(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1708587 B
(45)授权公告日 2010.05.05

(21)申请号 03824559.0

(22)申请日 2003.09.26

(30)优先权数据
10249390.1 2002.10.23 DE

(85)PCT申请进入国家阶段日
2005.04.22

(86)PCT申请的申请数据
PCT/EP2003/010723 2003.09.26

(87)PCT申请的公布数据
WO2004/038024 DE 2004.05.06

(73)专利权人 GSF-环境与健康研究中心有限公司
地址 德国诺黑尔堡

(72)发明人 G·祖特尔 H·布雅德
N·韦斯特费尔德 缪军

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 吴亦华

(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
C12N 15/30(2006.01)
C12N 15/863(2006.01)
A61K 39/002(2006.01)
A61P 33/06(2006.01)

(56)对比文件
Shutong Yang et al.Addition of the MSA1 signal and anchor sequences tothemalaria merozoite surface antigen 1 C-terminalregionenhancesimmunogenicity when expressed byrecombinantvaccinia virus.Vaccine15 12/13.1997,15(12/13),1303页右栏末段-1304页第1段,材料和方法部分及1311页右栏末段.

审查员 潘俊宇

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 5 页

(54)发明名称

作为抗恶性疟的潜在疫苗的重组MVA株

(57)摘要

本发明涉及一种基于MVA的重组病毒,其含有至少一种编码恶性疟原虫MSP-1蛋白、其片段或其突变蛋白的核酸。更进一步提供该重组病毒的生产方法,含有病毒的疫苗及该重组病毒用于预防和/或治疗疟疾的用途。

CN 1708587 B

1. 疫苗，包含

a)MVA 的重组病毒，其包含编码一个或多个恶性疟原虫 MSP-1 蛋白片段的核酸；和

b) 药理学上相容的载体，

其中所述核酸编码的所述一个或多个 MSP-1 片段仅选自：

• p42；

• p42 和 p38；

• p83，p30，p42 和 p38。

2. 如权利要求 1 所述的疫苗，其特征在于，MSP-1 蛋白是隔离群 3D7 的 MSP-1 蛋白或 FCB1 株的 MSP-1 蛋白。

3. 如权利要求 1 所述的疫苗，其特征在于，编码 MSP-1 的核酸相比较野生型序列而言其 AT 含量是减少的。

4. 如权利要求 1 所述的疫苗，其特征在于，所述核酸受控于启动子。

5. 如权利要求 1 至 4 任一项所述的疫苗，其特征在于，所述核酸在 5’末端与编码信号肽序列的核苷序列融合。

6. 如权利要求 5 所述的疫苗，其特征在于，所述信号肽序列控制基因产物的分泌。

7. 如权利要求 5 所述的疫苗，其特征在于，所述信号肽序列控制基因产物的膜永久性定位。

8. 如权利要求 5 所述的疫苗，其特征在于，所述信号肽序列控制基因产物的 GPI 锚定。

9. 如权利要求 8 所述的疫苗，其特征在于，疫苗还包含 MSP-1 和 / 或如权利要求 1 中所定义的 MSP-1 片段或片段组合作为组分 c)。

10. 如权利要求 1-9 任一所述的疫苗在制备用于预防和 / 或治疗疟疾的药物中的用途。

11. 如权利要求 1-9 任一所述的疫苗及 MSP-1 和 / 或如权利要求 1 中所定义的 MSP-1 片段或片段组合在制备用于预防和 / 或治疗疟疾的药物中的用途。

作为抗恶性疟的潜在疫苗的重组 MVA 株

[0001] 本发明涉及重组的 MVA 株（经修饰的痘苗病毒安卡拉 (Modifiziertes Vaccinia Virus Ankara)）痘苗病毒的制备，其用于重组生产疟疾病原体恶性疟原虫 (Plasmodium falciparum) 的完全的疟疾抗原 gp190/MSP-1 的重组产物及具体自然存在的功能域及其部分。此外，本发明还涉及所述重组 MVA 的用途，其含有将合成的疟疾抗原 DNA 序列及其部分整合进入病毒基因组中作为疫苗用于免疫接种抵抗疟疾。

[0002] 疟疾是世界上最危险的传染疾病的一种，根据世界卫生组织 (WHO) 的估计，每年登记有 400-900 百万病例。根据来自抗疟疾多边倡议 (MIM) 的信息，每年死于此病传染的人数为 70 万至 270 万 (MIM，2001)。以此观点，分布在 99 个国家的约占世界人口的 40％的人们处于得疟疾的危险。该疾病是由来自顶复亚门 (Apicomplexa) 的疟原虫属 (Plasmodium) 的单细胞原生生物导致的。其中四种感染人类：三日疟原虫 (Plasmodium malariae)，其导致 (Malaria quartana)，间日疟 (Plasmodium vivax) 以及卵形疟原虫 (Plasmodium ovale)，二者均导致间日疟原虫 (Malaria tertiana)，以及最后一个是恶性疟原虫，热带疟 (Malaria tropica) 的病原体，其可导致大多数致命的传染病。

[0003] 现在，其又以更甚的程度进行传播。这主要归因于用于治疗及预防的药剂促使疟疾病原体迅速产生的抗性。除了寻找新的化学疗法，研究集中于疫苗的开发，这是因为在人类的疟疾感染进程中，免疫机理是适用的，一个事实是其表达一种对疟原虫的提高的抗性，正如在疟疾流行猖獗的地区发展出人类的不同类型免疫性所证明的那样。

[0004] MSP-1 作为潜在的疫苗

[0005] MSP-1，裂殖子的主要表面蛋白，疟疾病原体的血相的侵入型，是一种 190-220kDa 蛋白。该蛋白在裂殖子形成过程中被处理成较小的蛋白片段，其直到寄生虫入侵红细胞时经糖基磷脂酰肌醇锚以复合体锚定在裂殖子表面上而被呈递并可以被分离。

[0006] 几种恶性疟原虫菌株的 MSP-1 蛋白的序列分为两种类型，其根据两个具有代表性的分离物 K1 以及 MAD20 命名。该蛋白总共由许多高保守区域、分别归类于两种类型之一的二态区域和两个在所述蛋白的 N 端部分的相对较小的寡态区组成（图 1；Tanabe et al.，1987）。

[0007] 使用纯化自尤氏疟原寄生虫 (P.yoelii-Parasiten) 的蛋白免疫小鼠，保护其免于否则致命的感染 (Holder 以及 Freeman，1981)。同样抗来自尤氏疟原虫的 MSP-1 的单克隆抗体的转移在小鼠动物模型中的提供了保护 (Majarian et al.，1984)。

[0008] 除了在小鼠上做研究以外，松鼠猴以及夜猴也同样被使用天然的、免疫亲和纯化的 MSP-1 接种免疫。在这些测试中获自恶性疟原虫的蛋白部分 (Perrin et al.，1984) 或完全 (Siddiqui et al.，1987) 保护抵抗寄生虫的感染。

[0009] 然而从疟原虫提纯天然物质是昂贵的且不能大规模生产，因此疫苗的研究主要集中于重组疫苗的开发。

[0010] 因此使用纯化自大肠杆菌或啤酒糖酵母 (Saccharomycescerevisiae) 的 MSP-1-19 成功地接种免疫小鼠 (Daly and Long，1993；Ling et al.，1994；Tian et al.，1996；Hirunpetcharat et al.，1997)，同样的是携有 MSP-1-19 的牛分枝杆菌 (Mycobacter

