

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580034802.3

[43] 公开日 2007年11月7日

[11] 公开号 CN 101068568A

[22] 申请日 2005.10.13

[21] 申请号 200580034802.3

[30] 优先权

[32] 2004.10.14 [33] US [31] 60/619,056

[32] 2004.10.14 [33] EP [31] 04105035.2

[86] 国际申请 PCT/EP2005/055209 2005.10.13

[87] 国际公布 WO2006/040334 英 2006.4.20

[85] 进入国家阶段日期 2007.4.12

[71] 申请人 克鲁塞尔荷兰公司

地址 荷兰莱顿

共同申请人 葛兰素史克生物制品股份公司
以沃尔特里德军事研究所的名义，
由陆军部部长代表的美国政府

[72] 发明人 马利亚·格拉西亚·帕乌

杰普·古德斯米特

约瑟夫·D·科恩

帕特里斯·M·杜波依斯

V·安·斯图尔特

唐纳德·海普纳尔

[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 3 页 说明书 45 页 附图 12 页

[54] 发明名称

抗疟疾的初始/加强免疫疫苗

[57] 摘要

本发明涉及新的疫苗疗法，其中实施的特异性初始/加强免疫疗法使用了携带编码恶性疟原虫抗原的核酸的中和程度低的重组腺病毒载体和纯化的重组蛋白质疫苗例如 RTS, S，以及合适的佐剂。

1. 一种试剂盒，其包含：
 - 存在于药用可接受的赋形剂中的复制缺陷型重组腺病毒，所述腺病毒包含编码来自引起疟疾的寄生虫的环孢子 (CS) 抗原的异源核酸；和
 - 佐剂化的蛋白质抗原；其中所述重组腺病毒选自人类腺病毒血清型 11、24、26、34、35、48、49 和 50。
2. 权利要求 1 的试剂盒，其中所述重组腺病毒是人类腺病毒血清型。
3. 权利要求 1 或 2 的试剂盒，其中所述蛋白质抗原包含来自引起疟疾的寄生虫的 CS 蛋白或其免疫原性片段。
4. 权利要求 3 的试剂盒，其中所述蛋白质抗原包含形式为与乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 形成脂蛋白颗粒的、与 HBsAg 融合的 CS 蛋白或其免疫原性片段的杂合蛋白。
5. 权利要求 4 的试剂盒，其中所述蛋白质抗原包含 RTS,S。
6. 权利要求 1-5 中任一项的试剂盒，其中所述蛋白质抗原以包含 QS21 和 3D-MPL 的佐剂进行佐剂化。
7. 权利要求 6 的试剂盒，其中所述佐剂还包含含有胆固醇的脂质体。
8. 权利要求 1-7 中任一项的试剂盒，其中所述引起疟疾的寄生虫是恶性疟原虫。
9. 权利要求 1-8 中任一项的试剂盒，其中所述异源核酸经过密码子优化以提高所编码的蛋白质在哺乳动物中、优选地在人类中的产生。
10. 权利要求 1-9 中任一项的试剂盒，其中所述重组腺病毒与佐剂存在于一混合物中。

11. 一种试剂盒，其包含：

- 存在于药用可接受的赋形剂中的复制缺陷型重组猴腺病毒、犬腺病毒或牛腺病毒，所述腺病毒包含编码经密码子优化的来自恶性疟原虫的环孢子 (CS) 抗原的异源核酸；和

- 包含 RTS,S 的佐剂化的蛋白质抗原。

12. 权利要求 11 的试剂盒，其中所述蛋白质抗原以包含 QS21 和 3D-MPL 的佐剂进行佐剂化。

13. 权利要求 12 的试剂盒，其中所述佐剂还包含含有胆固醇的脂质体。

14. 权利要求 1-13 中任一项的试剂盒，其中所述复制缺陷型重组腺病毒是初始免疫组合物，且所述佐剂化的蛋白质抗原是加强免疫组合物。

15. 包含编码来自引起疟疾的寄生虫的 CS 抗原的异源核酸的复制缺陷型重组腺病毒以及佐剂化的蛋白质抗原在制备用于治疗或预防疟疾的药物中的用途，其中所述重组腺病毒是猴腺病毒、犬腺病毒或牛腺病毒或人类腺病毒血清型 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 或 50。

16. 权利要求 15 的用途，其中所述复制缺陷型重组腺病毒用作初始免疫组合物，且所述佐剂化的蛋白质抗原用作加强免疫组合物。

17. 权利要求 15 或 16 的用途，其中所述蛋白质抗原包含来自引起疟疾的寄生虫的 CS 蛋白或其免疫原性片段。

18. 权利要求 15-17 中任一项的用途，其中所述引起疟疾的寄生虫是恶性疟原虫。

19. 权利要求 15-18 中任一项的用途，其中所述蛋白质抗原包含形式为与乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 形成脂蛋白颗粒的、与 HBsAg 融合的 CS 蛋白或其免疫原性片段的杂合蛋白。

20. 权利要求 19 的用途，其中所述佐剂化的蛋白质抗原包含 RTS,S。

21. 权利要求 15-20 中任一项的用途，其中所述蛋白质抗原以 QS21 和 3D-MPL 进行佐剂化。

22. 权利要求 15-21 中任一项的用途，其中所述异源核酸经过密码子优化以提高所编码的蛋白质在哺乳动物中、优选地在人类中的产生。

23. 对哺乳动物进行抗疟疾感染免疫接种的方法，包括以下步骤：

- 以存在于药用可接受的赋形剂中的复制缺陷型重组腺病毒对所述哺乳动物进行初始免疫，所述腺病毒包含编码来自引起疟疾的寄生虫的 CS 抗原的异源核酸；和

- 以佐剂化的蛋白质抗原对所述哺乳动物进行加强免疫，所述蛋白质抗原包含形式为与乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 形成脂蛋白颗粒的、与 HBsAg 融合的 CS 蛋白或其免疫原性片段的杂合蛋白。

24. 权利要求 23 的方法，其中所述蛋白质抗原包含 RTS,S。

25. 权利要求 23 或 24 的方法，其中所述重组腺病毒是人类腺病毒、猴腺病毒、犬腺病毒或牛腺病毒。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述重组腺病毒是选自人类腺病毒血清型 11、24、26、34、35、48、49 和 50 中的人类腺病毒。

27. 权利要求 23-26 中任一项的方法，其中所述蛋白质抗原以 QS21 和 3D-MPL 进行佐剂化。

28. 权利要求 23-27 中任一项的方法，其中所述引起疟疾的寄生虫是恶性疟原虫。

29. 权利要求 23-28 中任一项的方法，其中所述异源核酸经过密码子优化以提高所编码的蛋白质在哺乳动物中、优选地在人类中的产生。

30. 使用权利要求 1-14 中任一项的试剂盒对哺乳动物进行抗疟疾感染免疫接种的方法。

31. 使用权利要求 14 的试剂盒对哺乳动物进行抗疟疾感染免疫接种的方法，其中所述加强免疫之后再进行一次或多次后续加强免疫。

抗疟疾的初始/加强免疫疫苗

技术领域

本发明涉及医学领域。具体而言，本发明涉及采用重组方法产生的腺病毒载体和纯化蛋白、并与佐剂相结合用于预防恶性疟疾的新的初始/加强免疫 (prime/boost) 疫苗策略。

背景技术

当前，疟疾在全世界是热带和亚热带地区最为流行的感染疾病之一。每年，疟疾感染在发展中国家造成大约两百七十万人死亡。疟疾广泛流行和发病率升高的原因在于耐药寄生虫和抗杀虫剂的寄生虫载体数量的增加。其他因素包括环境和气候的改变、国家动荡以及人口流动性增加。

疟疾是由属于疟原虫属的、由蚊媒传播的血液内原生动物寄生虫引起的。对人类致病的有 4 种疟原虫（恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫 (*P. vivax*)、卵形疟原虫 (*P. ovale*) 和三日疟原虫 (*P. malariae*)）；其他多种则在动物中引起疾病，例如约氏疟原虫 (*P. yoelii*) 和柏格氏鼠疟原虫 (*P. berghei*)。人类感染大多由恶性疟原虫导致，并且是致死率最高的类型。疟原虫的生命周期由 4 个不同的阶段组成。这些阶段中的每一个均能够诱导针对这种寄生虫以及相应出现的阶段特异性抗原的特异性免疫应答，不过，自然发生的疟疾不能产生抗再次感染的保护性。

疟疾寄生虫由若干种雌性按蚊传播给人类。被感染的蚊子将来自疟原虫的子孢子注射到哺乳动物的血流中。子孢子在侵入肝细胞前在循环中停留几分钟。在这一阶段，寄生虫处于细胞外环境中，可以受到抗体

