



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104302313 B

(45)授权公告日 2018.01.26

(21)申请号 201380020546.7

(22)申请日 2013.04.17

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104302313 A

(43)申请公布日 2015.01.21

(30)优先权数据
106262 2012.04.17 PT

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.10.17

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2013/053050 2013.04.17

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/156949 EN 2013.10.24

(73)专利权人 分子医学研究院

地址 葡萄牙里斯本

(72)发明人 鲁伊·米格尔·普鲁登西奥·皮尼亚泰利
玛丽亚·曼纽尔·迪亚斯·达·莫塔
安东尼奥·曼纽尔·巴尔贝罗·曼德斯

(74)专利代理机构 北京万慧达知识产权代理有限公司 11111

代理人 李春晖 段晓玲

(51)Int.Cl.
A61K 39/015(2006.01)

审查员 曹丙洲

权利要求书1页 说明书9页 附图6页

(54)发明名称

作为整体有机体的疟疾疫苗平台的啮齿动物疟原虫寄生生物

(57)摘要

一种在脊椎动物寄主中诱发抵抗疟疾的保护免疫性方法,其通过向寄主提供活啮齿动物疟原虫有机体,并利用其跨种保护潜能。一种使用基因改造的活啮齿动物疟原虫有机体表达抗原的方法,所述抗原来自感染人类的疟原虫种的生命周期的不同阶段,从而免疫接种脊椎动物寄主抵抗疟疾。本发明还提供了通过在适宜的医药上可接受的载体溶液中,悬浮野生型或经基因改造的啮齿动物疟原虫有机体的疫苗组合物的制备。

1. 一种活啮齿动物疟原虫有机体的用途,其用于生产抵抗人类疟疾的疫苗,其中伯氏疟原虫有机体经基因改造从而表达一种或多种人类疟原虫寄生生物的基因或基因片段,经基因改造的所述基因或基因片段是抵抗人类疟疾的单期或多期免疫效应子,其中所述单期或多期免疫效应子是肝期抗原,其中所述肝期抗原是恶性疟原虫的环孢子蛋白(CS)。

2. 根据权利要求1所述的活啮齿动物疟原虫有机体的用途,其中所述人类疟疾由恶性疟原虫导致。

3. 根据权利要求1-2任一项所述的活啮齿动物疟原虫有机体用于制备与药物可接受载体的混合物的用途,其中所述混合物用于抵抗人类疟疾。

作为整体有机体的疟疾疫苗平台的啮齿动物疟原虫寄生生物

技术领域

[0001] 本发明提供了接种脊椎动物寄主抵抗疟疾的方法,其通过向寄主提供活啮齿动物疟原虫有机体,并利用其跨种保护潜能。本发明还提供了一种疫苗组合物,其包含啮齿动物疟原虫有机体,其经基因工程改造来表达源自一种或多种人类疟原虫寄生生物的免疫特异性单(肝、红内或配子体)期或多(肝和红内、或肝和配子体、或红内和配子体、或肝和红内和配子体)期免疫效应子。本发明还提供通过在适宜的药学可接受的载体溶液中,悬浮野生型或经基因改造的啮齿动物疟原虫有机体的疫苗组合物的制备。

背景技术

[0002] 抵抗疟疾的有效疫苗的长期目标在于根除疾病(根据最近的评估,该疾病每年导致超过一百万人死亡)的重要组分。疟疾疫苗可以锁定有性期和蚊期寄生生物抗原、减少无性期和有性期寄生生物负担的红内期疫苗、降低红内期寄生生物密度的无性红内期疫苗和扰乱寄生生物在载体中发育的疫苗。目前,在现有的候选疫苗中已显示最成功的是针对早期红外期的疫苗,其包括环孢子蛋白(CS)基主要候选疫苗RTS,S【1】。但是,此亚单元疫苗的三期临床试验的近期结果仅表现出抵抗严重疟疾的一般保护效力【2】。

[0003] 可以使用整体有机体的方法替代亚单元候选疫苗。所述方案基于通过减毒的孢子体(通过感染的蚊子注入其脊椎动物寄主的疟原虫形式)产生免疫性。在自然疟疾感染中,无症状的寄生生物在肝细胞中成熟和广泛复制期导致产生疟原虫红外期形式(EEF)并且在导致疾病的感染性红细胞裂殖子的释放之前发生(见【3】)。几十年之前,已知可以通过注入恶性疟原虫辐照减毒的孢子体(RAS)实现人类的灭菌保护【4】。最近以来,获知在某些基因中孢子体的缺乏(其在肝脏的肝细胞中完整的寄生生物发育中损坏(GAS))能在啮齿动物中形成抵抗疟疾的长期保护【5】。这对于基于基因减毒的疟原虫孢子体(GAS)的抵抗疟疾整体有机体的疫苗产生了新的希望。RAS和GAS都能入侵肝细胞,但无法在肝脏中完成其发育过程。重要的是,尽管其有可能增加严重感染的风险,但晚肝期-阻滞寄生生物似乎诱发了优于早阻滞变体的抗疟疾免疫性【6】。

[0004] 虽然抗体也提供了保护,RAS和GAS的保护效能涉及保守性机制并似乎主要通过诱导的CD8⁺T细胞的活性调节。疟原虫CS是RAS和GAS二者中的免疫显性保护抗原【7】,并且之前的研究已经表明,可以通过单独CS的免疫接种实现保护。但是,可以明确,CS并不是通过整体有机体方法诱发的免疫中唯一作用的免疫原【8、9】。

[0005] 目前红外期整体有机体疟疾疫苗方案的主要缺陷在于其依赖于恶性疟原虫(最致命的感染人类的寄生生物种)的减毒。已经显示必须精确调控产生有效RAS的辐照剂量从而满足最低需要。事实上,暴露于高辐照水平的孢子体将不会引发保护,而暴露于低辐照水平的寄生生物将引发严重感染。与后者类似,已经报道了用不同GAS的严重感染【10】。由于在肝脏中经历了完全发育的单独孢子体能产生血液感染和疟疾的症状,基于减毒恶性疟原虫孢子体的疫苗接种造成的安全隐患不容忽视。

[0006] 在此前提下,基于啮齿动物疟原虫寄生生物作为人类免疫接种的非病原载体,我

们提供了开发抵抗疟疾的红外期的整体有机体的疫苗的可选方案。本文中,我们显示了伯氏疟原虫(*P.berghei*)能够感染人类肝细胞,根据需要的优化抗原呈递,而不会导致红内期感染,从而确保增强所提供方法的安全性,并且显示了啮齿动物和人类寄生生物种之间跨种保护的潜能。