IUm bovis)(Matsumoto et al.,1999)。作为一种使用天然或重组的蛋白进行免疫接种的替代,编码 MSP-1-19 的 DNA 同样被用于疫苗且使免疫小鼠抵抗夏氏疟原虫 (P.chabaudi) 的感染 (Wunderlich 等 ;2000)。使用获自恶性疟原虫的重组体 MSP-1-19 以及 MSP-1-42 免疫接种的猴子,提供了部分保护 (Kumar et al.,1995 ;Eganet al.,2000 ;Chang et al.,1996 ;Stowers et al.,2001)。在猴子上进行免疫接种试验的解释然而却仅仅是在某种条件下才可能的,因为实验中的动物数量太少而不能获得结果的统计评估。

[0011] 使用 MSP-1 片段作为疫苗进行研究的第 I 及第 II 相,其免疫原性也显示于人类中。在此涉及来自恶性疟原虫的 p19 融合在一个破伤风毒素 T 辅助细胞表位 (Keitel et al.,1999) 上,且 MSP-1 的 3 及 4 区 (Saul et al.,1999 ;Genton et al ;2000)。

[0012] 在特定地区的成人流行病研究显示在抗 MSP-1 的抗体滴度以及抗疟疾的免疫性之间有一定的关系 (Tolle et al.,1993 ;Riley etal.,1992 ;Riley et al.,1993)。

[0013] 这些调查以及在动物上的免疫接种研究证明 MSP-1 是开发疟疾疫苗的一个有希望的候选者。

[0014] 一般而言,这些研究可被分化成两种途径,或者使用从寄生虫中纯化的物质或者使用在杂合系统中获自的物质。

[0015] 不管是用作功能性研究还是用作疫苗,蛋白质必须以高产率、高质量且可重复地制备。虽然 MSP-1 可从寄生虫中纯化产生,但是其仅可能在高代价的情形下小量获取。因此以此途径获取符合上述标准的 MSP-1 是不可行的。

[0016] 痘苗病毒属于脊髓动物痘病毒亚科 (Chordopoxvirinae) 下的正痘病毒属 (Orthopoxvirus)。其痘病毒的情形下涉及到复合病毒,其具有大约 200Kb 以及尺寸 250×350nm 的双链 DNA 基因组,属于最大的已知病毒。其由一个被膜壳包覆的立方体形状的病毒体组成。在寄主细胞中,痘病毒的复制和增殖仅在细胞质中进行 (参见 :Moss et al.,1996)。在此痘苗病毒疫苗的寄主细胞范围很广泛,其感染源自人及动物的近乎所有的细胞。1953 年 Anton Mayr 分离并纯化了皮肤痘苗病毒株绒毛膜尿囊痘苗安卡拉 (Chorioallantois Vaccinia Ankara(CVA))。该病毒在鸡胚纤维细胞上连续传代增殖且获得减毒病毒株,其在人类及动物上并未显示进一步的毒性 (Stickl et al.,1974)。该病毒可以进一步用于免疫预防对抗由正痘病毒引起的人和动物的疾病 (Stickl et al.,1974)。该病毒按其起源地被命名为经修饰的痘苗病毒安卡拉 (MVA)。

[0017] 考虑到分子遗传水平,在鸡胚纤维细胞的超过 570 次传代过程中病毒损失了其基因组的 31kb 的 DNA 序列,主要是以 6 个大的缺失形式,其中至少包括决定寄主范围的并由此确定病毒的复制能力的两个基因 (Meyer et al.,1991)。在 MVA 感染包括人类的哺乳动物的大多数细胞的过程中,感染性病毒颗粒的形成仅在感染周期的晚期于病毒体组合阶段被阻断,即病毒基因在启动子的控制下,无论是早期、中期或者晚期的转录甚至可在不允许的细胞中表达。这区别于来自其他的减毒及复制缺陷的痘病毒的 MVA,例如,痘苗病毒 NYVAC 或者金丝雀痘病毒 ALVAC,其在哺乳动物的大多数细胞中的感染在病毒 DNA 复制之前已被阻断 (Tartaglia et al.,1992 ;Sutter 及 Moss,1992)。

[0018] 在疟疾疫苗的开发过程之中使用到了不同的重组痘苗病毒株,其中使用了有复制能力的病毒类型 Western Reserve 及 Copenhagen 及减毒病毒类型 NYVAC、ALVAC 或 COPAC(Kaslow, et al.,1991 ;Etlingerand Altenburger,1991 ;Aidoo et al.,1997 ;

Allsopp et al.,1996)。

[0019] 与减毒的痘苗病毒 MVA 相关的仅仅描述了携有来自啮齿类寄生物伯氏疟原虫 (Plasmodium berghei) 的 CSP 作为疟疾抗原的重组病毒 (Schneider et al.,1998 ; Plebanski et al.,1998 ;Degano et al.,1999 ;Gilbert et al.,1999)。

[0020] 另外描述有含有 MSP-1 编码序列的重组痘苗病毒。出版物的作者声称其已经将天然的 MSP-1 编码序列整合进入 Western Reserve 病毒型的基因组,但是并没有支持此观点的实验 (没有限制性分析、PCR、RNA 印迹以及蛋白质印迹等)。使用这些重组病毒接种免疫松鼠猴并未导致 MSP-1 特异性抗体的形成,而且在恶性疟原虫感染以后并未发现其对于抗 MSP-1 的体液免疫应答有明显的影响 (Pye et al.,1991)。

[0021] 在另一篇出版物中描述了载体 NYVAC-Pf7,其在其他情况下表达恶性疟原虫的 MSP-1。在该出版物中,六个免疫接种的恒河猴的两个的血清通过蛋白质印迹没有显示可检测的抗天然 MSP-1 的信号。另外三个动物的信号检测仅显示部分蛋白质复合体,而仅仅在一个经免疫的动物的血清中检测到一个宽的图谱。然而总体上,这些信号也表现得很微弱。没有列举通过 ELISA 对 MSP-1 特异性抗体进行的定量分析 (Tine et al.,1996)。

[0022] 在使用 NYVAC-Pf7 进行的人体试验的第 I/IIa 阶段既没有证实抗 MSP-1 的细胞免疫应答,也没有通过 ELISA 证实可检测到得体液免疫应答 (Ockenhouse et al.,1998)。

[0023] 相反,Tine et al.(1996) 在蛋白质印迹分析中证实了完整的 MSP-1,在此其显示与恶性疟原虫的信号序列将 MSP-1 运输出细胞外的观点相矛盾 (参照 Publikationen von Moran and Caras,1994,Yanget al.,1997)。

[0024] 本发明的目的因此是提供一种重组的痘苗病毒,其能够

[0025] - 含有稳定的整合进入的 DNA 序列,其编码恶性疟原虫的 MSP-1 或其一部分

[0026] - 所述序列有效地和可重复地表达和由此

[0027] -MSP-1 蛋白以分泌的或者以表面锚定的形式产生

[0028] - 免疫接种寄主并因此

[0029] - 导致细胞以及体液免疫应答

[0030] 本发明的目的是通过提供一个重组的 MVA 病毒来实现,该病毒能够在寄主体内感染、复制和表达 MSP-1。更进一步,其提供一种该重组病毒的生产方法及其用途。

[0031] 根据本发明,术语“基于 MVA 的病毒”表示衍生自 MVA 的病毒,其在病毒基因组的非必需区具有一个或多个突变。MVA 病毒的必需区在此意旨 MVA 病毒的所有基因组片段,其对于获得病毒基因表达以及 MVA 病毒的增殖能力是必需的。其包括,例如编码病毒 RNA 聚合酶亚单元或者病毒的 DNA 聚合酶的基因序列。基于 MVA 的病毒优选为 MVA 病毒。