的攻击，这些抗体主要针对的是环孢子(circumsporozoite, CS) 蛋白，后者是子孢子表面的主要成分。一旦进入肝脏，寄生虫即可复制并成为裂殖体。在这一阶段，侵入性寄生虫将进行无性繁殖，在每个感染的细胞中产生多达 20,000 个姊妹裂殖子。在寄生虫的这一细胞内阶段，宿主免疫应答的主要角色是 T-淋巴细胞，特别是 CD8+ T-淋巴细胞 (Romero et al. 1989)。大约在感染肝脏一周后，数千裂殖子释放至血流中并进入红细胞 (RBC)，成为抗体介导的免疫应答和 T 细胞分泌的细胞因子的靶位。侵入红细胞后，裂殖子历经若干阶段的复制，转变为滋养体和裂殖体，它们破裂后产生新一代的裂殖子，继而感染新的 RBC。红细胞阶段与明显的临床疾病相关。少量滋养体可成为雄性或者雌性配子母细胞，这是寄生虫的有性阶段。当易感的蚊子吞入配子母细胞时，这些配子发生受精，形成合子，随后转变为动合子，然后转变为卵囊，且最终转变为子孢子，子孢子迁移至唾液腺以完成周期。

寄生虫进入体内后出现的病原体特异性免疫应答的两个主要方面是细胞应答和体液应答，细胞应答这一方面涉及参与免疫应答的 CD8+和 CD4+ T 细胞。细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 表达 CD8 并能够特异性杀伤表面表达病原体抗原的感染细胞。CD4+ T 细胞或 T 辅助细胞支持 CTL 的产生，产生各种细胞因子，并且还帮助诱导 B 细胞分裂并产生特异于抗原的抗体。在体液应答中，特异于具体抗原的 B 细胞被激活，复制、分化并产生抗原特异性抗体。

免疫应答的这两方面均与抗疟疾感染的保护作用相关。当感染性子孢子移至肝脏并进入肝细胞后，子孢子成为细胞内病原体，极少出现在感染细胞外。在这一阶段，CD8+ T 细胞和 CD4+ T 细胞是尤其重要的，这是由于 T 细胞及其细胞因子产物例如干扰素- γ (IFN- γ)，可杀死感染的宿主肝细胞。在鼠科动物模型中发现，肝脏细胞内的寄生虫的清除依赖于针对肝脏阶段寄生虫所表达的肽的 CD8+ T 细胞应答 (Hoffman and Doolan, 2000)。去除 CD8+ T 细胞可消除抗子孢子攻击的不户作用，而

给未经过试验的动物 (naïve animals) 过继性转移 CD8+ T 细胞则可使之得到保护。

当疟疾感染达到裂殖子在 RBC 内复制的红细胞阶段时, 裂殖子也随血流到处循环。由于红细胞不表达用于与 T 细胞发生同源相互作用 (cognate interaction) 的 I 类或 II 类 MHC 分子, 因此认为在这一阶段抗体应答最为重要。总之, 如果能够诱导强的细胞免疫应答以及强的体液免疫应答来对付寄生虫在人体中的各个不同阶段, 那么这样的的疟疾疫苗策略将是最为有益的。

根据如上所述的寄生虫的不同发育阶段可以对当前的开发疟疾疫苗的方法进行分类。可以将可能的疫苗分为 3 种类型:

- 前红细胞疫苗 (Pre-erythrocytic vaccines), 它们针对的是被子孢子和/或裂殖体感染的肝细胞。在历史上, 基于(CS)的策略一直占据着这一方法的主导地位。由于前红细胞阶段的感染没有症状, 因此理想地, 前红细胞疫苗应该产生由体液和细胞免疫应答介导的无菌免疫 (sterile immunity), 并完全预防潜伏的疟疾感染。
- 无性血液阶段疫苗, 它们针对的是被感染的 RBC 或者裂殖子本身, 其被设计为用于尽量减轻临床症状的严重程度。这些疫苗应该能够降低发病率和死亡率, 并可预防寄生虫进入红细胞和/或在其中繁殖。
- 阻断传播疫苗, 它们被设计用于妨碍寄生虫在蚊子宿主内的发育。这一类型的疫苗应该有助于降低整个人群的疟疾感染率。

最后, 一直在所谓的多成分和/或多阶段疫苗中寻求开发针对寄生虫生命周期的多个阶段的组合疟疾疫苗的可行性。

尽管抗疟疾疫苗的开发早在 30 多年前就开始了, 但现在还没有商品化的抗疟疾疫苗。以辐照减毒的子孢子免疫啮齿动物、非人类灵长类动物和人类可产生抗随后以活孢子攻击的保护作用 (Nussenzweig et al.

1967; Clyde et al. 1973)。不过，费用问题以及缺乏用于生产经照射的孢子的可行的大规模培养体系目前仍然妨碍此类疫苗的广泛应用 (Luke et al. 2003)。

迄今为止，在人类中测试的最为有前途的候选疫苗一直基于少数孢子表面抗原。CS 蛋白是已经被证实的当其在人类作为抗蚊媒感染的活性免疫基础时能够稳定预防疟疾的唯一的恶性疟原虫抗原，尽管预防的水平经常是不充分的。理论分析指出，疫苗的覆盖率以及疫苗的功效应应该高于 85%，否则，致病力更强的突变体会逃脱进入疫区 (Gandon et al. 2001)。

在哺乳动物诱导免疫应答的一种方式是通过施用感染性载体，在其基因组中载有编码抗原的核酸。此类载体之一是重组腺病毒，该病毒已经通过去除基因组中通常是复制不可缺少的区域 (例如 E1 区) 而成为复制缺陷型。包含编码抗原的基因的重组腺病毒的实例是本领域已知的 (WO 96/39178)。例如，已经证实，如果通过重组腺病毒输送来自 HIV 的抗原性成分，可产生免疫应答 (WO 01/02607; WO 02/22080; US 6,733,993)。对于疟疾，已经开发出了基于重组腺病毒的疫苗。这些载体表达约氏疟原虫的完整 CS 蛋白，约氏疟原虫是小鼠疟疾模型之一，且已经发现这些载体能够应答于单一免疫剂量而在小鼠中诱导无菌免疫 (Bruña-Romero et al. 2001)。已经证实，CD8+ T 细胞主要介导这种腺病毒诱导的保护作用。

由于很高比例的个体对通常使用的腺病毒载体例如腺病毒血清型 5 (Ad5) 存在已有的免疫力，因此本领域曾开发的新的技术，其中的重组复制缺陷型腺病毒是基于仅在一小部分健康个体中遇到以中和抗体形式存在的已有的免疫力的血清型。这些血清型通常被成为中和程度低的血清型 (low-neutralized serotypes) 或者少见血清型。已经发现 Ad11, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad48, Ad49 和 Ad50 特别适用 (WO 00/70071; WO 02/40665; WO 2004/037294; WO 2004/083418; Vogels et al. 2003)。

Vical, Inc. San Diego, CA, USA 和 Naval Medical Research Center (Horn et al. 1995) 开发了含有表达恶性疟原虫 CS 蛋白的质粒的基于 DNA 的疫苗。小鼠模型的研究证实以质粒 DNA 免疫之后诱导了抗原特异性 CTL 和抗体应答 (Doolan et al. 1998)。不过, 目前唯一使用的 DNA 疫苗在人类诱导保护性免疫应答的作用并不理想。在使用 DNA 疫苗时发现被接种的志愿者没有出现抗 CS 蛋白的抗体, 这是通过针对风干的孢子孢子的间接荧光抗体测试 (IFAT) 以及通过抗重组及合成肽的 ELISA 而评估的 (Wang et al. 2001), 不过, 这些志愿者的 CTL 应答很明显。

与此不同的是, RTS,S (纯化蛋白) 疟疾疫苗方法 (Gordon et al. 1995; US 6,306,625; WO 93/10152) 能够诱导针对 CS 蛋白的强抗体应答 (Kester et al. 2001; Stoute et al. 1997 and 1998), 不过其也是 Th1 型细胞免疫和体液免疫的强效诱导剂。最重要的是, 该疫苗能够可重复性地使大约半数接受疫苗者得到保护。不过, 由 RTS,S 引发的保护作用持续时间较短 (Stoute et al. 1998)。以 RTS,S 免疫诱导抗 CS 抗体和 CD4+ T 细胞依赖性 IFN- γ 诱导, 但 CD8+ T 细胞依赖性 CTL 或 IFN- γ 应答较弱 (Lalvani et al. 1999)。不过, 已经证实所产生的此类最低限度的 CD8+ 应答与人类试验中的保护作用相关 (Sun et al. 2003)。因此, 合理的改进应该是集中在增强诱导由 RTS,S 诱导的针对 CS 的 CD8+ T 细胞应答。

迄今尚未达到开发具有至少 85% 的保护效力的恶性疟疾疫苗这一目标。这一任务特别困难之处在于, 不同于其他常见致命疾病例如麻疹和天花, 先前感染过疟疾以及所产生的天然免疫力对以后的疟疾感染没有保护作用。在迄今已经测试过的所有候选疫苗和疫苗输送策略中, 仅 RTS,S 一直稳定地产生了一定水平的保护作用。其他所测试的候选疫苗或者是免疫原性不足, 或者是具有免疫原性但保护性不充分。本申请公开的策略在于组合疫苗制剂, 其利用蛋白质/佐剂方法的最佳的血清学免疫原性并通过重组复制缺陷型腺病毒载体出色地诱导细胞应答。

附图说明

图 1: 异源初始/加强免疫疫苗接种疗法 (Heterologous prime/boost vaccination regimens), 随后通过 IFN- γ ELISPOT 分析测定与 CS 的 C 末端有关的 T 细胞应答。在末次加强免疫 2 周后测定应答。水平方向的短线代表几何平均值。

