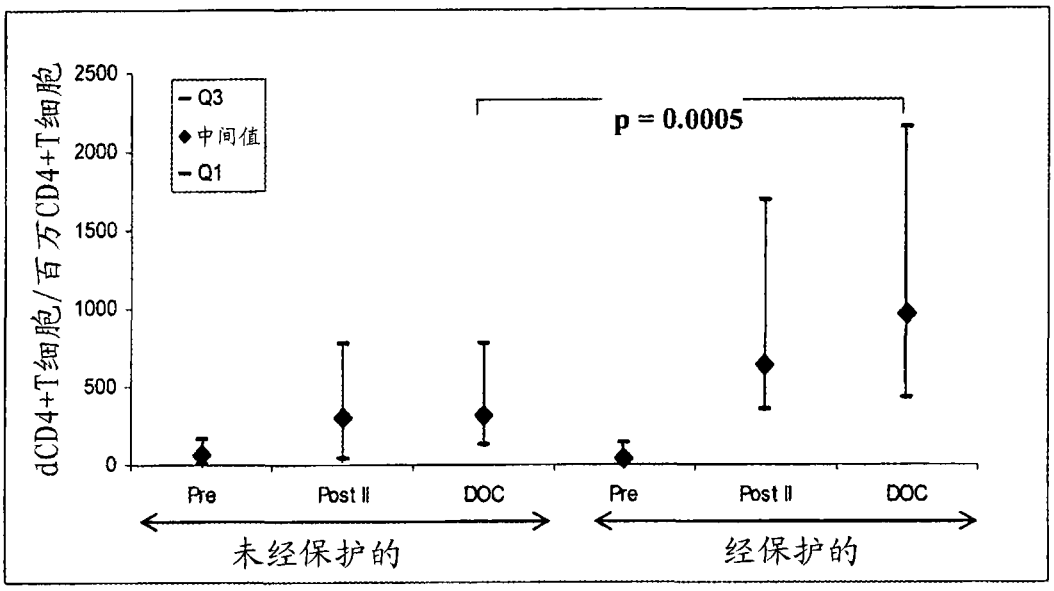


图5-抗CSP抗体应答(两个组)

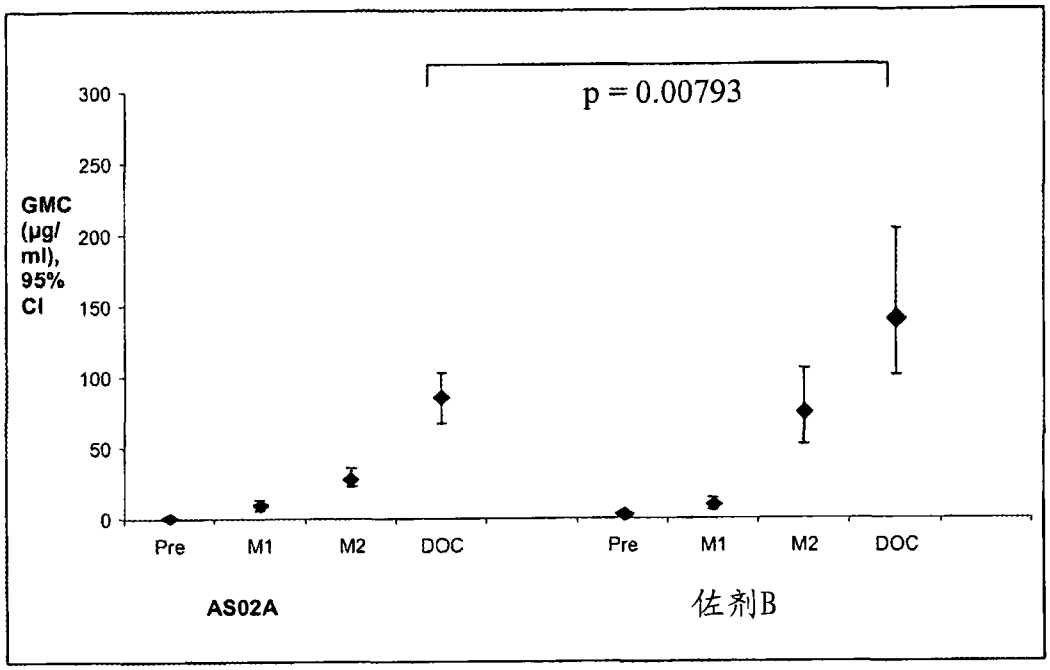


图6-抗CSP抗体应答(两个组)