[0032] 现有技术已知的痘苗体系 NYVAC-Pf7 是由基础病毒 NYVAC 产生的,该基础病毒最初来源于 Copenhagen 痘苗病毒株并通过针对性删除 18 个开放阅读框进行减毒。然而在哺乳动物细胞中 NYVAC 的 DNA 复制被阻断 (Tartaglia et al.,1992),而 MVA 的病毒装配被抑制。MVA 相比较 NYVAC 有这样的优势,发生晚期基因表达,其可被用于表达重组基因。因此 MVA 既可以在转录的早期阶段优先诱导产生毒性 T 细胞应答也可以在晚期阶段通过高蛋白表达刺激免疫应答的体液反应分支。

[0033] MVA,其在痘病毒保护免疫运动中已被广泛应用,其被认为是对于人体非常安全的接种病毒 (Stickl et al.,1974)。

[0034] 根据本发明，提供一种基于 MVA 的重组病毒，其含有至少一种编码恶性疟原虫 MSP-1 蛋白、其片段或其突变蛋白的核酸。

[0035] MSP-1 氨基酸序列通过公开供使用的数据库获取，例如 3D7(MAD20- 隔离群）：CAA84556 ;FCB-1(K1- 隔离群）:CAB36903。二者均来自 NIH 数据库 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)。

[0036] 特别优选的所述编码 MSP-1 蛋白的核酸是其中 AT 含量减少的核酸，如同描述于 DE 19640817 A1，其揭示的内容在此作为引用，特别优选的核酸是衍生自恶性疟原虫 MSP-1 序列的，并且其中疟原虫密码子的大部分已被如此置换，以至于符合人类的合成基因的密码子频率，而不改变氨基酸序列。

[0037] 根据优选的实施方案，MSP-1 蛋白是隔离群 3D7 的 MSP-1，该 MSP-1 蛋白如下被称为“MSP-1D”。可替代地，可以是 FCB1 株的 MSP-1 蛋白，其如下被称为“MSP-1F”。所述 MSP-1 蛋白优选包括这两种 MSP-1 形式的片段。在此特别优选的 MSP-1F 片段是单独的或组合的 p83、p30、p38、p33 以及 p19。尤其优选的 MSP-1D 片段是单独的或组合的，在此其中同样包括与 MSP-1F 片段的组合，特别是 p83、p30、p38、p33 以及 p19。尤其优选 p83 与 p30 的组合以及 p38 与 p42 的组合。在此所述片段的位点显示于图 1 中，更进一步也包括两种 MSP-1 形式的 p42 片段。

[0038] MSP-1 蛋白同样也可以是恶性疟原虫 MSP-1 序列的突变蛋白，其通过一个或多个氨基酸的增加、删除、插入、倒位或置换区别于野生型的 MSP-1 序列。

[0039] 在一个优选的实施方案中，根据本发明的病毒包括用于表达的适宜的启动子，其中编码 msp-1 的序列受控于该启动子。在此该启动子可以是 MVA- 启动子，其中该启动子可以是早期、中期或晚期的基因启动子或其组合。然而，也包括在所使用的表达体系中能够用于表达的非 MVA 启动子。在此既可以使用组成型也可以使用诱导型的启动子。对于大规模的蛋白生产在此可以使用较强的痘苗病毒启动子，例如合成的晚期或早 / 晚启动子或杂合痘苗 /T7 聚合酶体系 ;对于体内诱导 MHC- 型 I- 限制性细胞毒性 T 细胞应答可以优选自然存在的早期或串联早 / 晚启动子。进一步，大肠埃希菌乳糖 (E.coli lac) 抑制子 / 操纵子体系或杂合痘苗 /T7- 体系可用于基因表达的启动 ;(Methodsin Molecular Biology, Volume 62,Herausgeber Rocky S.Tuan,Humana Press,Broder und Earl,Seite 176,mit weiterenNachweisen)。

[0040] 根据进一步的优选实施方案，该病毒还包括选择性标记。该选择性标记在此适合用于以已知方式进行选择和 / 或筛选。适宜的选择性标记在此包括例如大肠杆菌乳糖操纵子 (E.coli lacZ) 体系，该选择性体系使用大肠杆菌黄嘌呤 - 鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (XGPRT) 基因。此外可以使用改变病毒的宿主特异性的选择方法 (Staib et al.,2000)。可以使用本领域已知的其他选择性标记。

[0041] 根据进一步优选的实施方案，所述核酸在 5’末端与使用编码信号肽序列的核苷序列融合。如由现有技术已知的，未检测到来自恶性疟原虫的信号序列及锚定在哺乳动物细胞中的表达，或者没有被正确地进行。(Moran und Caras,1994 ;Burghaus et al.,1999 ; Yang etal.,1997)。

[0042] 胞内开启的选择性控制问题通过使用人类信号序列“衰变加速因子”(DAF)(图 2) 而被解决。适用的信号肽序列特异于高等真核细胞。除了“衰变加速因子”以外这些信号

序列的实例为免疫球蛋白或者不同生长因子或细胞因子的信号肽 (von Heijne,1985)。根据优选的实施方案信号肽序列控制基因产物例如细胞因子、抗体等的分泌。

[0043] 更进一步,优选的信号序列导致基因产物的C末端的GPI锚定细胞表面,如在人类DAF的情形下。可供选择地,优选的肽序列可控制基因产物的膜永久性定位,如同M-同种型或者囊状口腔炎病毒G蛋白的免疫球蛋白的情况。

[0044] 根据进一步优选的实施方案,病毒也可以包括适宜的剪接供体位点以及剪接受体位点,以至于产生适当的剪接mRNA,其适于在待治疗的个体中进行翻译。该核酸此外还含有一个适于作为核糖体结合位点的序列。

[0045] 根据本发明进一步的实施方案提供一种用于生产重组病毒的方法,该方法包括下述步骤:

[0046] a) 使用转移载体转染真核宿主细胞,其中该转移载体

[0047] i) 包含编码恶性疟原虫MSP-1、片段或其突变蛋白的核酸,其中该突变蛋白通过一个或多个氨基酸的增加、删除、插入、转位或者置换而区别于MSP-1序列,且任选地包括选择性标记的编码序列;且包括DNA序列,其作为启动子用于控制所述编码序列的转录;

[0048] ii) 根据i) 的核酸侧面连接MVA序列5'端和/或3'端,其中该序列适用于在寄主细胞中与基因组MVA-DNA同源重组;

[0049] b) 使用基于MVA的病毒感染,优选为MVA;

[0050] c) 在适于同源重组的条件下培养该寄主细胞;且

[0051] d) 分离基于MVA的重组病毒。

[0052] 寄主细胞优选自RK13(兔子肾细胞)、BHK21(幼仓鼠肾细胞)或初期的CEF(小鸡胚胎纤维细胞)。

[0053] 所述转移载体可以是经典的痘苗病毒转移载体,其例如选自pGS20、pSC59、pMJ601、pSC65、pSC11、pCF11以及pTKgptFls或从中衍生的载体;参见Methods in Molecular Biology,Volume 62,siehe vorstehend,Broder und Earl,第176页及其中提到的参考资料,尤其是Earl,Cooper und Moss(1991)in Current Protocols inmolecular biology(Ausubel et al.),Wiley-Interscience,NewYork,Seiten 16.15.1-16.18.10。根据现有技术的已知条件进行转染。

[0054] 在此所述核酸可以具有病毒核酸的修饰。

[0055] 根据i) 的所述核酸侧面连接MVA-序列或其互补序列5'端和/或3'端;优选侧面连接的MVA-序列是这样的DNA序列,即其5'端和3'端分别为在MVA基因组中自然发生的删除位点,例如删除位点II、III或VI,如Meyer H.,Sutter G,Mayr A.(1991),J Gen Virol 72,1031-1038或如从MVA病毒的完整的基因组序列(Antoine et al.1998,Virology 244,365-396)显示的。优选转移载体进一步包括选择性标记例如抗生素抗性或代谢标记。理论上包括所有已知的选择性标记。