[0007] 我们还提出所述跨种保护能通过啮齿动物疟原虫有机体的基因工程改造增强,从而表达其感染人类等同物的抗原。我们使用了转基因伯氏疟原虫寄生生物,其中内生的CS已经通过恶性疟原虫的CS(PbCSPf)所替换【11】从而显示基因改造的啮齿动物疟原虫有机体能够引起能结合并抑制恶性疟原虫感染的特异免疫反应。这些结果形成具有最佳免疫性的疟疾疫苗方案的新范例。

发明内容

[0008] 本发明提出了基于使用啮齿动物作为主要免疫载体,用于开发抗疟疾的红外期整体有机体疫苗的替代方案。通过利用啮齿动物寄生生物的同源分子产生的跨种保护潜能,可以使用啮齿动物寄生生物有机体引发人类寄主中的免疫反应,所述免疫反应能产生针对感染人类的疟原虫种的感染的保护。此外,可以通过引入选择的经基因改造的免疫抗原来增强这些啮齿动物疟原虫有机体的免疫潜能。在此方案中,除了由分子的保守演化提供的其天然的跨种保护能力,啮齿动物疟原虫有机体可以携带感染人类疟原虫种的抗原从而引起针对人类疟原虫寄生生物的特异保护性免疫反应。

[0009] 本发明描述了用于抵抗人类疟疾的活啮齿动物疟原虫有机体。

[0010] 本发明的优选实施方案提供了活啮齿动物疟原虫有机体,其经基因改造从而表达一种或多种人类疟原虫寄生生物的基因或基因片段,用作抵抗人类疟疾的免疫特异性单期或多期免疫效应子。

[0011] 在本发明的另一个实施方案中,前述活啮齿动物疟原虫有机体是天然寄主是啮齿动物的原生动物属疟原虫中的任意成员,包括伯氏疟原虫(*P.berghei*)、约氏疟原虫(*P.yoeli*)、文氏疟原虫(*P.vinckei*)夏氏疟原虫(*P.chabaudi*)。

[0012] 本发明优选的实施方案提供了活啮齿动物疟原虫有机体的使用,其中单期或多期免疫效应子是肝期抗原,如环孢子蛋白(CS)、肝期抗原1(LSA-1)、与血小板反应蛋白关联粘附蛋白(TRAP),和肝期抗原3(LSA-3)或红内期抗原,如红细胞结合抗原-175(EBA-175)、顶端膜抗原-1(AMA-I)、裂殖子表面蛋白1(MSP-1)、Duffy结合蛋白(DBP)和网状细胞结合蛋白(RBPs)或特异配子体抗原如p48/45,或其他免疫性抗原。

[0013] 在本发明的另一个实施方案中,人类疟疾由来自原生动物属疟原虫,包括恶性疟原虫(*P.falciparum*)、间日疟原虫(*P.vivax*)、三日疟原虫(*P.malariae*)、卵形疟原虫(*P.ovale*)、诺氏疟原虫(*P.knowlesi*)的任意人类疟原虫寄生生物导致。

[0014] 本发明的优选实施方案提供了活啮齿动物疟原虫有机体用于制备与药学可接受载体的混合物的使用。

[0015] 在本发明的另一个实施方案中,活啮齿动物疟原虫有机体用于制备抵抗疟疾的疫苗。

附图说明

[0016] 下图提供了优选实施方案以对说明书进行解释说明,其不用被视为限制本发明的范围。

[0017] 图1.在人类肝细胞内的啮齿动物疟原虫寄生生物感染和发育。

[0018] A) 体外。代表Pb (WT) 寄生生物在人类肝细胞系 (Huh-7和HepG2) 和人类永生性肝细胞 (HC-04) 中感染后发育48小时的图片;B) 代表体外发育。Pb (WT) 寄生生物在人类原代肝细胞 (缩放比例10 μ m) 微图案共培养中感染后发育48小时 (上组图片) 和感染后72小时 (下组图片) 的图片。C) Pb (WT) 寄生生物在Huh-7和HepG2肝细胞系和HC-04永生性人类肝细胞感染48小时后的红外期形式的发育,通过面积测量量化 (横线表示面积平均值而柱子代表90和10百分位);D) 在Huh-7和HepG2肝细胞中发育的红外期形式的数量和用10000孢子体感染48小时后的HC-04肝细胞,以细胞融合标准化之后红外期形式数量的%表示 (柱子表示标准差);E) 在小鼠内 (黑色柱子) 发育的来自Pb (WT) 寄生生物的红外期形式和人类经移植的肝细胞 (灰色柱子) 在FRG人类化小鼠的肝脏内感染48小时后的相对比例;F) Pb (WT) 寄生生物的红外期形式在小鼠肝细胞 (黑色柱子) 内的发育或人类肝细胞 (灰色柱子) 在FRG人源化的小鼠内感染48小时后的发育,通过面积测量量化 (横线表示面积平均值,柱子表示90和10的百分位);G) 寄生生物在人源化肝脏的小鼠的人类肝细胞中感染48小时后发育的图片和投影。注意到伯氏疟原虫 (红色) 明显在人体着色的延胡索酰乙酰乙酸盐水解酶的肝细胞中 (白色)。柱子比例对应10 μ m。