图 2: 通过 IFN- γ ELISPOT 分析测定与 CS 的 C 末端有关的 T 细胞应答。在末次加强免疫 3 个月后测定应答。水平方向的短线代表几何平均值。

图 3: 通过 ELISA 测定与 CS 的重复区有关的抗体应答, 加强免疫后 2 周。水平方向的短线代表几何平均值。

图 4: 通过 ELISA 测定与 CS 的重复区有关的抗体应答, 加强免疫后 3 个月。水平方向的短线代表几何平均值。

图 5: T 细胞应答, 实验中以重组 Ad35-CS 载体初始免疫并以 RTS,S 或 Ad35-CS 加强免疫, 2 周(左)或者 3 个月(右)后通过 IFN- γ ELISpot 进行测定。使用同源初始/加强/加强免疫疗法 RTS,S/RTS,S/RTS,S 作为参照。

图 6: 抗体应答, 实验中以重组 Ad35-CS 载体初始免疫并以 RTS,S 或 Ad35-CS 加强免疫, 2 周(左)或者 3 个月(右)后通过 ELISA 进行测定。使用同源初始/加强/加强免疫疗法 RTS,S/RTS,S/RTS,S 作为参照。

图 7: T 细胞应答, 实验中以重组 Ad35-CS 载体加强免疫并以 RTS,S 或 Ad35-CS 初始免疫, 2 周(左)或者 3 个月(右)后进行测定。使用同源初始/加强/加强免疫疗法 RTS,S/RTS,S/RTS,S 作为参照。

图 8: 抗体应答, 实验中以重组 Ad35-CS 载体加强免疫并以 RTS,S 或 Ad5-CS 初始免疫, 2 周(左)或者 3 个月(右)后进行测定。使用同源初始/加强/加强免疫疗法 RTS,S/RTS,S/RTS,S 作为参照。

图 9: 加强免疫后 2 周, 通过 IFN- γ ELISPOT 分析测定与 CS 的 N 末端有关的 T 细胞应答。水平方向的短线代表几何平均值。

图 10: 加强免疫后 3 个月, 通过 IFN- γ ELISPOT 分析测定与 CS 的 N 末端有关的 T 细胞应答。水平方向的短线代表几何平均值。

图 11: 针对 N 末端的 T 细胞应答, 实验中以重组 Ad35-CS 载体初始免疫并以 RTS,S 或 Ad35-CS 加强免疫, 2 周(左)或者 3 个月(右)后进行测定。使用同源初始/加强/加强免疫疗法 RTS,S/RTS,S/RTS,S 作为参照。

图 12: 针对 N 末端的 T 细胞应答, 实验中以重组 Ad35-CS 载体加强免疫并以 RTS,S 或 Ad5-CS 初始免疫, 2 周(左)或者 3 个月(右)后进行测定。使用同源初始/加强/加强免疫疗法 RTS,S/RTS,S/RTS,S 作为参照。

发明内容

本发明涉及一种试剂盒, 其包含: 存在于合适的赋形剂中的复制缺陷型重组腺病毒, 所述腺病毒包含编码来自引起疟疾的寄生虫的环孢子 (CS) 抗原的异源核酸; 和佐剂化的蛋白质抗原, 其优选地也来自引起疟疾的寄生虫; 其中所述重组腺病毒选自人类腺病毒血清型 11、24、26、34、35、48、49 和 50。优选的蛋白质抗原包含 RTS,S。优选的引起疟疾的寄生虫是恶性疟原虫。

在另一个实施方式中, 本发明还涉及包含编码来自引起疟疾的寄生虫的 CS 抗原的异源核酸的复制缺陷型重组腺病毒以及佐剂化的蛋白质抗原 (其优选地来自引起疟疾的寄生虫例如恶性疟原虫) 在制备用于治疗或预防疟疾的药物中的用途, 其中所述重组腺病毒是猴腺病毒或人类腺病毒血清型 11、24、26、34、35、48、49 或 50。

本发明公开了一些优选的初始-加强免疫疗法, 其中优选地将复制缺陷型重组腺病毒用作初始免疫组合物, 而将佐剂化的蛋白质抗原用作加强免疫组合物。

本发明还涉及对哺乳动物进行抗疟疾感染免疫接种的方法, 其步骤包括以存在于合适的赋形剂中的复制缺陷型重组腺病毒对所述哺乳动物进行初始免疫, 所述腺病毒包含编码来自引起疟疾的寄生虫的 CS 抗原

的异源核酸；并以佐剂化的蛋白质抗原、优选地为 RTS,S，对所述哺乳动物进行加强免疫。

发明详述

本发明涉及一种试剂盒，其包含存在于药用可接受的赋形剂中的复制缺陷型重组腺病毒，所述腺病毒包含编码来自引起疟疾的寄生虫的环孢子 (CS) 抗原的异源核酸；和佐剂化的蛋白质抗原；其中所述重组腺病毒选自人类腺病毒血清型 11、24、26、34、35、48、49 和 50。优选地，所述重组腺病毒是人类腺病毒血清型 35。同样优选的是本发明的一种试剂盒，其中所述蛋白质抗原包含来自引起疟疾的寄生虫的 CS 蛋白或其免疫原性片段。所述蛋白质抗原优选地包含形式为与乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 形成脂蛋白颗粒的、与 HBsAg 融合的 CS 蛋白或其免疫原性片段的杂合蛋白 (hybrid protein)。在另一个优选的实施方式中，蛋白质抗原包含 RTS,S。同样优选的是所述蛋白质抗原以 QS21 和 3D-MPL 进行佐剂化，优选地与含有胆固醇的脂质体进行配制。

尽管本领域已知有不同的寄生虫在人类引起疟疾，本发明的一个实施方式是本发明的试剂盒，其中所述引起疟疾的寄生虫是恶性疟原虫。

为获得适当的免疫应答，优选地所述异源核酸经过密码子优化以提高所编码的蛋白质在哺乳动物中、优选地在人类中的产生。重组腺病毒可与佐剂存在于混合物中。

本领域普通技术人员熟知猴腺病毒可用于人类基因治疗和疫苗。除此之外，还发现其他一些非人类腺病毒例如犬腺病毒和牛腺病毒也能够体外感染人细胞，且由于它们在人的样品中的血清学流行程度 (seroprevalence) 较低，因此也适合用于人类。因此，本发明还涉及一种试剂盒，其包含存在于药用可接受的赋形剂中的复制缺陷型重组猴腺病毒、犬腺病毒或牛腺病毒，所述腺病毒包含编码密码子优化的来自恶性疟原虫的环孢子 (CS) 抗原的异源核酸；和包含 RTS,S 的佐剂化的蛋

白质抗原，其中优选地所述蛋白质抗原以 QS21 和 3D-MPL 进行佐剂化，优选地与含有胆固醇的脂质体存在于一配制品中。

根据本发明，如果将本发明的试剂盒的不同成分以特定的顺序进行施用，则本发明的特定的初始-加强免疫疗法在免疫应答方面可产生预料不到的显著效果。因此，本发明还涉及本发明的一种试剂盒，其中所述复制缺陷型重组腺病毒是初始免疫组合物，而所述佐剂化的蛋白质抗原是加强免疫组合物。单次施用疫苗 (初始免疫) 所引发的免疫应答通常不足以有效地和/或持久地提供有效的保护，而重复施用 (加强免疫) 则能够显著增强针对疫苗抗原的体液和细胞应答 (例如见 Estcourt et al. 2002)。

本发明还涉及包含编码来自引起疟疾的寄生虫的 CS 抗原的异源核酸的复制缺陷型重组腺病毒以及佐剂化的蛋白质抗原在制备用于治疗或预防疟疾的药物中的用途，其中所述重组腺病毒是猴腺病毒、犬腺病毒或牛腺病毒或者人类腺病毒血清型 11、24、26、34、35、48、49 或 50，其中优选地将复制缺陷型重组腺病毒用作初始免疫组合物，而将佐剂化的蛋白质抗原用作加强免疫组合物。本发明的实施方式涉及本发明的用途，其中所述蛋白质抗原包含来自引起疟疾的寄生虫的 CS 蛋白或其免疫原性片段，优选地来恶性疟原虫。所述蛋白质抗原优选地包含形式为与乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 形成脂蛋白颗粒的、与 HBsAg 融合的 CS 蛋白或其免疫原性片段的杂合蛋白。RTS,S 优选地是佐剂化的蛋白质抗原，而优选的佐剂是 QS21 和 3D-MPL，优选地与含有胆固醇的脂质体存在于一配制品中。

为了在哺乳动物中、优选地在人类中实现最佳表达并随后产生最佳的免疫应答，本发明所用的异源核酸经过密码子优化以提高所编码的蛋白质在哺乳动物中、优选地在人类中的产生。

在另一个实施方式中，对哺乳动物进行抗疟疾感染免疫接种的方法以下步骤：以存在于药用可接受的赋形剂中的复制缺陷型重组腺病毒对

所述哺乳动物进行初始免疫，所述腺病毒包含编码来自引起疟疾的寄生虫的 CS 抗原的异源核酸；并以佐剂化的蛋白质抗原对所述哺乳动物进行加强免疫，所述佐剂化的蛋白质抗原包含形式为与 HBsAg 形成脂蛋白颗粒的、与 HBsAg 融合的 CS 蛋白或其免疫原性片段的杂合蛋白。蛋白质抗原优选地包含 RTS,S，其中优选的佐剂是 QS21 和 3D-MPL，其优选地与含有胆固醇的脂质体存在于一配制品中，其中优选的引起疟疾的寄生虫是恶性疟原虫。