[0056] 为了有效地进行同源重组,待插入的侧面连接核酸的MVA-DNA序列的长度分别至少应为0.5Kb。

[0057] 使用已知技术用转染载体对寄主细胞进行转染,根据标准的条件使用MVA进行转染(Staib et al.,2000)。

[0058] 根据选择性(i)的序列内的选择性标记进行重组MVA的分离。所述重组MVA病毒

可以或者直接获自培养寄主细胞的溶菌产物或者获自培养物上清液。

[0059] 根据进一步的实施方案提供疫苗，其包括：

[0060] a) 根据本发明的重组病毒；以及

[0061] b) 药理学上相容的载体。

[0062] 在此适宜的药理学上相容的载体是所有现有技术中已知的载体以及稀释剂。假如意图用于特定应用形式，药理学上相容的载体可以用已知技术进行挑选以及改变。

[0063] 疫苗可通过皮下、经肌肉、经静脉、经皮肤、经腹膜内或经口服施用。该疫苗用于人类或动物的疟疾的预防和/或治疗。

[0064] 根据一个优选的实施方案，该疫苗可进一步含有 MSP-1、其片段或其突变蛋白，其通过一个或多个氨基酸的增加、删除、插入、倒位或置换而区别于恶性疟原虫 MSP-1 序列，和/或含有编码前述序列的核苷酸。在此特别优选重组产生 MSP-1 蛋白，尤其是在大肠杆菌中的重组体。编码 MSP-1 或其突变蛋白的核酸优选在其 AT 含量方面是减少的。尤其优选的是描述自 DE-19640817A1 的核酸，其中特别是恶性疟原虫密码子被人类密码子所置换而不改变氨基酸序列。

[0065] 只要所述疫苗既包含重组病毒也包含 MSP-1、其片段或其突变蛋白或者编码核酸，该疫苗可以试剂盒的形式提供。其适于同时、顺次或间隔给予疫苗的两种成分。

[0066] 下述实施例解释本发明但并不构成对其的限制。

[0067] 图 1：获自恶性疟原虫的 FCB-1 以及 MAD20 株的 MSP-1 的一级结构。

[0068] 序列上的箭头表示天然蛋白的加工部位 (Holder et al.，1987)，其将 MSP-1 分成片断 p83、p30、p38 和 p42，其以复合体形式锚定在寄主表面。在第二加工步骤将 p42 分成 p33 和 p19。图示下面的箭头表示合成 DNA 序列的一次性存在的内切酶切割位点。

[0069] 简写：SP ＝信号肽，GA ＝ GPI- 锚

[0070] 图 2：在使用重组 MVA 感染的 HeLa- 细胞中表达 msp1d-38/42。

[0071] 使用 rMVA-msp1d/38+42S 或 rMVA-msp1d/38+42A 感染 Hela 细胞并随后固定。在第二及第四行分别显示固定后使用 Triton-100 进行通透化的细胞，而细胞的细胞膜在第一和第三行保持完整。如此经处理的细胞使用 mAk5.2 和多克隆血清作为第一抗体进行孵育。所述 mAk5.2 识别一种在 MSP-1 片段 p19 的羧基末端特异于 MSP-1 构象（性）表位。所述多克隆血清识别 ER 蛋白 Sec61beta（抗 ER 标记）。这些均使用 Cy3- 偶联抗鼠 -IgG（检测 mAk5.2）或 FITC- 偶联抗兔 IgG（检测抗 Sec61beta）进行有色标记并随后在共聚焦显微镜下进行分析。假如细胞使用 rMVA-msp1d/38+42S 或 rMVA-msp1d/38+42A 进行感染且被通透化，所述针对 MSP-1D-38/42(mAk5.2) 的信号会以 ER 标记聚集显示。假如细胞相反保持完整，MSP-1D-38/42 仅仅在使用 rMVA-msp1d/38+42A 感染的情况下在被感染的细胞表面可检测到。在此 ER- 标记作为细胞膜完整状况的监视。

[0072] 简写：ER ＝内质网；mAk ＝单克隆抗体。

[0073] 图 3：借助免疫印迹证实经重组 MVA 的感染的 Hela 细胞中的 MSP-1D-42 以及 MSP-1D-38/42

[0074] 使用 rMVA-msp1d/42S、rMVA-msp1d/42A、rMVA-msp1d/38+42S 或 rMVA-msp1d/38+42A 感染 HeLa 细胞 A 并过夜培养。上清液以及细胞碎片的样品经 SDS 凝胶电泳在非还原条件下进行分离，转移至 PVDF 膜上并借助 mAb5.2 第一抗体进行辨认。只有

由DAF-信号序列及相应的MSP-1D-片段组成嵌合体可在被感染的细胞的上清液中被证实，而在所有使用MVA感染的细胞中的细胞内表达提供一个信号。

[0075] 图4：使用rMVA-msp1d/42S或rMVA-msp1d/42A进行三次免疫接种及使用来自大肠杆菌的MSP-1D-HX42进行一次免疫接种后体液免疫应答的发展

[0076] 在A中，借助ELISA的体液免疫应答分析是使用纯化自大肠杆菌的重组产生的MSP-1D-HX42作为抗原而展现的。曲线表示p42特异性抗体的发展，测量OD_{405}＝1。小鼠分别以三周的间隔使用rMVA-msp1d/42S的10^6IU(第一次免疫，同时血液取样S0)和10^8IU(第一和第二加强剂量，同时采样S1及S2)进行免疫。此外，四周后对小鼠使用于不完全的傅氏佐剂中的来自大肠杆菌的各5μg MSP-1D-HX42(血液采样S3后一周)进行皮下注射。S0至S5代表血液采样的时间点，且在此S0至S3分别以三周的间隔采样，采样S4及S5分别以四周的间隔进行。箭头标示免疫接种的时间点。星号表示使用来自大肠杆菌的MSP-1D-HX42进行第四次免疫接种。

[0077] B表示针对使用rMVA-msp1d/42A进行免疫接种的相同分析。

[0078] 图5：使用rMVA-msp1d/S或rMVA-msp1d/83+30/38+42A组合使用来自大肠杆菌的MSP-1D免疫接种后体液免疫应答的发展

[0079] 借助ELISA来确定在使用纯化自大肠杆菌的重组产生的MSP-1D作为抗原的情形下的体液免疫应答。如图4所示，曲线显示了MSP-1D特异性抗体的发展，以OD_{405}＝1来测定。

[0080] 小鼠分别以三周的间隔（在图中通过箭头进行标记）进行免疫接种。以组归纳的免疫接种策略如下：

[0081] 组1：20μg MSP-1D(第0天)，10^8IU rMVA-msp1d/S(第21天)，5个小鼠

[0082] 组2：20μg MSP-1D(第0天)，10^8IU rMVA-msp1d/A(第21天)，5个小鼠

[0083] 组3：20μg MSP-1D(第0天)，10^8IU rMVA-msp1d/S(第21天)，20μg MSP-1D(第42天)，10个小鼠

[0084] 组4：20μg MSP-1D(第0天)，10^8IU rMVA-msp1d/S(第21天)，10^8IU rMVA-msp1d/S(第42天)，10个小鼠

[0085] 组5：20μg MSP-1D(第0天)，10^8IU rMVA-msp1d/83+30/38+42A(第21天)，20μg MSP-1D(第42天)，9个小鼠

[0086] 组6：20μg MSP-1D(第0天)，10^8IU rMVA-msp1d/83+30/38+42A(第21天)，10^8IU rMVA-msp1d/83+30/38+42A(第42天)，10个小鼠