[0019] 图2a和2b.在体内人类红细胞的啮齿动物疟原虫寄生生物的感染。

[0020] A1、A2和A3) 代表用人类红细胞移植的嵌合小鼠和非嵌合小鼠周边血液中测定寄生虫血症的流式细胞计量术图。对于核酸用SYTO-16模拟化着色 (x-轴) 和对于小鼠红细胞血统用TER-119mAb (y轴) 从而区别人类和小鼠的红细胞,并区别感染和未感染的红细胞。使用此方案,由于预期其作为由恶性疟原虫感染的人类红细胞的阳性对照落入同一门中,有可能识别用伯氏疟原虫寄生生物感染的人类红细胞。(mE:小鼠红细胞;hE:人类红细胞;imE:感染的小鼠红细胞;ihE:感染的人类红细胞;bimE:感染小鼠红细胞的背景;bihE:感染人类红细胞的背景,A1) 用恶性疟原虫感染的人类红细胞移植的嵌合小鼠;A2) 用伯氏疟原虫感染的非嵌合小鼠;A3) 用伯氏疟原虫感染的人类红细胞移植的嵌合小鼠;B1、B2和B3) 在用Pb (WT) 或恶性疟原虫感染的嵌合和非嵌合小鼠中,来自人源或鼠源的感染的红细胞随时间的平均百分比;B1) 感染的人类红细胞的平均百分比 (实线) 以及在使用恶性疟原虫感染的人类红细胞移植的嵌合小鼠中感染的小鼠红细胞所期望的区域获得的信号背景 (短虚线)。B2) 在用伯氏疟原虫感染的非嵌合小鼠中,感染的小鼠红细胞的平均百分比 (长虚线) 以及在感染的人类红细胞所期望的区域获得的信号背景 (短虚线);B3) 在用伯氏疟原虫感染的人类红细胞移植的嵌合小鼠中感染的人类红细胞百分比 (实线) 以及感染的小鼠红细胞的百分比 (长虚线);C1和C2) 来自用伯氏疟原虫感染的人类红细胞移植的嵌合小鼠的imE和ihE磁化分离之后获得的红细胞种群。C1) 代表磁化分离的伯氏疟原虫感染的存在于用人类红细胞移植的嵌合小鼠的外周血液中的人类红细胞的细胞计量术图。C2) 代表磁化分离的伯氏疟原虫感染的存在于用人类红细胞移植的嵌合小鼠的外周血液中的小鼠红细胞的细胞计量术图;D1和D2) 来自用伯氏疟原虫感染的人类红细胞移植的嵌合小鼠的imE和ihE磁化分离之后获得的培养红细胞种群。D1) 代表伯氏疟原虫寄生生物在人类红细胞内培养的随时间变化的图;D2) 代表伯氏鼠疟原虫寄生生物在小鼠红细胞内培养的随时间变化图;注

意到在磁化分离之后直接获得的ihE中的伯氏疟原虫寄生生物仅显示出在培养20h后最终分解的紧密形式 (picnotic form), 而伯氏-imE在分离期间已经成熟并在培养中随时间趋向于完成营养体分割。E) 代表来自感染的嵌合小鼠的血渍的光照和荧光显微镜观察获得的图片, 显示在同样鼠体中的多种伯氏感染的小鼠红细胞和反常、紧密 (picnotic) 的伯氏疟原虫感染的人类红细胞。

[0021] 图3啮齿动物疟原虫寄生生物种间交叉保护。

[0022] A1和A2) CS-特异性抗体在来自人类疟疾患者的血清中滴定 (n=21); 黑色代表对于恶性疟原虫CS显示阳性的血清样品; A1) 恶性疟原虫CS特异性IgG滴定; A2) 伯氏疟原虫CS-特异性IgG滴定, 黑色代表对于恶性疟原虫CS显示阳性的血清样品; B1和B2) 来自人类疟疾患者血清的识别和结合至恶性疟原虫和伯氏疟原虫孢子体; B1) 识别和结合至恶性疟原虫 (右) 和伯氏疟原虫孢子体 (左) 的人类血清样品的比例; 结合至孢子体的比例 (黑色), 没有结合至孢子体的比例 (灰色); B2) 代表恶性疟原虫孢子体结合分析法的影像 (上) 和伯氏疟原虫孢子体结合分析法的影像 (下)。

[0023] 图4表达人类疟原虫寄生生物抗原的基因改造啮齿动物疟原虫寄生生物。

[0024] A) 体外。啮齿动物原代肝细胞的孢子体感染48小时之后肝脏啮齿动物疟原虫寄生生物形式的免疫荧光显微镜图; B) 体内。C57BL/6啮齿动物疟疾模型的体内孢子体感染45小时之后免疫荧光显微镜图。注意到在Pb (PfCS) 寄生生物中存在恶性疟原虫CS蛋白 (绿色)。

[0025] 图5基因改造的啮齿动物疟原虫寄生生物的免疫性

[0026] A和B) 通过ELISA分析用来自不同的寄生生物系的孢子体感染的小鼠的血清样品以分析在小鼠内用唾液腺注射模拟感染的小鼠 (SG) 或用野生型的伯氏疟原虫 (WT) 感染的小鼠或基因改造的PbCS_{Pf} (PfCS) 攻击诱发的针对环孢子蛋白 (CS) 的IgG和IgM反应; 由于测定血清的最高稀释滴定显示的染色为阳性, 通过任意荧光单元 (AU) 表示滴定; A) 针对恶性疟原虫-CS诱发的IgG和IgM反应; B) 抗伯氏疟原虫-CS诱发的IgG和IgM反应; C) 用唾液腺注射模拟感染的小鼠 (SG) 或用野生型的伯氏鼠疟原虫 (WT) 感染的小鼠或基因改造的PbCS_{Pf} (PfCS) 攻击的小鼠内CS特异性的T细胞反应的ELISPOT分析; 显示在 10^6 的脾细胞中的IFN- γ 分泌细胞的数量; D) 来自用唾液腺注射模拟感染的小鼠 (SG) 或用野生型的伯氏疟原虫 (WT) 感染的小鼠或基因改造的PbCS_{Pf} (PfCS) 至野生型的伯氏疟原虫孢子体攻击的小鼠, 或基因改造的PbCS_{Pf}或恶性疟原虫孢子体攻击的小鼠免疫血清结合亲和力; E) 存在来自用唾液腺注射模拟感染的小鼠 (SG) 或用野生型的伯氏疟原虫 (WT) 感染的小鼠或基因改造的PbCS_{Pf} (PfCS) 攻击的小鼠的血清时, 恶性疟原虫孢子体的抑制滑动活性的分析; F) 存在用唾液腺注射模拟感染的小鼠 (SG) 或用野生型的伯氏疟原虫 (WT) 感染的小鼠或基因改造的PbCS_{Pf} (PfCS) 攻击的小鼠的血清时, 恶性疟原虫的抑制肝脏传染性的分析。

具体实施方式

[0027] 本发明涉及疟疾疫苗的可选方案, 其将前所未有的广泛的用途与高效能结合, 同时完全保证了安全性。我们证明了 (i) 啮齿动物疟疾孢子体 (spz), 由于其能在人类肝细胞中成功感染和发育, 可以用作整体有机体的红外期疫苗, 其能产生强烈的免疫反应; (ii) 啮齿动物疟疾寄生生物, 由于其完全不能在人类红细胞中完成其生命周期, 是非常安全的抗原传输平台, 其不能导致引发疾病的人类红内期感染; (iii) 啮齿动物疟疾寄生生物, 由于

其具有可以通过人类免疫系统识别的保守性分子,可以引发抗人类疟原虫种高水平的跨种保护iv) 基因改造的啮齿动物疟原虫寄生生物是高免疫性的,其能诱发针对能识别人类疟原虫寄生生物的经改造的人类疟原虫抗原的特异免疫反应并抑制人类疟原虫感染。啮齿动物疟原虫有机体或啮齿动物疟原虫寄生生物表示天然寄主是啮齿动物的原生动物属疟原虫中的任意成员,包括四种已知的物种,伯氏疟原虫、约氏疟原虫、文氏疟原虫和夏氏疟原虫。人类疟原虫有机体或人类疟原虫寄生生物表示已知的导致人类疟疾的原生动物属疟原虫中的任意成员,包括间日疟原虫、三日疟原虫、卵形疟原虫、诺氏疟原虫。