用于产生重组腺病毒以及本发明的方法中所用的优选的腺病毒可以是人类腺病毒或者非人类腺病毒，例如猴腺病毒、犬腺病毒和牛腺病毒，对于将要施用重组病毒的(人类)宿主，高度优选的腺病毒是不会在所述宿主中遭遇已经存在的免疫力的腺病毒。猴腺病毒和某些人腺病毒的血清型非常适合在此所述的这一目的。用于本发明的这些方法、用途以及试剂盒中的优选的人类腺病毒是人类腺病毒血清型 11、24、26、34、35、48、49 和 50。

本发明还涉及对哺乳动物进行抗疟疾感染免疫接种的方法，其中使用本发明的试剂盒。如果使用本发明的试剂盒、采用本发明的优选的初始-加强免疫疗法对哺乳动物进行抗疟疾感染免疫接种，那么优选地在加强免疫之后进行一或多次后续加强免疫。

本发明涉及重组腺病毒作为至少一种疟疾抗原的载体并与一种佐剂蛋白异源组合使用在初始/加强免疫疗法中的用途。就初期的 T 细胞应答 (initial T cell response) 和免疫应答的持续时间而言，将病毒载体与佐剂化的蛋白组合使用用于异源初始/加强免疫疗法，可给灵长类提供优越的免疫应答，这一发现是令人惊异的。具体而言，已经发现，以携带编码抗原的核酸的病毒载体对哺乳动物进行初始免疫，继以单次或者多次注射佐剂化的蛋白质抗原的后续加强免疫，可在定量和/或定性免疫应答方面得到优越的结果。优选的病毒载体是腺病毒载体，更加优选的是人类腺病毒载体，且进一步更加优选的是那些施用于哺乳动物宿主后在宿主

体内仅遭遇低水平中和活性 (neutralizing activity) 的人类腺病毒载体。特别优选的血清型是腺病毒 11、24、26、34、35、48、49 和 50。

根据一个优选的实施方式，所述蛋白质抗原和由所述病毒载体编码的抗原是疟疾抗原，更加优选地是恶性疟原虫环孢子(CS) 蛋白、或其免疫原性衍生物和/或片段。作为本发明的一个实例，由病毒载体编码的多肽包含编码恶性疟原虫 CS 蛋白的核酸，所述 CS 蛋白包括 N 端部分、中央部分重复区、以及 C 端部分 (缺失了最 C 端的 14 个氨基酸:GPI 锚序列)，而所述蛋白质抗原包含构建体 RTS,S，其缺乏 N 端区域。

用于本发明的任一或者所有方面的佐剂化的蛋白质抗原可包含来自恶性疟原虫的 CS 蛋白或其免疫原性片段，其形式可以是融合蛋白。例如，抗原可包含与乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 融合的 CS 蛋白或免疫原性片段的杂合蛋白，该杂合蛋白可在原核或者真核宿主细胞中表达，并具有脂蛋白颗粒的形式。所述融合蛋白可包含例如 CS 蛋白的基本上整个 C 端部分、4 个或者更多个串联重复的免疫显性区域 (immunodominant region)、和乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)。例如，杂合蛋白包含一序列，该序列含有至少 160 个氨基酸并与 CS 蛋白的 C 端部分基本同源，且可以缺乏 CS 蛋白的 C 端的末尾多个氨基酸，例如末尾的 10 个至 12 个氨基酸。该杂合蛋白的形式可以是混合的脂蛋白颗粒，例如与 HbsAg 形成的混合的脂蛋白颗粒。

具体而言，WO 93/10152 公开了一种杂合蛋白，其在 WO 93/10152 中被称为“RTS*”，但在本文中被称为“RTS”，其形式可以是与 HbsAg 形成的混合的脂蛋白颗粒，在本文中称为 RTS,S。在这些混合颗粒中，杂合蛋白:S 抗原的比率例如是 1:4。

在此称为“RTS”的杂合蛋白是使用来自恶性疟原虫 NF54 (克隆 3D7; Caspers et al. 1989) 的 CS 蛋白基因序列产生的，并基本上包含来自恶性疟原虫 NF54 的 CS 蛋白的整个 207 至 395 区域。包括于 RTS 中的 NF54 (3D7) CS 蛋白序列的部分是如下所示的 189 个氨基酸的序列:

DPNANPNANP NANPNANPNA NPNANPNANP NANPNANPNA NPNANPNANP
 NANPNANPNA NPNANPNANP NANPNKNNQG NGQGHNMPND PNRNVNENAN
 ANSAVKNNNN EEP SDKHIKE YLNKIQNSLS TEWSPCSVTC GNGIQVRIKP
 GSANKPKDEL DYANDIEKKI CKMEKCSSVF NVVNSSIGL (SEQ ID NO:1)。

具体的 RTS 是:

- 由来自酿酒酵母 (*Sacchromyces cerevisiae*) TDH3 基因序列的第 1059-1061 位核苷酸编码的甲硫氨酸残基 (该读码框的 1-1058 位核苷酸构成 TDH3 启动子本身) (Musti et al. 1983)
- 3 个氨基酸: Met Ala Pro, 来自通过用于构建杂合基因 (hybrid gene) 的克隆过程而产生的核苷酸序列 (1062-1070)。
- 由 1071-1637 位编码的一段 189 个氨基酸 (见上, SEQ ID NO:1), 其代表恶性疟原虫株 NF54 (克隆 3D7; Caspers et al. 1989) 的 CS 蛋白的 207 至 395 位氨基酸。
- 由 1638 至 1640 位核苷酸编码的氨基酸(Gly), 通过用于构建杂合基因的克隆过程而产生。
- 4 个氨基酸, Pro Val Thr Asn, 由 1641 至 1652 位核苷酸编码, 并代表乙型肝炎病毒 (adw 血清型) preS2 蛋白 (Valenzuela et al. 1979) 的 4 个羧基端氨基酸。
- 一段 226 个氨基酸, 由 1653 至 2330 位核苷酸编码, 且具体为乙型肝炎病毒 (adw 血清型) 的 S 蛋白 (Valenzuela et al. 1979)。

RTS 可以是混合颗粒的形式, 即 RTS,S, 其中 RTS:S 比率例如是 1:4。

尽管本发明决不限于疟疾抗原, 但在详细讲解本发明时使用的是编码疟疾抗原的病毒载体并结合佐剂化的蛋白质性疟疾抗原。本领域普通技术人员能够使用来自其他致病因素的不同的抗原性插入物和相应的蛋白质抗原对本发明的教导进行改动, 所述致病因素包括寄生虫、细菌、病毒、酵母、或者是自身抗原, 后者包括但不限于肿瘤抗原 (如 PSA、

gp100、CEA、MUC1、Her2/neu) 等等。

本发明涉及复制缺陷型重组腺病毒载体，其包含编码恶性疟原虫抗原的异源核酸。在优选的实施方式中，所述病毒载体是来自选自如下一组的血清型的腺病毒：Ad11, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad48, Ad49 和 Ad50。如此选择人类腺病毒的原因在于将一般的腺病毒用作疫苗载体通常存在障碍，因为人类普遍感染过野生型腺病毒，后者可引起轻度的或者不明显的疾病，例如普通感冒。当随后使用重组腺病毒血清型作为重组疫苗载体时，例如使用采用腺病毒的抗疟疾疫苗时，由亲代野生型血清型感染引起的免疫应答可负面影响重组腺病毒血清型的效力。不同腺病毒血清型在全世界人群中的传播随地理区域的不同而不同。通常，优选的血清型应该在世界上的绝大多数地区的宿主中遭遇较低的中和活性，现有技术对此已经有若干概括性的报道。

本发明人现将重组腺病毒与纯化蛋白的一种新的组合形式用于顺序免疫接种方案，在此称为异源初始/加强免疫，该方案利用的是由初始/加强免疫疫苗的不同组分所诱导的不同的免疫应答。重组载体的选择会受到重组载体在一小部分需要接种疫苗的人群中遭遇中和活性的影响。出乎意料的是，腺病毒载体化的抗原和佐剂化的蛋白质抗原较单独使用两者中的任何一种疫苗可产生明显增强的免疫应答。如本申请所公开的，通过对体内施用了疫苗的恒河猴的免疫应答进行体外测定可说明这种免疫力的增强。

在另一个实施方式中，重组复制缺陷型腺病毒是猴腺病毒，例如是自黑猩猩中分离的病毒。一些实例包括 C68 (也称为 Pan 9; US 6,083,716) 和 Pan 5、6 和 7 (WO 03/046124)。

在本发明的另一个具体方面，复制缺陷型重组病毒载体包含编码 CS 蛋白或其免疫原性部分或者片段的核酸序列。优选地，所述异源核酸序列经过密码子优化以增强在哺乳动物、优选地在人类中的表达。密码子优化基于感兴趣的哺乳动物的所需氨基酸含量、及其通常最佳的密