[0087] 组7：20μg MSP-1D(第0天)，10^8IU rMVA-msp1d/A(第21天)，20μg MSP-1D(第42天)，5个小鼠。

[0088] 下面，导致以其表面锚定形式生产MSP-1的重组病毒以“A”标记，而导致分泌MSP-1的那些以“S”标记。

[0089] 表1产生于本发明范围内的病毒结构体的完全列表

[0090]

	rMVA-msp1d	rMVA-msp1f
分泌型 MSP-1	rMVA-msp1d/S rMVA-msp1d/83S rMVA-msp1d/83+30S rMVA-msp1d/42S rMVA-msp1d/38+42S	
表面锚定 MSP-1	rMVA-msp1d/A rMVA-msp1d/83A rMVA-msp1d/83+30A rMVA-msp1d/42A rMVA-msp1d/38+42A rMVA-msp1d/83+30/38+42A	rMVA-msp1f/A rMVA-msp1f/83+30/38+42A rMVA-msp1f/38+42A

[0091] 感染细胞中 MSP-1 或其片段的产生以及蛋白的定位可以使用共焦显微镜方法证实，并示范性地展示通过 rMVA-msp1d/38+42S 和 rMVA-msp1d/38+42A 感染的 HeLa 细胞（图 2）。

[0092] 来源于使用重组 MVA 感染的细胞的所有 MSP-1 的分泌通过细胞上清液的免疫印迹分析证实，并在此示范性地展示用 rMVA-msp1d/42S 和 rMVA-msp1d/38+42S 进行的免疫接种（图 3）。

[0093] 随后在小鼠上进行的免疫接种实验中研究重组 MVA 在体液免疫应答方面的免疫原活性。在此诱导针对 msp-1 重组 MVA 的高滴度抗体以对抗寄主蛋白，其通过 ELISA 确定。p42- 特异性抗体滴度及观察到的由重组 MVA 产生的表面锚定蛋白或分泌的蛋白的不同免疫潜力示范性地展示使用 rMVA-msp1d/42S 和 rMVA-msp1d/42A 进行的免疫接种（图 4）。

[0094] 引用文献

[0095] Aidoo, M., Ulvani, A., Whittle, H.C, Hill, A.V., and Robson, K.J.(1997). Recombinant vaccinia virusesfor the characterization of Plasmodium falciparum-specific cytotoxic T lymphocytes:recognition ofprocessed antigen despite limited re-stimulation efficacy.Int Immunol 9,731-7.

[0096] Allsopp,C.E.,Plebanski,M.,Gilbert,S.,Sinden,R.E.,Harris,S.,Frankel, G.,Dougan,G.,Hioe,C.,Nixon,D.,Paoletti,E.,Layton,G.,and Hill,A.V.(1996). Comparison of numerous delivery systems forthe induction of cytotoxic T lymphocytes by immunization.Eur J Immunol 26,1951-9.

[0097] Antoine,G.,Scheiflinger,F.,Dorner,F,and Falkner,F.G.(1998).The complete genomic sequence ofthe modified vaccinia Ankara strain:Comparison with other Orthopoxviruses.Virology 244,365-396.

[0098] Chang,S.P.,Case,S.E.,Gosnell,W.L.,Hashimoto,A.,Kramer,K J.,Tarn,L.Q., Hashiro,C.Q.,Nikaido,C.M.,Gibson,H.L.,Lee-Ng,C.T.,Barr,P.J.,Yokota,B.T.,and

Hut, G.S.(1996).Arecombinant baculovirus 42-kilodalton C-terminal fragment of Plasmodium falciparum merozoite surfaceprotein 1 protects Aotus monkeys against malaria.Infect Immun 64,253-61.

[0099] Daly, T.M.and Long, C.A.(1993).A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal fragment ofPlasmodium yoelii yoelii 17XL merozoite surface protein 1 induces a protective immune response in mice.Infect Immun 61,2462-7.

[0100] Degano,P.,Schneider,J.,Hannan,C.M.,Gilbert,S.C.,and Hill,A.V.(1999). Gene gun intradermalDNA immunization followed by boosting with modified Vaccinia virus Ankara:enhanced CD8+T cellimmunogenicity and protective efficacy in the influenza and malaria models.Vaccine 18,623-32.

[0101] Egan, A.F., Blackman, M.J., and Kaslow, D.C.(2000).Vaccine efficacy of recombinant Plasmodiumfalciparum merozoite surface protein 1 in malaria-naive, -exposed, and/or -rechallenged Aotusvociferans monkeys.Infect Immun 68,1418-27.

[0102] Etlinger, H.M., and Altenburger, W.(1991).Overcoming inhibition of antibody responses to a malariarecombinant vaccinia virus caused by prior exposure to wild type virus.Vaccine 9,470-2.

[0103] Genton, B., Al-Yaman, F., Anders, R., Saul, A., Brown, G., Pye, D., Irving, D.O., Briggs, W.R., Mai, A., Ginny, M., Adiguma, T., Rare, L., Giddy, A., Reber-Liske, R., Stuerchler, D., and Alpers, M.P.(2000).Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine in adults living in anendemic area of Papua New Guinea.Vaccine 18,2504-11.

[0104] Gilbert, S.C., Schneider, J., Plebanski, M., Hannan, C.M., Blanchard, T.J., Smith, G.L., and Hill, A.V.(1999).Ty virus-like particles, DNA vaccines and Modified Vaccinla Virus Ankara;comparisons andcombinations.Biol Chem 380, 299-303.

[0105] Hirunpetcharat, C., Tian, J.H., Kaslow, D.C., van Rooijen, N., Kumar, S., Berzofsky, J.A., Miller, L.H., and Good, M.F.(1997).Complete protective immunity induced in mice by immunization with the 19-kilodalton carboxyl-terminal fragment of the merozoite surface protein-1(MSP1[19])of Plasmodium yoeliiexpressed in Saccharomyces cerevisiae:correlation of protection with antigen-specific antibody titer, butnot with effector CD4+T cells.J Immunol 159,3400-11.

[0106] Holder, A.A., and Freeman, R.R.(1981).Immunization against blood-stage rodent malaria using purifiedparasite antigens.Nature,294,361-364.

[0107] Holder, A.A., Sandhu, J.S., Hillman, Y., Davey, L.S., Nicholls, S.C., Cooper, H., and Lockyer, M, J.(1987).Processing of the precursor to the major merozoite surface antigens of Plasmodium falciparum.Parasitology 94,199-208.

[0108] Kaslow, D.C., Isaacs, S.N., Quakyi, I.A., Gwadz, R.W., Moss, B., and Keister,

D.B.(1991).Induction ofPlasmodium falciparum transmission-blocking antibodies by recombinant vaccinia virus.Science 252,1310-1313.

[0109] Keitel,W.A.,Kester,K.E.,Atmar,R.L.,White,A.C.,Bond,N.H.,Holland,C.A.,Krzych,U.,Palmer,D.R.,Egan,A.,Diggs,C.,Ballou,W.R.,Hall,B.F.,and Kaslow,D.(1999).Phase I trial of two recombinantvaccines containing the 19kd carboxy terminal fragment of Plasmodium falciparum merozoite surfaceprotein 1(msp-1(19))and T helper epitopes of tetanus toxoid.Vaccine 18,531-9.

[0110] Kumar,S.,Yadava,A.,Keister,D.B.,Tian,J.H.,Ohl,M.,Perdue-Greenfield,K.A.,Miller,L.H.,andKaslow,D.C.(1995).Immunogenicity and in vivo efficacy of recombinant Plasmodium falciparummerozoite surface protein-1 in Aotus monkeys.Mol Med 1,325-32.

[0111] Ling,I.T.,Ogun,S.A.,and Holder,A.A.(1994).Immunization against malaria with a recombinantprotein.Parasite Immunol 16,63-7.