[0028] (i) 啮齿动物疟原虫寄生生物在体内感染人类肝细胞

[0029] 我们平行监控了一只小鼠和两组人类肝细胞系 (Hepa1-6、HepG2和Huh7) 和一组人类永生性肝细胞系 (HC04) 在体外的感染,和通过野生型伯氏疟原虫(啮齿动物疟原虫有机体) 共同培养的小鼠原代肝细胞和人类原代肝细胞/纤维原细胞的体外感染。通过实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 和荧光显微镜的感染评估显示出伯氏疟原虫在所有研究的体外体系中具有类似程度的遍历、入侵和发育,并且其能在体外的啮齿动物和人类原代肝细胞中入侵并发育(图1A、B、C、D)。

[0030] 为了确定伯氏疟原虫是否能在体内环境下感染人类肝细胞,我们将孢子体注入人源化肝脏的小鼠 (^{LH}小鼠) 并通过共焦荧光显微镜监控肝脏感染。我们的结果表明伯氏疟原虫能有效感染在嵌合^{LH}小鼠肝脏中移植的人类肝细胞。在嵌合肝脏中,人类和小鼠肝细胞的感染之间的对比揭示了寄生生物能在任意种类的细胞中类似发育(图1E-G)。

[0031] 此外,我们使用了基因改造的啮齿动物伯氏疟原虫寄生生物,其中内生的CS已经由恶性疟原虫取代的CS (PbCS_{Pf}) 【11】。我们评估了此基因改造的寄生生物的肝脏感染行为并显示出其保留了在体外感染人类肝细胞、以及人类原代肝细胞以及^{LH}小鼠肝脏的能力。

[0032] 总之,这些结果表明啮齿动物伯氏疟原虫寄生生物完全有能力感染人类肝细胞,并且此能力保留在基因改造的PbCS_{Pf}寄生生物中,因而满足疟疾疫苗产生免疫性的条件。

[0033] (ii) 啮齿动物疟原虫寄生生物不能导致造成病理的人类红内期感染

[0034] 出于安全,啮齿动物疟原虫有机体基疟疾疫苗必须保证免疫接种的寄生生物不能在人体内导致疾病。这要求啮齿动物疟原虫裂殖子不能在人类红血细胞中 (RBCs) 有效入侵并繁殖。为了确定,我们使用了基于使用人源化血液小鼠 (^{BH}小鼠) 的方案,其移植有确定比例的人类红细胞,已经发展成为评估针对恶性疟原虫感染的药物功效的模型【12】。所述体系可以结合使用核SYTO-16和小鼠特异性的TER-119染料从而分别区别感染的和非感染的细胞,并区别人类和啮齿动物红细胞,从而通过流式细胞计量术监控任一类型细胞的感染(图2A1、2A2、2A3)。

[0035] 我们通过输入伯氏疟原虫感染的小鼠血液感染具有不同程度的嵌合^{BH}小鼠开始,使用非嵌合小鼠作为对照,并定期监控在这些小鼠中的寄生虫血症。我们的结果显示当SYTO-16⁺/TER-116⁺种群提高至数值~5%时,如所预期的,显示小鼠RBC (^mRBC) 感染种群,将对应感染的人类RBC (^hRBC) 的SYTO-16⁺/TER-116⁺种群从未超过0.2%,保持在观察到的非人源化的小鼠的背景范围内(图2A1、2A2、2A3、2B1、2B2、2B3)。

[0036] 上述结果表明伯氏不能感染^hRBC或者其可能以非常低的水平感染。值得注意的是,这发生在嵌合小鼠的情况下,其包含显著种群的^mRBC,作为大量裂殖子体的有效储藏。为了进一步调查在这些情况下人类RBC感染的可能性,我们分析了来自这些小鼠的在用核

染料DAPI和TER-116染色后的血液样本。我们极少发现DAPI⁺/TER-116⁻细胞的情况,表示实际上只发生低程度^hRBC入侵。但是,我们不能发现具有超过单一寄生生物核的^hRBC,表明伯氏疟原虫不能在其可能入侵的少数^hRBC中复制(图2E)。

[0037] 严格意义而言,流式细胞计量术分离的感染的^hRBC的体外培养显示这些寄生生物实际上不能在^hRBC内完成其红细胞内生命周期(图2C1、2C2、2D1、2D2),使其在人体中能安全使用。用PbCS_{Pf}寄生生物进行感染时获得类似结果。

[0038] 由于在这些实验中,通过输入感染的RBC获得第二代裂殖子体发起感染,我们决定研究在肝脏中产生的第一代裂殖子体的性能。为此,我们使用非嵌合小鼠作为对照,用从伯氏疟原虫或PbCS_{Pf}感染的蚊子的唾液腺中收集的孢子体感染^{BH}小鼠,我们进行如上所述的同样类型的分析。我们的结果表明在肝脏中产生的裂殖子的性能与第二代裂殖子类似,显示啮齿动物伯氏疟原虫寄生生物在人体中能安全使用并且不存在与恶性疟原虫孢子体的无效减毒相关联的风险。

[0039] (iii) 啮齿动物疟原虫寄生生物具有针对人类疟原虫寄生生物的高跨种保护潜能

[0040] 我们评估了来自喀麦隆和坦桑尼亚的非洲疟疾感染个体的血清样本中抗伯氏疟原虫和恶性疟原虫CS蛋白的抗体的存在,以及其从这些物种中识别spz的能力。我们的结果表明当这些样品都不包含抗伯氏CS的抗体时(图3A1、3A2),其中的71%能识别恶性疟原虫和伯氏疟原虫spz(图3B1、3B2)。这些数据表明,除了CS蛋白,自然获得的抵抗疟疾的免疫性包括在抗保守性人类疟原虫寄生生物和啮齿动物疟原虫寄生生物spz上表位的抗体反应。总而言之,这些结果表明使用啮齿动物疟原虫寄生生物作为疫苗平台具有提高针对目前未知保守性抗原的免疫反应的潜能。

[0041] (iv) 用基因改造的啮齿动物疟原虫寄生生物的免疫接种产生针对人类疟原虫感染的特定高效保护

[0042] 我们提供的接种疫苗的方法具有的另一个优势在于以下概念:通过引入经过基因改造的人类疟原虫寄生生物的抗原,我们可以提高由啮齿动物疟原虫寄生生物提供的内在跨种保护,其将产生高效的特异免疫反应。