码子使用情况，并需要避免一些方面以确保适当的表达。这些方面可以是剪接供体或者受体位点、终止密码子、Chi 位点、poly(A)段、富含 GC 和 AT 序列、内部 TATA 盒、等等。哺乳动物宿主的密码子优化方法是本领域人员熟知的，且可参见一些分子生物学文献。

在优选的实施方式中，本发明涉及复制缺陷型重组腺病毒载体，其中所述异源核酸中腺嘌呤加胸腺嘧啶的含量与胞嘧啶加鸟嘌呤的含量相比低于 87%，优选地低于 80%，更加优选地低于 59%，且最优选地等于大约 45%。在一个实施方式中，本发明提供复制缺陷型重组腺病毒载体，其中 CS 蛋白是 WO 2004/055187 中公开的任一 CS 蛋白，最优选地是来自恶性疟原虫的 CS 蛋白或其免疫原性片段。

如何产生携带异源基因的重组腺病毒载体是本领域人员已知的，且通常包括使用包装细胞系、适配构建体 (adapter constructs) 和粘粒，并自腺病毒基因组中缺失 E1 区域的至少一个功能性部分 (包装系统和优选的细胞系可参见下文)。

本发明还涉及试剂盒，作为其成分，试剂盒一方面包含在宿主中遭遇较低中和活性的重组腺病毒载体，另一方面包含纯化的蛋白质，其中优选地所述纯化的蛋白质的形式为与佐剂形成的混合物。优选的佐剂是 QS21 和 3D-MPL，优选地与含有胆固醇的脂质体存在于一配制品中。在异源初始/加强免疫疫苗输送策略的成分中，优选地将重组腺病毒载体作为初始免疫剂而首先施用，然后将纯化蛋白作为加强免疫剂而施用，该加强免疫可重复一次以上。所述成分通常存在于药用可接受的载体中。药用可接受的载体是本领域熟知的且广泛用于各种治疗产品中。优选地，所述载体适合用于疫苗。更优选地，所述疫苗还包含佐剂。本领域熟知佐剂可进一步增强对所施用的抗原的免疫应答。本发明还涉及本发明的试剂盒在疟疾的治疗、预防或者诊断中的用途。

本发明涉及治疗哺乳动物的疟疾感染或者预防哺乳动物的疟疾感染的方法，所述方法包含 (按照任一顺序或者同时) 以下步骤：施用携带恶

性疟原虫抗原的重组腺病毒；并施用至少一种纯化的恶性疟原虫蛋白，所述蛋白与佐剂混合。优选地，所述重组腺病毒选自 Ad11, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad48, Ad49 和 Ad50，而重组腺病毒携带编码 CS 蛋白或其免疫原性片段的基因也是优选的。用于与重组腺病毒进行组合的优选的纯化蛋白是 RTS,S，而优选的佐剂是 QS21 和 3D-MPL，其优选地与含有胆固醇的脂质体存在于一配制品中。

产生免疫应答背后的驱动力是细胞因子，后者是多种已知的蛋白质信使，其作用在于辅助免疫系统的细胞并将最终的免疫应答导向 Th1 或者 Th2 应答。因此，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 型细胞因子倾向于诱导针对抗原的体液免疫应答。重要的是，Th1 和 Th2 型免疫应答的区别并非是绝对的。在实际情况中，个体将支持将免疫应答描述为是 Th1 占主导的或者 Th2 占主导的。不过，通常可方便地根据 Mosmann 和 Coffman (1989) 所述的鼠科 CD4⁺ T 细胞克隆的细胞因子家族对其加以考虑。通常，Th1 型应答与 T-淋巴细胞产生 INF- γ 和 IL-2 细胞因子相关联。其他通常与诱导 Th1 型免疫应答直接相关联的细胞因子 (例如 IL-12) 不是由 T 细胞产生的。相反，Th2 型应答与 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和肿瘤坏死因子-(TNF- β) 的分泌相关联。

用于本发明的合适的佐剂包括铝盐例如氢氧化铝凝胶(alum)或者磷酸铝，但也可以使钙盐、铁盐或者锌盐，或者可以是酰化的酪氨酸的不溶性悬液、或者酰化的糖、阳离子或阴离子衍生的多糖、含磷氮链聚合物 (polyphosphazenes)、或 Montanide 脂质体。

在用于本发明的疫苗配制品中，就腺病毒载体方面而言，可施用或者不施用佐剂。就这一组合中的蛋白质成分而言，可选择优先诱导 Th1 应答的佐剂组合物。此外，也可以诱导其他应答，包括其他体液应答。

某些疫苗佐剂特别适合于刺激 Th1 或 Th2 型细胞因子应答。通常，在接种疫苗或者感染之后，免疫应答的 Th1:Th2 平衡的最佳指标包括在

以抗原再次刺激后在体外直接测定 T 淋巴细胞产生的 Th1 or Th2 细胞因子, 和/或测定抗原特异性抗体应答的 IgG1:IgG2a 比率。因此, Th1 型佐剂是这样一种佐剂, 当以抗原在体外再次刺激分离的 T 细胞群时, 其刺激分离的 T 细胞群产生高水平的 Th1 型细胞因子, 并诱导与 Th1 型同种型相关联的抗原特异性免疫球蛋白应答。例如, 那些可以配制为用于产生适合用于本发明的佐剂的 Th1 型免疫刺激剂可包括单磷酸基脂质 A, 特别是 3-de-O-酰化的单磷酸基脂质 A (3D-MPL)。3D-MPL 是熟知的佐剂, 生产商是 Ribi Immunochem, Montana。在化学上, 其通常是作为 3-de-O-酰化的单磷酸基脂质 A 与 4、5、或者 6 酰化的链的混合物而提供的。可采用 GB 2122204B 所公开的方法对其进行纯化和制备, 该文献还公开了制备二磷酸基脂质 A 及其 3-O-去酰化的变体。其他纯化的或者合成的脂多糖已经被公开 (US Pat. 6,005,099, EP 0729473 B1, EP 0549074 B1)。在一个实施方式中, 3D-MPL 的形式是微粒配制品, 具有直径小于 0.2 μm 的小颗粒大小, 其制备方法在 EP 0689454 中已经公开。

皂角苷是 Th1 免疫刺激剂的另一种实例, 可用于本发明。皂角苷熟知的佐剂。例如, Quil A (来自南美洲的树木 *Quillaja Saponaria* Molina 的树皮) 及其成分公开于 US Pat. 5,057,540 和 EP 0362279 B1。溶血性皂角苷 QS21 和 QS17 (Quil A 的 HPLC 纯化成分) 已经被公开为强效的全身性佐剂, 其生产方法公开于 US Pat. 5,057,540 和 EP 0362279 B1。这些文献还公开了 QS7 (Quil-A 的非溶血性成分) 的用途, 其作为强效的佐剂用于全身性疫苗。QS21 与聚山梨醇酯或环糊精的组合也是已知的 (WO 99/10008)。包含 QuilA 的成分如 QS21 和 QS7 的微粒性佐剂系统公开于 WO 96/33739 和 WO 96/11711。

免疫刺激剂的另一个实例是免疫刺激性寡核苷酸, 其含有未甲基化的 CpG 二核苷酸 ("CpG")。CpG 是 DNA 中的胞嘧啶-鸟嘌呤核苷二核苷酸基序的缩写。已知 CpG 当通过全身途径和粘膜途径施用时均可作为佐剂 (WO 96/02555, EP 0468520)。历史上, 曾发现卡介苗 (*Bacillus*

Calmette-Guerin, BCG) 的 DNA 成分能够产生抗肿瘤作用。在进一步的研究中, 来自 BCG 基因序列的合成的寡核苷酸被发现能够诱导免疫刺激作用 (体外和体内均有)。这些研究的作者认为某些回文顺序, 包括中心 CG 基序, 具有这种活性。详细的分析已经发现, CG 基序肯定存在于特定的序列关系中, 且此类序列常见于细菌 DNA, 当罕见于脊椎动物 DNA。免疫刺激序列通常是: 嘌呤、嘌呤、C、G、嘧啶、嘧啶; 其中 CG 基序是没有甲基化的, 但其他未甲基化的 CpG 序列已知具有免疫刺激性并可用于本发明。

在这 6 个核苷酸的特定组合中可以出现回文顺序。这些基序中的一些, 其或是一个基序的重复或是不同基序的组合, 可出现于同一个寡核苷酸中。存在一或多种这些含有免疫刺激序列的寡核苷酸可激活各种免疫亚型, 包括天然杀伤细胞 (其产生干扰素- γ 并具有细胞毒活性) 和巨噬细胞。其他含有未甲基化的 CpG 却不具有这一共有序列的序列也已经被发现具有免疫调节作用。当配制到疫苗中时, CpG 通常以游离溶液的形式与游离抗原一同施用 (WO 96/02555, 68) 或者与抗原共价结合施用 (WO 98/16247), 或者以载体例如氢氧化铝配制 (肝炎表面抗原)。