[0112] Majarian,W.R.,Daly,T,M.,Weidanz,W.P.,and Long,C..A.(1984).Passive immunization againstmurine malaria with an IgG3 monoclonal antibody.J.Immunol.132,3131-3137.

[0113] Matsumoto,S.,Yukitake,H.,Kanbara,H.,and Yamada,T.(1999).Long-lasting protective immunityagainst rodent malaria parasite infection at the blood stage by recombinant BCG secreting merozoitesurface protein-1.Vaccine 18,832-4.

[0114] Meyer,H.,Sutter,G.,and Mayr,A.(1991)Mapping of deletions in the genome of the highly attenuatedvaccinia virus MVA and their influence on virulence.J Gen Virol 72,1031-8.

[0115] Moran,P.,and Caras,I.W.(1994).Requirements for glycosylphosphatidylinositol attachment are similarbut not identical in mammalian cells and parasitic protozoa.J Cell Biol 125,333-43.

[0116] Moss,B.,Carroll,M.W.,Wyatt,L.S.,Bennink,J.R.,Hirsch,V.M.,Goldstein,S.,Elkins,W.R.,Fuerst,T.R.,Lifson,J.D.,Piata k,M.,Restifo,N.P.,Overwijk,W.,Chambertain,R.,Rosenberg ,S.A.,and Sutter,G.(1996).Host range restricted,non-replicating vaccinia virus vectors as vaccine candidates.Adv ExpMed Biol 397,7-13.

[0117] Ockenhouse,C.F.,Sun,P.F.,Lanar,D.E.,Wellde,B.T.,Hall,B.T,Kester,K.,Stoute,J.A.,Magill,A.,Krzych,U.,Farley,L.,Wirtz,R.A.,Sadoff,J.C.,Kaslow,D.C.,Kumar,S.,Church,L.W.,Crutcher,J.M.,Wizel,B.,Hoffman,S.,Lalvani,A.,Hill,A.V.,Tine,J.A.,Guito,K.P.,de Taisne,C.,Anders,R.,Ballou,W.R.,and et al.(1998).Phase I/IIa safety,immunogenicity,and efficacy trial of NYVAC-Pf7,a pox-vectored,multiantigen,multistage vaccine candidate for Plasmodium falciparum malaria.J Infect Dis 177,1664-73.

[0118] Perrin,L.H.,Merkli,B.,Loche,M.,Chizzolini,C.,Smart,J.,and Richle,R.(1984).Antimalarial immunityin Saimiri monkeys.Immunization with surface

components of asexual blood stages. J Exp Med 160,441-451.

[0119] Plebanski, M., Gilbert, S.C., Schneider, J., Hannan, C.M., Layton, G., Blanchard, T., Becker, M., Smith, G., Butcher, G., Sinden, R.E., and Hill, A.V. (1998). Protection from Plasmodium berghei infection bypriming and boosting T cells to a single class I-restricted epitope with recombinant carriers suitable forhuman use. Eur J Immunol 28,4345-55.

[0120] Pye, D., Edwards, S.J., Anders, R.F., O'Brien, C.M., Franchina, P., Corcoran, L.N., Monger, C., Peterson, M.G., Vandenberg, K.L., Smythe, J.A., Westley, S.R., Coppel, R.L., Webster, T.L., Kemp, D.J., Hampson, A.W., and Langford. C.J. (1991). Failure of recombinant vaccinia viruses expressingPlasmodium falciparum antigens to protect Saimiri monkeys against malaria. Infect Immun 59,2403-2411.

[0121] Riley, E.M., Allen, S.J., Wheeler, J.G., Blackman, M.J., Bennett, S., Takacs, B., Schonfeld, H.J., Holder, A.A., and Greenwood, B.M. (1992). Naturally acquired cellular and humoral immune responsesto the major merozoite surface antigen(PfMSP1)of Plasmodium falciparum are associated with reducedmalaria morbidity. Parasite Immunol 14,321-337.

[0122] Riley, E.M., Morris-Jones, S., Blackman, M.J., Greenwood, B.M., and Holder, A.A. (1993). Alongitudinal study of naturally acquired cellular and humoral immune responses to a merozoite surfaceprotein(MSP1)of Plasmodium falciparum in an area of seasonal malaria transmission. Parasite Immunol15. 513-524.

[0123] Saul, A., Lawrence, G., Smillie, A., Rzepczyk, C.M., Read, C., Taylor, D., Anderson, K., Stowers, A., Kemp, R., Allworth, A., Anders, R.F., Brown, G.V., Pye, D., Schoofs, P., Irving, D.O., Dyer, S.L., Woodrow, G.C., Briggs, W.R., Reber, R., and Sturchler, D. (1999). Human phase I vaccine trials of 3recombinant asexual stage malaria antigens with Montanide ISA720 adjuvant. Vaccine 17,3145-59.

[0124] Schneider, J., Gilbert, S.C., Blanchard, T.J., Hanke, T., Robson, K.J., Hannan, C.M., Becker, M., Sinden, R., Smith, G.L., and Hill, A.V. (1998). Enhanced immunogenicity for CD8+T cell induction andcomplete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. Nat Med 4.397-402.

[0125] Siddiqui, W.A., Tarn, L.Q., Kramer, K.J., Hui, G.S., Case, S.E., Yamaga, K.M., Chang. S.P., Chan, E.B., and Kan, S.C. (1987). Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkeysagainst Plasmodium falciparum malaria. Proc Natl Acad Sci USA 84,3014-3018.

[0126] Staib, C., Drexler, I., Ohlmann, M., Wintersperger, S., Erfle, V., and Sutter, G. (2000). Trahsient hostrange selection for genetic engineering of modified vaccinia virus Ankara. Biotechniques 28,1137-42,1144-6. 1148.

[0127] Stickl, H., Hochstein-Mintzel, V., Mayr, A., Huber, H.C., Schafer, H., and Holzner. A. (1974). [MVAvaccination against smallpox :clinical tests with

an attenuated live vaccinia virus strain(MVA)(author ′ strahsl.)].Dtsch Med Wochenschr 99,2386-92.

[0128] Stowers,A.W.,Cioce,V.,Shimp,R.L,Lawson,M.,Hui,G.,Muratova,O.,Kaslow, D.C., Robinson, R., Long, C.A., and Miller, L.H.(2001).Efficacy of two alternate vaccines based on Plasmodium falciparummerozoite surface protein 1 in an Aotus challenge trial.Infect Immun 69,1536-46.

[0129] Sutter,G.,and Moss,B.(1992).Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes.Proc Natl Acad Sci USA 89.10847-51.

[0130] Tanabe,K.,Mackay,M.,Goman,M.,and Scaife,J.G.(1987).Allelic dimorphism in a surface antigengene of the malaria parasite Plasmodium falciparum.J Mol Biol 195,273-287.

[0131] Tartaglia, J., Perkus, M.E., Taylor, J., Norton, E.K., Audonnet, J.C., Cox, W.I., Davis, S.W., van derHoeven, J., Meignier, B., Riviere, M., and et al.(1992). NYVAC:a highly attenuated strain of vacciniavirus.Virology 188,217-32.

[0132] Tian, J.H., Miller, L.H., Kaslow, D.C, Ahlers, J., Good, M.F., Alling, D.W., Berzofsky, J.A., and Kumar, S.(1996).Genetic regulation of protective immune response in congenic strains of mice vaccinated with asubunit malaria vaccine. J Immunol 157,1176-83.

[0133] Tine, J.A., Lanar, D.E., Smith, D.M., Wellde, B.T., Schultheiss, P., Ware, L.A., Kauffman, E.B, Wirtz, R.A., De Taisne, C., Hui, G.S., Chang, S.P., Church, P., Hollingdale,M.R.,Kaslow,D.C.,Hoffman,S.,Guito,K.P.,Ballou,W.R.,Sadoff J.C., and Paoletti, E.(1996).NYVAC-Pf7:a poxvirus-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for Plasmodium falciparum malaria,Infect Immun 64,3833-44.