[0043] 为了验证我们提出的方案的观点,我们使用啮齿动物PbCS_{Pf}寄生生物。我们使用免疫荧光显微镜确定无论处于体外(图4A)或体内(图4B) PbCS_{Pf}在肝细胞中都表达恶性疟原虫CS。我们之后评估了这些转基因寄生生物在啮齿动物感染模型中的免疫性并确定了对于经改造的恶性疟原虫CS抗原的响应的特异性。C57BL/6小鼠用PbCS_{Pf}孢子体感染并随后用氯喹处理从而避免血液寄生虫血症和疾病的发展。氯喹治疗开始五天之后,将小鼠处死并从收集的血液中获得免疫血清。获得来自未感染的小鼠的免疫前血清和来自野生型的恶性疟原虫免疫的小鼠的血清,并用作这些实验中的对照。通过ELISA(图5A、5B) 量化在血清中的针对恶性疟原虫CS的抗体。我们的结果表明用PbCS_{Pf}寄生生物免疫的小鼠产生了显著含量的所述抗体,显示用PbCS_{Pf}对啮齿动物接种免疫使得产生直接针对恶性疟原虫CS的抗体,其已知为针对人类感染寄生生物的调节保护【13】。

[0044] 除此之外,我们明确表明针对恶性疟原虫CS表位的细胞免疫反应(图5C)。最终,我们显示用基因改造的啮齿动物PbCS_{Pf}免疫的小鼠的血清可以识别并以高活性结合至人类疟原虫孢子体(图5D)。除此之外,我们显示此免疫血清能从功能上抑制人类疟原虫寄生生物的滑行运动(图5E)和肝细胞入侵(图5F)。

[0045] 总而言之,我们的数据表明啮齿动物疟原虫寄生生物的基因改造可以从本质上提升这些寄生生物针对人类疟原虫寄生生物的免疫潜能。

[0046] 结论

[0047] 如这些通过辐照致弱的 (RAS) 和基因致弱 (GAS) 的孢子体提供的整体有机体的方法表现为对于亚单元基红外期疫苗方案非常吸引人的可选方案,除了在制备、配制和所述减毒的孢子体疫苗的传输上客观的技术挑战。但是,基于减毒恶性疟原虫 (最致命的人类疟疾寄生生物) 的事实,所有这些方法显现出难以忽视的安全隐患。

[0048] 基于啮齿动物和人类疟原虫寄生生物之间的跨种保护潜能,我们提供了发展抵抗疟疾的红外期整体有机体疫苗的可选方案。所述疫苗可引发通过啮齿动物抗原的跨种保护,所述啮齿动物抗原可以是针对其人类疟原虫种等同物的免疫性。除了CS跟随的用辐照的疟疾孢子体接种免疫,还存在通过组分诱发的跨种保护的例子。这可能是例如Ce1T0S,动合子和孢子体的横跨细胞蛋白的情况,基于其通过体液和细胞免疫反应诱发保护免疫性的能力,其近期被视作红外期疫苗的靶抗原。在疟原虫种中,Ce1T0S是高度保守性的,并且发现用来自恶性疟原虫的红外期抗原Ce1T0S接种免疫引发抵抗用伯氏疟原虫的不同攻击的跨种保护,表明可能发生了相反作用。

[0049] 除了其跨种保护潜能,啮齿动物疟原虫寄生生物的免疫性可以通过基因改造来提升,有效将其转化为用于传输感染人类的疟原虫种的免疫抗原的平台,能引发高效特异免疫反应。当然,由于多样性可保证针对寄生虫血症感染的额外保护程度,对于疟原虫生命周期的单个阶段或多个阶段,以及人类疟原虫有机体的单个阶段或多个阶段,可以引入不止一种已知或至今未知的抗原。

[0050] 在本发明中,我们表明啮齿动物寄生生物伯氏疟原虫可以感染人类肝细胞而不能导致人类红内期感染。这组成了啮齿动物基寄生生物作为疫苗方案评估的两个主要前提。第三个前提是转基因啮齿动物疟原虫寄生生物可能引发针对用感染人类的疟原虫种的攻击的反应。为了证明上述假设,我们使用伯氏疟原虫的恶性疟原虫CS表达的突变体(PbCS_{Pf})并显示其保留了其野生型等同体的主要特征并引发了针对恶性疟原虫攻击的特异保护反应。这从理论上证实了我们提供的方案并开辟了基于同样原理来设计和制备其他候选疫苗的道路。

[0051] PbCS_{Pf}本身具有的缺陷在于其产生相对低种群的唾液腺孢子体以及比野生型的伯氏疟原虫更低的肝脏感染性。这似乎主要缘于内生CS的缺失,以及在此寄生生物中恶性疟原虫蛋白不适宜的构象。因此,可以预期几种可选方案来改进PbCS_{Pf}的感染产量,如在内生CS启动子的控制下,在内生蛋白之外而非替代内生蛋白,恶性疟原虫CS在中性位点中的差异表达。

[0052] 使用啮齿动物寄生生物作为人类疟疾基因的“背驮”可以延伸至包括除了CS以外的抗原。在产生红外期免疫反应的明显候选者中是与血小板反应蛋白相联系的粘附蛋白 (TRAP) 和肝期抗原1 (LSA-1),认为二者都具有免疫潜能。

[0053] 此外,抵抗疟疾的灭菌保护免疫是抵抗一组新型恶性疟原虫抗原而非一个分离的单独抗原。或者方案也允许包括红内期抗原。顶端膜抗原I (AMA-I),红细胞结合的抗原-175 (EBA-175),和裂殖子表面蛋白1 (MSP-1),在其确定的或提供的免疫性条件下,是其中主要的候选者。但置于启动子的控制下,其能在感染的肝期将其表达,期望这些抗原能使寄主的

免疫系统对于恶性疟原虫的红内期预先有准备,产生额外保护层。除此之外,通过改造配子体特异性基因,如p48/45,所述方法可以用于在伪减毒疫苗中将传输阻断组分引入啮齿动物疟原虫平台。

[0054] 免疫性平台中,由于可以预期包括间日疟原虫抗原,如CS、上述恶性疟原虫基因的直系同源物、Duffy结合蛋白(DBP)或网状细胞结合蛋白(RBPs),所述方案可以延伸至针对恶性疟原虫免疫的发展。

[0055] 参考文献

[0056] 1.Hill AV.Vaccines against malaria.Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci2011;366:2806-14.

[0057] 2.Agnandj i ST,Lell B,Soulanoudj ingar SS,et al.First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children.N Engl J Med 2011;365:1863-75.