上述的此类免疫刺激剂可与载体一同配制, 所述载体例如为脂质体、水包油乳液和/或金属盐类, 包括铝盐 (如氢氧化铝)。例如, 3D-MPL 可与氢氧化铝 (EP 0689454) 或水包油乳液 (WO 95/17210) 一起配制; QS21 可方便地与含有胆固醇的脂质体 (WO 96/33739)、水包油乳液 (WO 95/17210) 或者 alum (WO 98/15287) 一起配制; CpG 可与 alum 或者其他阳离子载体一起配制。

还可以使用免疫刺激剂的组合, 例如单磷酰基脂质 A 和皂角苷衍生物的组合 (WO 94/00153; WO 95/17210; WO 96/33739; WO 98/56414; WO 98/05355; WO 99/12565; WO 99/11241) 或 QS21 和 3D-MPL 的组合物, 见 WO 94/00153。或者, 本发明也可以使用 CpG 加皂角苷 (例如 QS21) 的组合。因此, 合适的佐剂系统包括, 例如, 单磷酰基脂质 A 如

3D-MPL 与铝盐的组合。另一个实施方式是单磷酰基脂质 A 与皂角苷衍生物的组合，例如 QS21 和 3D-MPL 的组合，参见 WO 94/00153，或者一种反应原性更低的组合物，其中 QS21 被淬灭于(quenched in)含有胆固醇的脂质体 (DQ)，参见 WO 96/33739。而另一种佐剂配制品包括 QS21、3D-MPL 和生育酚，存在于水包油乳液中，参见 WO 95/17210。在另一个实施方式中，单独使用 CpG 寡核苷酸或将其与铝盐一起使用。

用于本发明的合适的佐剂是倾向于刺激 Th1 的佐剂，例如包含皂角苷如 QS21 或单磷酰基脂质 A 衍生物如 3D-MPL 的佐剂，或同时包含上述两者以及任选地与含有胆固醇的脂质体的佐剂。例如 WO 96/33739 公开了与含有胆固醇的脂质体存在于一配制品中的 QS21 和 3D-MPL 的组合。

本发明的优点是多方面的。重组病毒，例如重组腺病毒，可通过使用被认为是安全的细胞以很高的滴度进行制备，所述细胞能够在悬液中生长达到很高的量，所使用的培养基不含有任何来自动物或者人的组分。此外，已知重组腺病毒可引发针对由腺病毒基因组中的异源核酸序列所编码的蛋白质的显著的免疫应答。本发明将这些特征组合于一种携带恶性疟原虫的环孢子基因的载体中并利用佐剂化的蛋白质来加强应答。此外，所述基因已经经过密码子优化以使得表达水平适合于在人体产生合适的免疫应答。本发明提供抗疟疾感染的疫苗，其利用的是不会遭遇高滴度的中和抗体的腺病毒。用于这一目的的高度优选的腺病毒是血清型 11 和 35 (Ad11 和 Ad35，见 WO 00/70071 和 WO 02/40665)。

在引起疟疾的病原体如恶性疟原虫与感兴趣的宿主例如人类之间，其核酸含量是非常不同的。本发明提供密码子优化的核酸，其能够在哺乳动物例如人体内达到更高的表达水平。

利用不同的实体进行在此所述的初始/加强免疫疗法提供了一种免疫方法，其能够同时提供免疫系统的细胞免疫和体液免疫这两方面的合适

的免疫应答。其涉及 CD8+ T 细胞、CD4+ T 细胞和抗体。这些疫苗这的任一种单独应用均不能产生持久的、能够激发最佳水平的抗原特异性 CD8+ T 细胞、CD4+ T 细胞和抗体的免疫应答。此外，不同组分的施用顺序可改变这些免疫应答，并可能造成抗将来感染的保护作用持续不同时间。本发明的方法和试剂盒能够实现引发对付寄生虫在人体中的生命周期的所有不同阶段的免疫应答，从循环的子孢子和裂殖子到感染的肝细胞和 RBC。此外，其能够在一长段时期内提供抗疟疾感染的持久的保护作用。

在一个优选的实施方式中，本发明涉及重组腺病毒的用途，通过使得腺病毒基因组的 E1 区的至少部分被缺失已经使得所述重组腺病毒成为复制缺陷型，该 E1 区对于新产生的腺病毒进行复制、转录、翻译和包装等过程来说是必需的。缺失 E1 的载体通常是在能够对所缺失的 E1 功能进行互补的细胞系上产生的。关于此类细胞系及其在产生重组病毒中的用途已经有详细的描述并且在现有技术中是熟知的。优选地，可使用由以保藏号 ECACC no. 96022940 保藏于 Centre for Applied Microbiology and Research (CAMR, UK) 的 European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) 的细胞所代表的 PER.C6[®]细胞或其衍生细胞来防止产生能够复制的腺病毒 (rca)。在另一个优选的实施方式中，使用的细胞支持除来自腺病毒血清型 5 (Ad5) 的重组腺病毒以外的重组腺病毒的生长。在此引用以下文件：WO 97/00326、WO 01/05945、WO 01/07571、WO 00/70071、WO 02/40665 和 WO 99/55132，其中公开了如何获得 Ad5 的以及其他腺病毒血清型的无 rca 腺病毒原液的方法和手段，所述其他腺病毒血清型例如为重组复制缺陷型 Ad35，后者能够在通过来自 Ad35 的 E1 而达到永生的 HER 细胞上产生，或者在 PER.C6[®]细胞上产生，PER.C6[®]细胞进一步包含来自 Ad35 的 E1 基因以便对 B 型腺病毒提供合适的互补。

需要注意的是，在下述公开的文献中：WO 00/03029、WO

02/24730、WO 00/70071 和 WO 02/40665, Ad50 被错误地称为 Ad51。在以上提及的文献中,其中提到的 Ad51 血清型与 De Jong et al. (1999) 的一篇出版物中的血清型 Ad50 是相同的,在 De Jong et al. (1999) 的出版物中其被称为 B 群腺病毒。为清楚起见,在此所用的 Ad50 是 De Jong et al. (1999) 所提到的 B 群 Ad50 血清型。

本发明的疫苗通常用于初始/加强免疫方案,例如 Ad/蛋白质;蛋白质/Ad;蛋白质/Ad/Ad; Ad/蛋白质/Ad; Ad/Ad/蛋白质; Ad/蛋白质/蛋白质/蛋白质; Ad/蛋白质/病毒载体/蛋白质,等等。能够预见的是,与另一种类型的疫苗(例如裸 DNA 或不同于腺病毒的重组病毒载体)的组合也可与本发明的初始/加强免疫药剂组合使用。还可使用额外的疟疾抗原或者(多)肽。

在此,如果一种核酸可通过对得自野生型病毒的野生型序列进行直接克隆而得到,则使用序列“来自”的表述,虽然它们也可例如利用不同段的 DNA 作为模板通过 PCR 而得到。这也意味着此类序列可以是野生型的形式以及改变的形式。达到同样结果的另一种方法通过组合合成的 DNA。应该理解的是,“来自”并不排他性地意味着对野生型 DNA 进行直接克隆。本领域普通技术人员还能意识到可利用分子生物学方法获得特定的一段核酸的突变体形式。术语“其功能性部分、衍生物和/或类似物”应理解为等同于它们与之有关的核酸序列。本领域普通技术人员可以理解这一事实,即某些缺失、交换、(点)突变、添加等等,仍可得到具有与原始核酸序列相似的功能的核酸序列,且一旦翻译后能够产生相似的或者甚至是相同的多肽。因此应该理解的是,此类并不显著改变核酸序列的功能性的变化落入本发明的范围之内。如果特定的腺病毒载体来自所选择的特定的腺病毒血清型,也应该理解最终的产品可通过间接途径获得,例如采用本领域已知的方法直接克隆和合成特定的基因组 DNA 段。不改变本发明的具体方面而对基因组的内容作出的特定缺失、突变或者其他变化仍被认为是本发明的一部分。此类变化的实例是

例如病毒骨架内的缺失，以便能够克隆更大的异源核酸段。此类突变的实例是例如 E3 缺失或者腺病毒的 E2 和/或 E4 蛋白的编码区域的缺失和/或变化。对腺病毒骨架进行的此类变化是本领域已知的且经常采用的，因为空间对于待包装的腺病毒来说是一个限制因素；这是要缺失腺病毒基因组的某些部分的主要原因。改变基因组的 E2、E3 和/或 E4 区域的其他原因可能涉及腺病毒载体的稳定性或者整体性，例如参见 WO 03/104467 和 WO 2004/001032)。这些申请涉及将来自一个亚群的血清型的 E4orf6 基因用于来自另一亚群的腺病毒的骨架内，以确保在包装细胞系内进行复制和包装的过程中，E4orf6 活性与 E1B-55K 活性相适合。它们还涉及使用合适的功能性 pIX 启动子来获得更高的 pIX 表达水平和更稳定的重组腺病毒载体。

“复制缺陷型”在此意味着病毒载体在非互补细胞内不能复制。在互补细胞内，复制所需的功能且由此产生病毒载体所需的功能是由互补细胞提供的。本发明的复制缺陷型病毒载体没有携带在除互补细胞之外的任何宿主细胞中进行复制所需的全部元件。