[0134] Tolle,R.,Fruh,K.,Doumbo,O.,Koita,O.,N′ Diaye,M.,Fischer,A.,Dietz, K,and Bujard,H.(1993).Aprospective study of the association between the human humoral immune response to Plasmodiumfalciparum blood stage antigen gp190 and control of malarial infections.Infect Immun 61,40-7.

[0135] von Heijne,G.(1985).Signal sequences.The limits of variation.J Mol Biol 184,99-105.

[0136] Wunderlich,G., Moura, I.C., and del Portillo,H.A.(2000).Genetic immunization of BALB/c mice with aplasmid bearing the gene coding for a hybrid merozoite surface protein 1-hepatitis B virus surface proteinfusion protects mice against lethal Plasmodium chabaudi chabaudi PC1 infection.Infect Immun 68, 5839-45.

[0137] Yang, S., Carroll, M.W., Torres-Duarte, A.P., Moss, B., and Davidson, E.A.(1997).Addition of theMSA1 signal and anchor sequences to the malaria merozoite surface antigen 1 C-terminal regionenhances immunogenicity when expressed by recombinant vaccinia virus.Vaccine 15,1303-13.

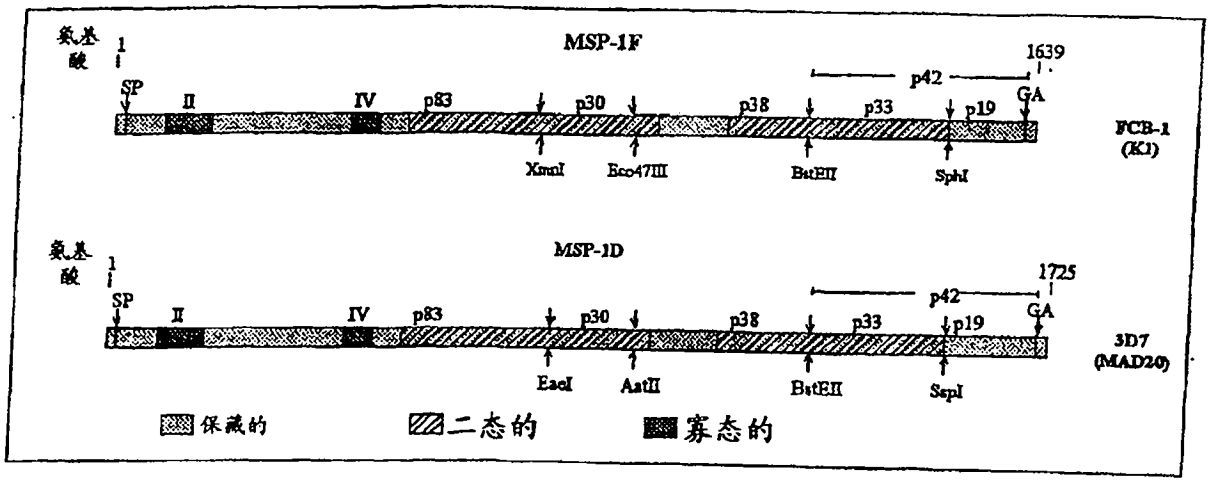

氨基酸
1
MSP-1F
1639
p42
SP
II
IV
p83
p30
p38
p33
p19
GA
FCB-1
(KI)
XmnI
Eco47III
BstEII
SphI
氨基酸
1
MSP-1D
1725
p42
SP
II
IV
p83
p30
p38
p33
p19
GA
3D7
(MAD20)
EaeI
AatII
BstEII
SspI
保藏的
二态的
寡态的

图 1

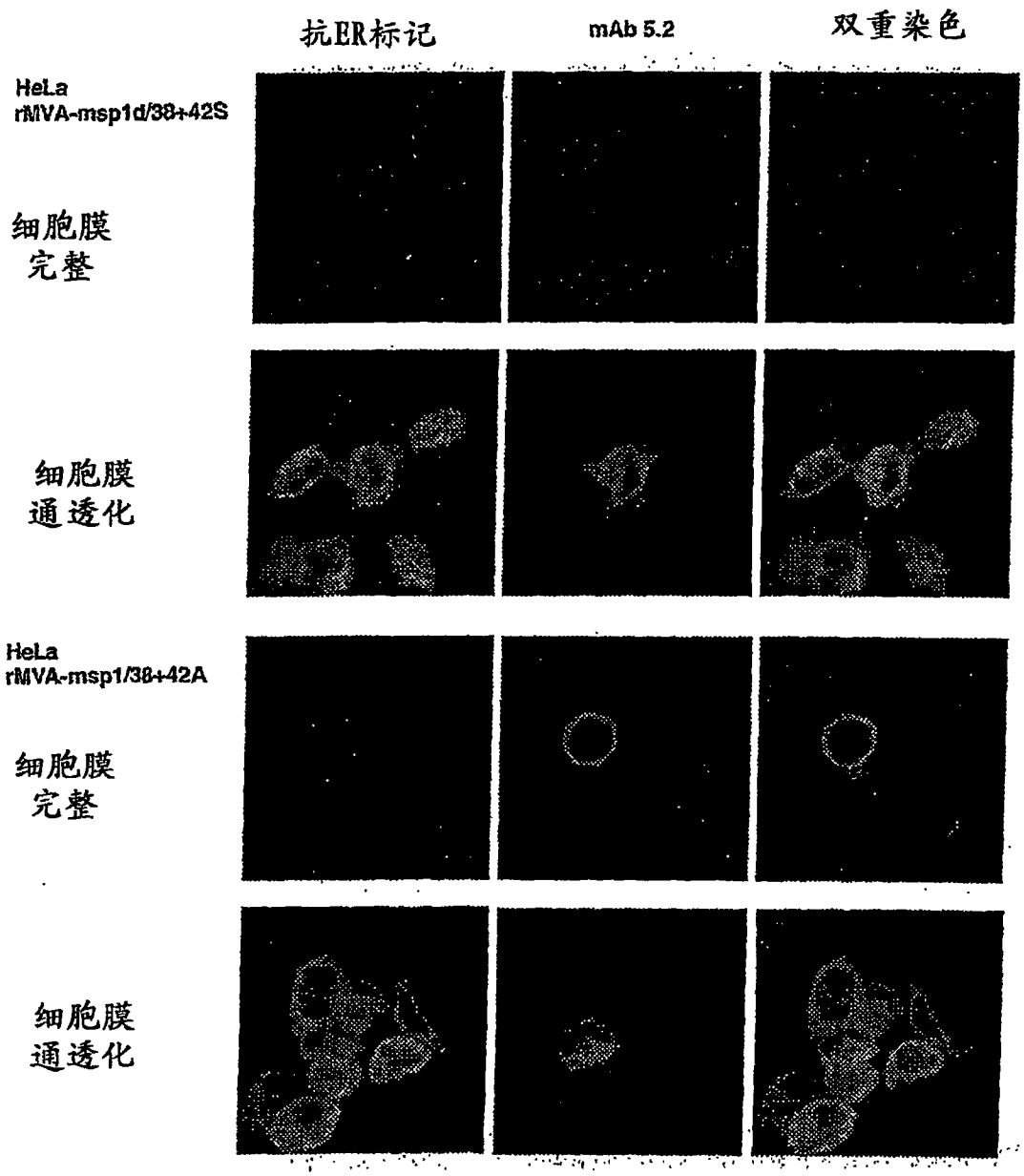

抗ER标记
mAb 5.2
双重染色
HeLa
rMVA-msp1d/38+42S
细胞膜
完整
细胞膜
通透化
HeLa
rMVA-msp1/38+42A
细胞膜
完整
细胞膜
通透化