[0058] 3.Prudencio M,Rodriguez A and Mota MM.The silent path to thousands of merozoites:the Plasmodium liver stage.Nat Rev Microbiol2006;4:849-56.

[0059] 4.Clyde DF,McCarthy VC,Miller RM and Hornick RB.Specifity of protection of man immunized against sporozoite-induced falciparum malaria.Am J Med Sci 1973;266:398-403.

[0060] 5.Mueller AK,Labaied M,Kappe SH and Matuschewski K.Genetically modified Plasmodium parasites as a protective experimental malaria vaccine.Nature 2005;433:164-7.

[0061] 6.Butler NS,Schmidt NW,Vaughan AM,Aly AS,Kappe SH and Harty JT.Superior antimalarial immunity after vaccination with late liver stage-arresting genetically attenuated parasites.Cell Host Microbe 2011;9:451-62.

[0062] 7.Kumar KA,Sano G,Boscardin S,et al.The circumsporozoite protein is an immunodominant protective antigen in irradiated sporozoites.Nature2006;444:937-40.

[0063] 8.Mauduit M,Gruner AC,Tewari R,et al.A role for immune responses against non-CS components in the cross-species protection induced by immunization with irradiated malaria sporozoites.PLoS One 2009;4:e7717.

[0064] 9.Gruner AC,Mauduit M,Tewari R,et al.Sterile protection against malaria is independent of immune responses to the circumsporozoite protein.PLoS One 2007;2:e1371.

[0065] 10.Annoura T,Ploemen IH,van Schaijk BC,et al.Assessing the adequacy of attenuation of genetically modified malaria parasite vaccine candidates.Vaccine 2012.

[0066] 11.Tewari R,Spaccapelo R,Bistoni F,Holder AA and Crisanti A.Function of region I and II adhesive motifs of Plasmodium falciparum circumsporozoite protein in sporozoite motility and infectivity.J Biol Chem2002;277:47613-8.

[0067] 12.Jimenez-Diaz MB,Mulet T,Viera S,et al.Improved murine model of

malaria using Plasmodium falciparum competent strains and non-myelodepleted NOD-scid IL2Rgamma null mice engrafted with human erythrocytes. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:4533-6.

[0068] 13. Schwenk RJ, Richie TL. Protective immunity to pre-erythrocytic stage malaria. Trends Parasitol 2011;27:306-14.