“异源”在此当与核酸有关时意味着核酸序列来自与该异源核酸所克隆入其中的野生型病毒载体不同的来源。例如就腺病毒而言，克隆入复制缺陷型腺病毒载体的异源核酸不是腺病毒的核酸序列，而是来自感兴趣的某些其他致病因素。

“异源”在此当与初始-加强免疫疫苗策略有关时意味着施用两种或者多种不同的组分，作为实例的是将一种重组非复制型腺病毒载体与一种佐剂化的蛋白质有意图地组合使用，而不是如现有技术中所通常采用的那样，将一种组分施用若干次。

“抗原”在此是指任何来自一原料的抗原，所述原料在被输送(施用)了决定簇的宿主内引发免疫应答。抗原可以来自外来原料，如病原体、寄生虫、或者甚至是自身抗原。可采用本发明的复制缺陷型重组病毒来输送的疟原虫抗原的实例是环孢子蛋白 (CS)、SE36 多肽、裂殖子表

面蛋白-1 19 kDa C 端多肽 (MSP-1p19)、MSP-1、MSP-1p42、Apical Merozoite Antigen-1 (AMA-1)、Liver Stage Antigen 1 (LSA-1) 或 Liver Stage Antigen-3 (LSA-3), 或者上述任一的片段。在一个优选的方面, 本发明涉及来自恶性疟原虫的环子孢子 (CS) 蛋白。

“密码子优化”在此意味着序列的核酸内容已经被改变, 以便在将编码所述蛋白的基因输送于其中的感兴趣的宿主中使得感兴趣的蛋白具有足够高的表达水平。足够高的表达水平在此是指蛋白质的水平应该高到足以在宿主中引发免疫应答以便保护宿主抵抗感染或者抵抗疾病。本领域人员已知某些疫苗在人体内产生免疫应答, 由此大约 60%的被接种个体可抵抗随后由使用病原体 (如子孢子) 进行攻击而诱导的疾病。因此, 如果 60%或者更多的被处理的个体能够抵抗随后的感染而得到保护, 那么可认为表达水平是足够的。可以相信, 通过将可施用的腺病毒方面与在此所公开的抗原选择相组合, 可以达到这些百分数。优选地, 85%的个体得到保护, 不过最优选的是超过 90%的被接种宿主可抵抗随后的攻击而得到保护。本发明公开的核酸经密码子优化用于在人类表达。根据 Narum et al. (2001), 与胞嘧啶加鸟嘌呤 (C+G) 的百分数相比, 人类 DNA 中腺嘌呤加胸腺嘧啶 (A+T) 的含量约为 59%。恶性疟原虫的腺嘌呤加胸腺嘧啶含量总体约为 80%。恶性疟原虫的 CS 基因的腺嘌呤加胸腺嘧啶含量约为 87%。为得到足够的保护作用, 认为有必要提高宿主内的产生水平。实现这一目的的一个途径是调整密码子的使用以保持最终的氨基酸序列相同, 不过使用的是哺乳动物进行表达时更通常使用的密码子序列。为此, 本发明的复制缺陷型重组病毒载体在本发明的异源核酸中具有腺嘌呤加胸腺嘧啶含量低于 87%, 优选地低于 80%, 且更加优选地低于或等于大约 59%。基于人类的密码子使用规则和恶性疟原虫和约氏疟原虫的 CS 基因的氨基酸含量, 密码子优化的基因的百分比甚至更低, 大约达到本发明公开的氨基酸含量的 45%。因此, 就 CS 基因而言, 它们优选地具有约 45%的腺嘌呤加胸腺嘧啶含量。应该理解

的是，如果待治疗的是不同于人的另一物种，该物种可具有不同的腺嘌呤加胸腺嘧啶浓度（低于或者高于 59%）和/或不同的密码子使用规则，可以调整本发明的编码 CS 蛋白的基因以便适合所需的含量并产生适合于所述具体宿主的表达水平。当然，也不能排除的是，在世界上不同的地理区域内，含量的微小改变可造成表达水平的微小改变。也应该理解，蛋白质的氨基酸序列内重复序列数量出现微小改变，百分比会相应地不同。可对其他感兴趣的抗原进行类似的修饰。所有这些调整的含量均为本发明的一部分。

称为 RTS,S 的蛋白质是融合蛋白，由恶性疟原虫 CS 蛋白 C 端一半组成（中心 41 个 NANP 重复序列中的 17 个加 C 端部分的绝大部分），表达为与乙型肝炎病毒表面抗原形成的融合蛋白。

不能复制的腺病毒载体的显著优点之一在于亲代病毒具有较小的致病性，并有报道认为这些载体在任何个体、包括在具有免疫抑制的个体内不会引起明显的疾病。在小鼠疟疾(约氏疟原虫)模型中的研究提示，表达 CS 蛋白的重组腺病毒构建体不仅引起突出的细胞免疫应答，它们还提供出色的抗感染保护作用。因此，为了提高 T 细胞应答的强度和延长针对 CS 的总体免疫应答，本发明人决定将腺病毒方法与重组蛋白质方法进行组合，成为一种新的异源初始-加强免疫策略。

不过，小鼠并不是预测人类应答的理想模型，对于腺病毒 35 (Ad35) 尤为如此。标准的复制缺陷型载体是腺病毒 5 (Ad5)，但其已经在载体能力优化方面表现出一些问题，原因在于该病毒具有广泛的地区性流行，且在全球范围内的人群中有相当大的比例对亲代病毒已经具有了预先存在的免疫力。Ad35 在作为疫苗方面显示出具有更大的应用前景。携带 Ad5 和 Ad35 CSP 的构建体均已能够得到，这样便能够对利用具体诱导 CS 免疫力的不同构建体的两种顺序异源腺病毒免疫接种进行评价。

树突状细胞 (DC) 是体内最强的抗原呈递细胞，而 Ad5 和 Ad35 两

者均既靶向人类 DC 又靶向恒河猴 DC 这一事实是使得它们成为出色的疫苗载体的多种生物学因素之一。不过，仅 Ad5 有效感染鼠科 DC；Ad35 仅可靠地感染灵长类动物的 DC。因此，尽管有关 Ad35 构建体的基本效力的问题能够在小动物模型中找到答案，但有关 Ad35 的真实的免疫原性只能在非人类灵长动物中进行研究。

本发明人决定检测 RTS,S 与含有 CS 基因的腺病毒载体组成的初始-加强免疫组合，以确定其抗疟疾细胞和/或体液应答是否较单独应用 RTS,S 而言是一种提高。此外，对两剂腺病毒疫苗单独使用的疗法进行了优化。

实施例

使用重组腺病毒载体和纯化的佐剂化蛋白质对恒河猴进行异源初始/加强免疫接种

实验的目的是评价 RTS,S 随后 Ad35，以及 Ad35 随后 RTS,S，与标准的 3 剂 RTS,S 免疫接种疗法和标准的 2 剂 Ad35 疗法进行直接对比。次要目的是优化所述的 2 剂腺病毒疗法。研究了将这些构建体进行组合的几种不同疗法的过程中以及随后的血清学和细胞免疫应答。

恒河猴 (*Macaca mulatta*) 是研究人类免疫应答的出色的模型，原因在于其与人类在系统发生上关系密切。特别仔细观察了 MHC II 类等位基因；共有等位基因的产生估计在两千五百万年前，早于人和恒河猴达到物种形成。因此，在将抗原呈递给 Th 细胞时使用的是相似的表位，这极大地增强了该模型的预测价值。更重要的是以往已经证实恒河猴模型在针对疟疾抗原和 HIV 的人类免疫原性应答方面均具有很高的预测性，HIV 是另一种因免疫应答的复杂性而妨碍疫苗开发的人类疾病。

已经使用小鼠疟疾约氏疟原虫的腺病毒 CS 构建体在小鼠中进行了初步的实验，证实其具有出色的免疫原性和保护效力。不过，在寻求开发抗恶性疟疾疫苗的过程中长期以来一直无法成功地自小鼠疟疾模型的

结果直接推断出在人类的情况，这一点要求在非人类灵长动物模型中进行过渡实验。恒河猴代表了最佳的候选物种，原因在于这些疫苗在这一物种中有广泛深入的已有数据库，在于其与人类在系统发生上的近亲关系，在于其大小允许取得足量的血液样品以保证对免疫应答进行充分的分析，还在于已有的试剂和方法都已经非常适合这一物种且因此不需要辅助的方案以及多年的摸索。此外，腺病毒 35 构建体只有在非人类灵长动物中才能进行合适的测试，因为这种病毒不能有效侵入其他哺乳动物的树突状细胞。

有关构建和产生用于本实验研究的携带恶性疟原虫 CS 编码基因 (Ad5CS 和 Ad35CS) 的重组复制缺陷型腺病毒，在 WO 2004/055187 (克隆 02-659; 见其图 2) 的实施例中已经进行了详细的阐述。简言之，腺病毒载体包含编码 CS 蛋白的异源基因，所述 CS 蛋白的氨基酸序列类似于 NF54 株 3D7 克隆的 CS 蛋白，并具有 N 端信号序列、27 个 NANP 重复、一簇 3 个 NVDP 重复和一个单独的 NVDP 重复、通用表位 (Lockyer et al. 1989; Zevering et al. 1994; Nardin et al. 2001)、以及缺失了最后 14 个氨基酸 (位于 C 末端)，等等。RTS,S 蛋白质的不同之处在于 RTS,S 缺乏 N 端信号序列和大部分的重复区以及位于 C 端的 GPI 锚信号序列的绝大部分，后者也不存在于腺病毒构建体中。