图 2

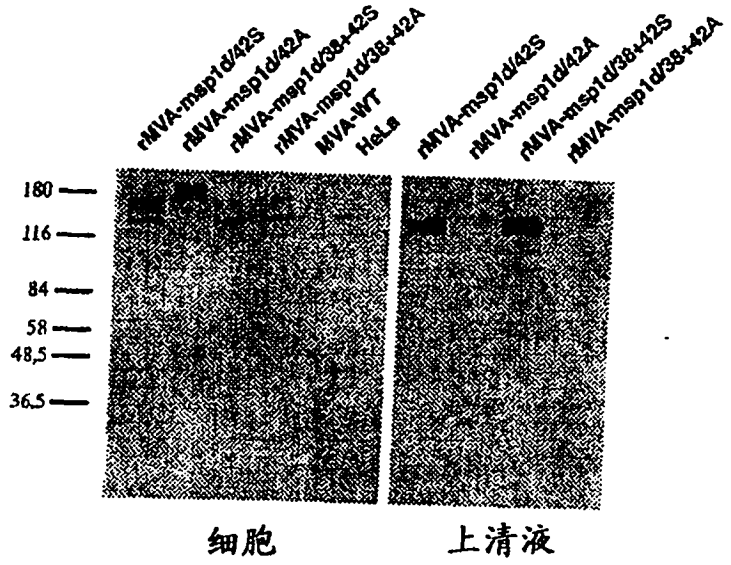

rMVA-msp1d/42S
rMVA-msp1d/42A
rMVA-msp1d/38+42S
rMVA-msp1d/38+42A
MVA-WT
HeLa
rMVA-msp1d/42S
rMVA-msp1d/42A
rMVA-msp1d/38+42S
rMVA-msp1d/38+42A
180
116
84
58
48,5
36,5
细胞
上清液

图 3

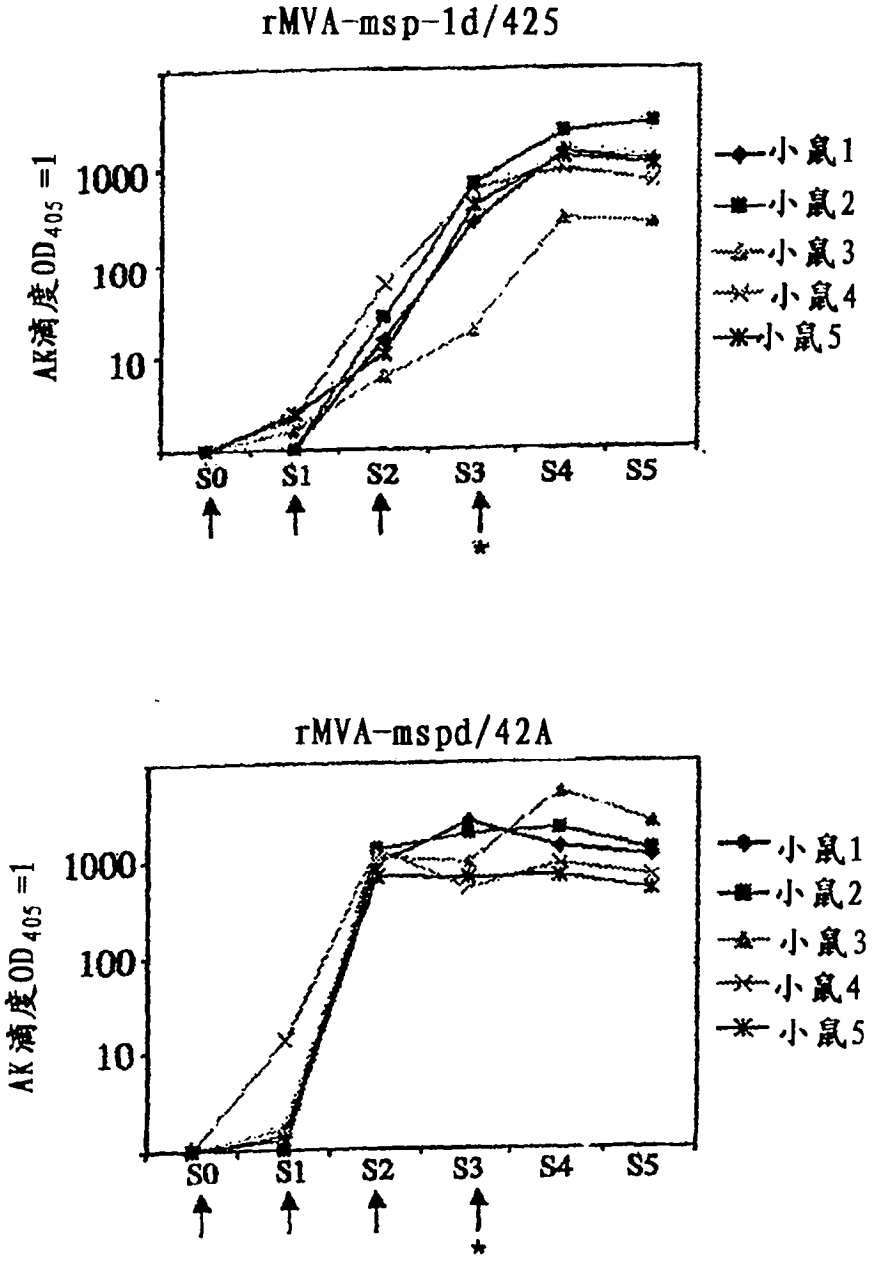

rMVA-msp-1d/425
AK滴度OD405 =1
1000
100
10
S0
S1
S2
S3
S4
S5
*
小鼠1
小鼠2
小鼠3
小鼠4
小鼠5
rMVA-mspd/42A
AK滴度OD405 =1
1000
100
10
S0
S1
S2
S3
S4
S5
*
小鼠1
小鼠2
小鼠3
小鼠4
小鼠5

图 4

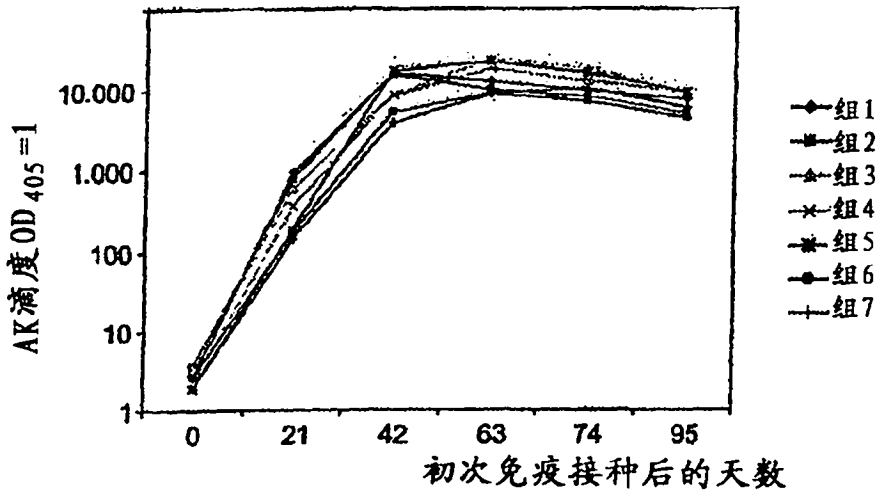

AK滴度 OD 405 =1
10.000
1.000
100
10
1
0
21
42
63
74
95
初次免疫接种后的天数
组1
组2
组3
组4
组5
组6
组7

图 5