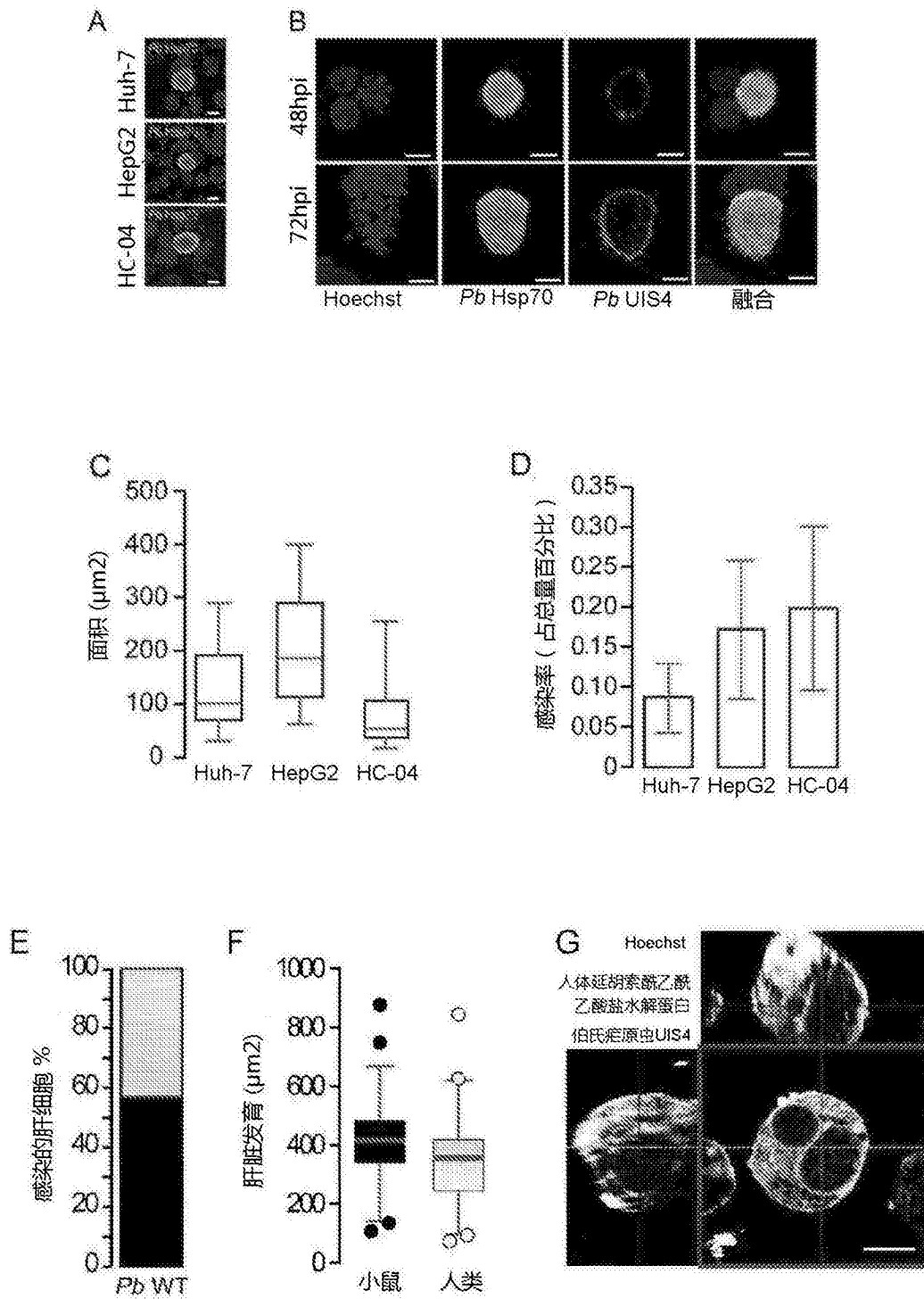


图1

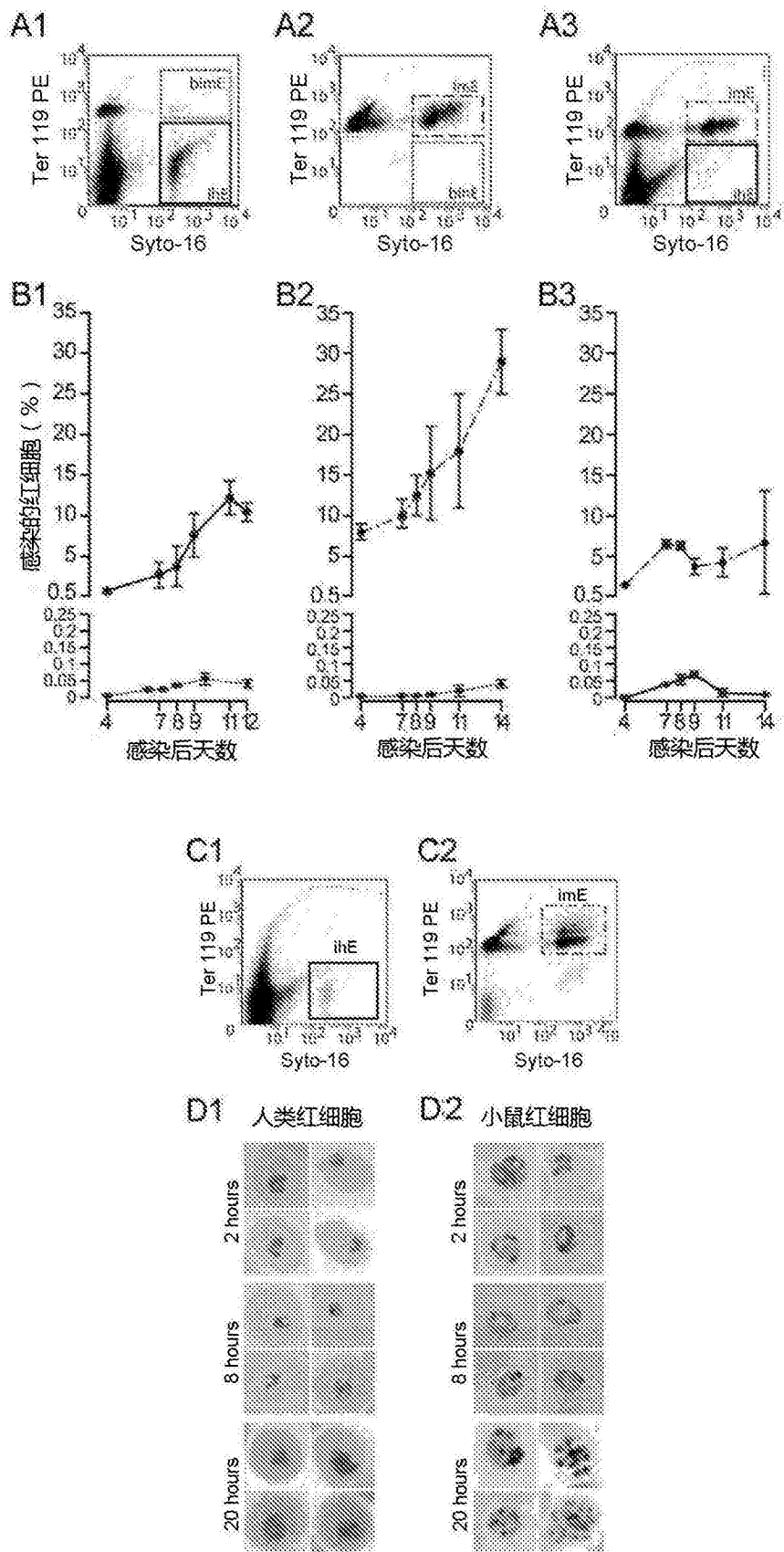
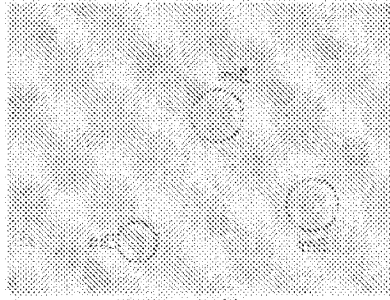


图2a

E



光学显微镜

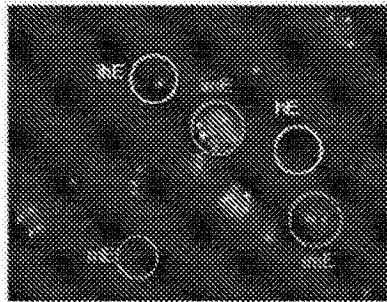
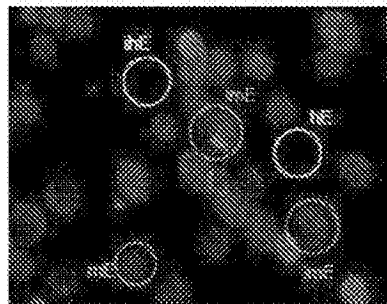
免疫荧光显微镜
(DAPI:核)免疫荧光显微镜
(TER-119:啮齿动物红细胞)

图2b

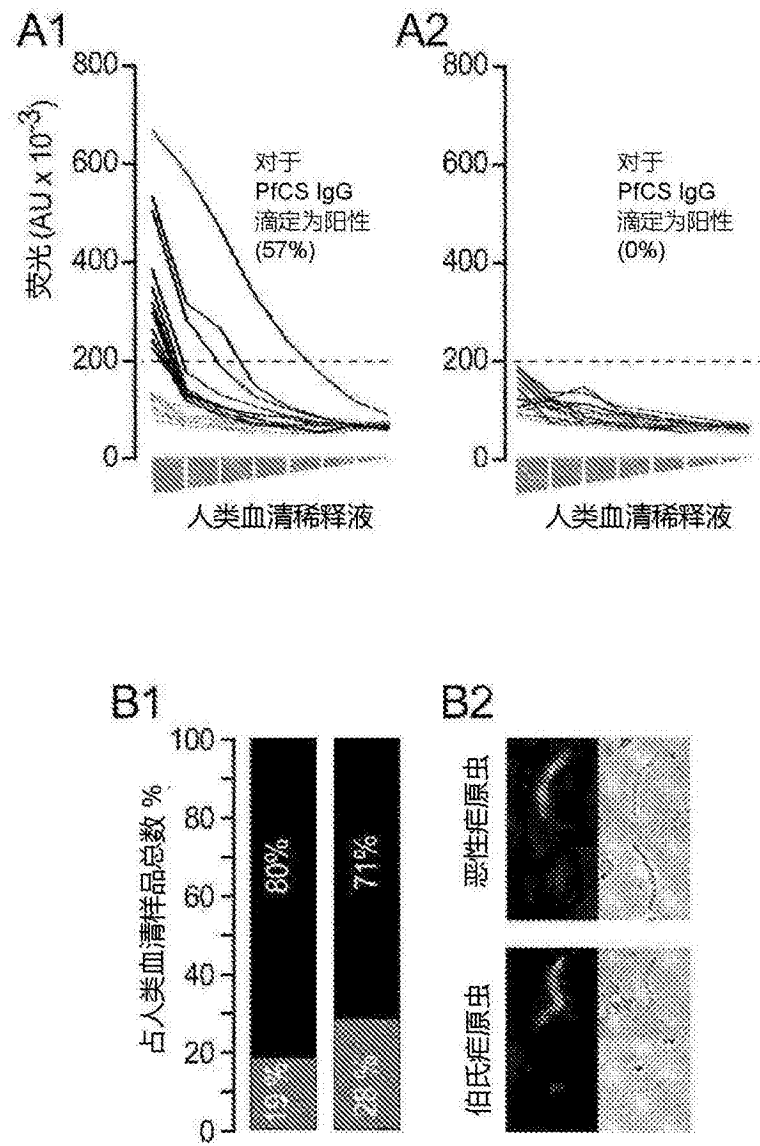


图3

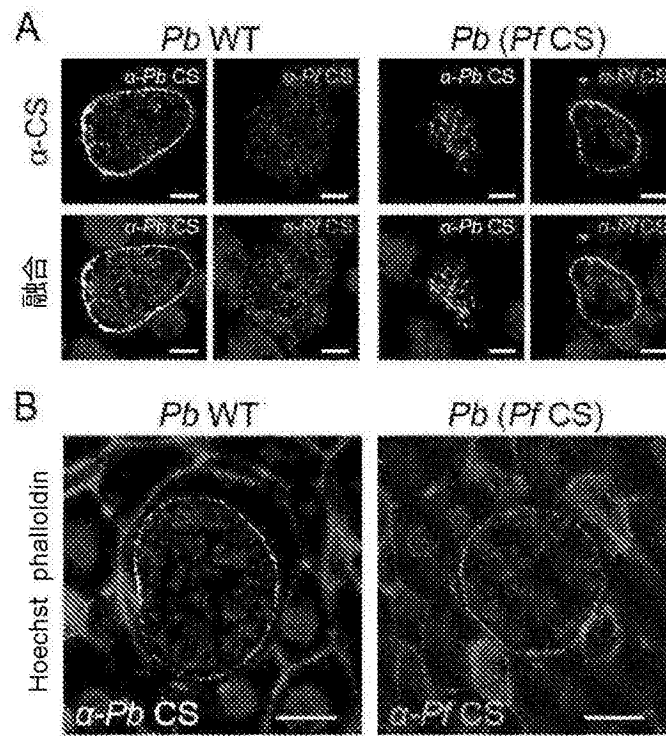


图4

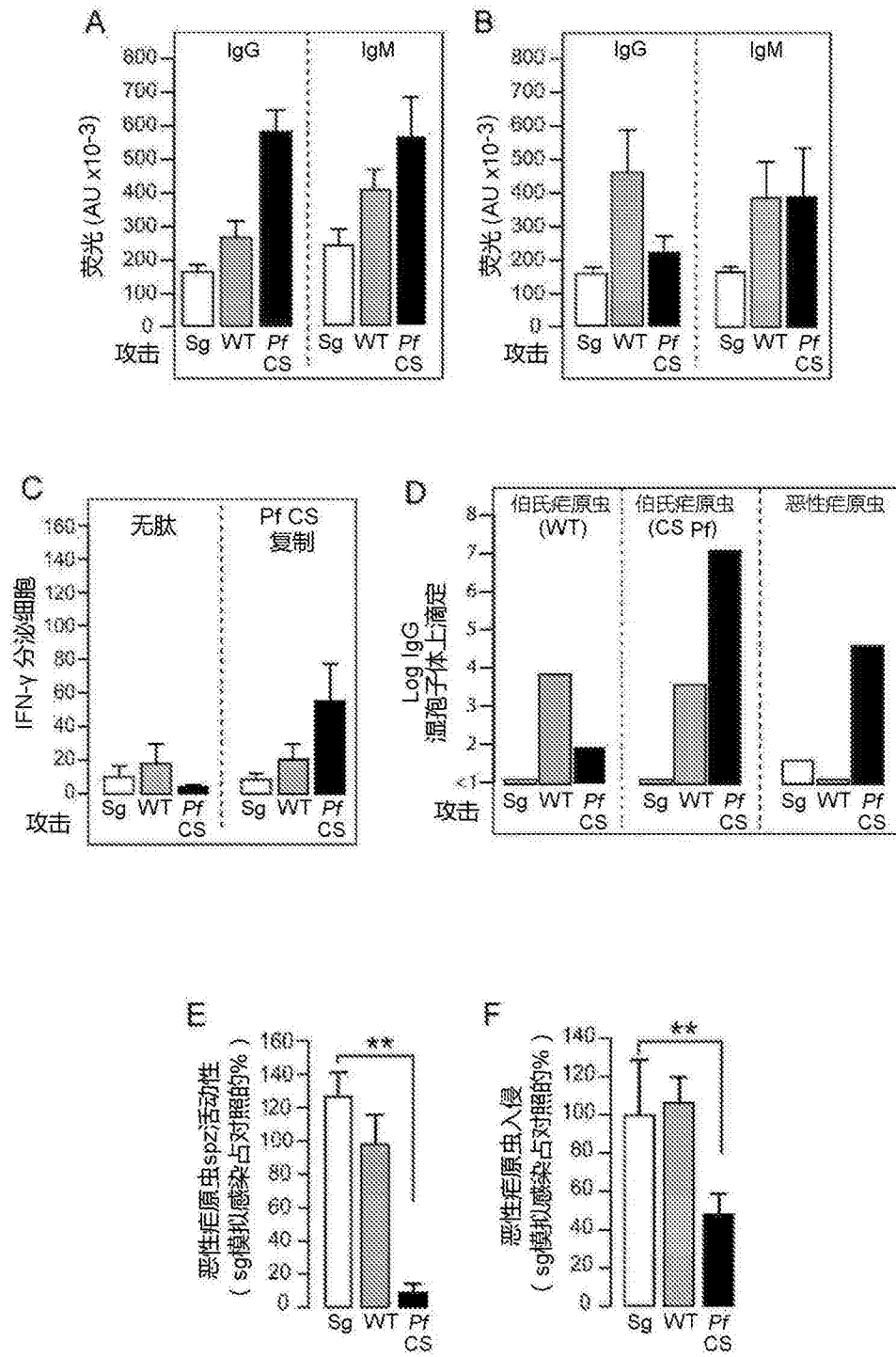


图5