本实验对为了优化 RTS,S 与携带 Ad5 和 Ad35 CS 的构建体 (Ad5CS 和 Ad35CS) 的初始-加强免疫策略、以及为了优化 Ad5CS 和 Ad35CS 单独的使用策略而进行的各种组合和时程策略进行了随机化、盲化的安全性和免疫原性研究。作为与新策略进行对比的对象，以往的最佳疗法是肌肉注射 3 剂 50 μ g 的 RTS,S 和佐剂，分别在第 0、1 和 3 个月注射。这是组 1，即阳性对照组。表 1A 概括了所有的组。在所有的情况中，佐剂均是 50 μ g 的 3D-MPL、50 μ g 的 QS21，与含有胆固醇的脂质体存在于一配制品中，参见 WO 96/33739。

组 2 在第 0 和 1 个月接受 2 剂 RTS,S/佐剂，随后在第 3 个月接受 1

剂 Ad35CS。组 3 在第 0 个月接受 1 剂 Ad35CS，随后在第 1 和 3 个月接受 2 剂 RTS,S/佐剂。

组 4、5 和 6 仅接受腺病毒构建体。以往在不同疾病中使用 2 剂腺病毒 5 构建体的经验提示，当免疫接种之间的间隔是至少 6 个月时，可得到最佳的血清学和细胞免疫应答。由于必须在人体或者非人类灵长动物中评价 Ad35 构建体，对该载体而言，两剂之间的最佳时间还未确定。因此，组 4 在第 0 和 3 个月接受 2 剂 Ad35CS (用于蛋白质组的直接对照)，而组 5 在第 0 和 6 个月接受 2 剂。为了评价是否 2 剂相同的腺病毒构建体的效果不如对 CS 蛋白进行改变的构建体，将组 5 与组 6 进行比较，组 6 在第 0 和 6 个月接受 Ad5CS，随后是 Ad35CS。

最后，对照组 7 在第 0 和 3 个月接受 2 剂空白 (无疟疾基因插入物) Ad35，作为评价免疫原性的免疫接种对照组。

将注射部位剃毛并清楚地标记以便于观察疫苗的反应原性。此外，在注射后 24、48、72 小时和第 7 和 14 天，给动物施用镇静剂并直接检查注射部位是否有硬化、肿胀、发热、发红或者其他异常等表现。尽管预期不会出现全身性毒性表现，但仍然在上述时间点给动物施用镇静剂并检查淋巴结病变、蜂窝组织炎、化脓、关节炎、食欲减退以及体重下降，并监测其血液学和临床生化指标的变化。

在每次注射后 24、48、72 小时和第 7 和 14 天取血进行全血计数 (CBC) 和一组临床生化分析，其包括 (但不必限于) 确定 BUN、肌酐、AST、ALT、GGT、和 CK。

为了确定排泄物中没有非复制型载体，在每次注射腺病毒的第 0 至 10 天每日收集排泄物样品并保存于 -70°C ，用于随后检测腺病毒。

在每次注射后的 1、2 和 4 周以及至少其后每月一次收集 1-3 ml 血清，用于通过 ELISA 确定针对 CS R32 (用于对 CS 蛋白进行标准化 ELISA 分析所使用的 CS 蛋白的重复区，见下文) 的抗体应答的性质和程度。血清样品存放于 -70°C 直至使用，在临近实验结束时对样品进行批

处理以尽量缩小内部分析可变性。收集的血清的量要足够，以便对于每次腺病毒注射可在第 0、1、7 和 14 天以及其后每 4 周使用 0.5-1.0 ml 血清用于确定抗腺病毒抗体的滴度。在首次免疫接种之前、第二次免疫接种之后 4 周(如果量的要求允许)、第三次免疫接种之后 4 周、以及第三次免疫接种 6 个月之后收集大量 (20-40 ml) 的 EDTA 或者肝素抗凝血用于采集细胞。采用密度离心分离的标准方法自这些样品中浓缩外周血单个核细胞 (PBMC)。尽管不同动物个体的细胞产率可明显不同，但总体而言样品量越大，采集的细胞的数量越大。由于无法预测确切的细胞回收率，因此优选地尽可能取得更大的样品，这样便得到了足够的细胞，以便进行重复测定以满足统计学分析的有效性。将细胞冷冻以便在以后的时间点进行批处理并由此提高质量控制。将细胞在含有 10% DMSO 的自体血清中进行冷冻，采用控制降温速度技术，并在蒸气相液氮中存放至少 1 周后使用。

在初始免疫之后，但在加强免疫之前，自那些 CBC 数据提示其可能耐受良好的较大的动物收集额外的样品以便采集细胞。由于在第 8 周前，接受 2 剂 RTS,S/佐剂的猴子为 14 只 (两组)，接受单剂 Ad35CS 的猴子为 14 只，因此预期至少对一半动物进行采样并由此保持统计学的显著性。注射后不超过 4 周就会有细胞采集物。由于仅接受腺病毒构建体的组仅接受 2 次注射，且因此与接受 3 次注射的猴子相比其采血计划并不苛刻，因此在两次注射中间进行细胞收集应该不会造成任何困难。

细胞免疫应答分析包括用于对抗原特异性的产生 IFN- γ 的细胞进行定量的短期 ELISPOT 测定。对经抗原刺激的细胞进行流式细胞仪分析不能确定在 ELISPOT 分析中所采集的数据，但提供了与发生应答的抗原特异性细胞的表型有关的额外信息。因此，还通过细胞内染色和流式细胞仪研究了抗原特异性 CD8⁺的分泌 IFN- γ 的亚群。

进行的其他的分析包括针对其他细胞因子的大批 ELISPOT 分析、其他细胞因子的细胞内染色 T 细胞亚群计数、定量抗原特异性 T 细胞亚

群细胞因子产生的其他基于流式细胞仪的分析、以及用于与其他方法相印证的定量 RT-PCR。

将猴子分成年龄、性别、体重和地理来源均匀匹配的组，然后将各组进行随机化。所有临床评估和安全性终点的确定均是在不了解猴子的分组情况的条件下确定的。类似地，所有免疫学测定均是在不了解各个样品属于哪些组的情况下进行的。这一盲化原则的例外是相对于 0、1、和 3 个月的时间表，有些动物按照 0 和 6 个月的时间表还是接受免疫接种；不过，就给予的具体注射而言，仍然维持盲化原则。

基于已有的、来自类似的但并不明显相关的实验数据，每个测试组 7 只动物 (对照组 4 只) 是理想的，这可使得组的规模最小但仍然能够准确检测到组间的差异。

使用标准的分析法对 ELISA 分析结果的几何平均值进行参数比较，例如 Student t-检验，假定等方差和双侧，和 ANOVA。ELISPOT 测定结果表示为每 200,000 个细胞的点，对结果进行类似的处理并使用非参数分析例如 Kruskal-Wallis 检验进行检测。需要进行组间比较时，使用 Student t-检验，利用原始数据或者对数转化的数据，确定任何两组之间的差异。

注射之前剪除毛发并以 70%的酒精擦拭清洁，以不退色的墨水在皮肤上画出 2.5-3 cm 的圆圈，以便定位注射部位用于随后进行触诊和评估反应原性。在即将进入猴舍前将 RTS,S 的注射剂与佐剂混合。注射剂的终体积是 0.5 ml，并通过 25-29 号针头输送至前肢的肌肉组织内。如前所述(WO 2004/055187)在缓冲液中制备腺病毒构建体并以 0.5 ml 的终体积肌肉内施用至同样的部位。

无论对于血清还是细胞，最初的生物样品是血液。表 1B 给出了采血时间表。监测动物的血液学状态，其提示个体维持重复取样的能力或者表明需要减少原计划的取样时间表。每次取血均以 Coulter 自动化血细胞计数器 (需要 <50 μ l 的不凝集血液) 进行全血计数 (CBC)。采用生产

商推荐的 GLP 样指导进行保养和维护。密切随诊血细胞比容、血红蛋白、平均血球体积(MCV)、红细胞(RBC)计数、以及网织红细胞百分比，以确保动物不出现贫血。

使用 20-24 号针和注射器或者真空管自股静脉、隐静脉或者头静脉采集静脉血。通常，对于抽取少于 10 ml 的血液而言，隐静脉或者头静脉是优选的，而在抽取 10 ml 以上的体积时为避免溶血并缩短静脉穿刺的时间则股静脉是优选的。

在免疫接种前、末次免疫接种后 2 周、以及末次免疫接种后 3 个月，自动物收集外周血单个核细胞 (PBMC)。在这一方案中，采用密度离心的标准方法分离 PBMC，并冻存于 45%自体血清 (45%的盐水和 10% DMSO)。简言之，将全血平铺于 Lymphoprep[®] (Axis-Shield, Oslo, Norway) ficoll-hypaque 细胞分离介质上，并在 650g 离心 20 分钟。取出细胞层并以 dPBS (BioWhittaker, Walkersville, MD) 洗涤 2 次，每次 400g 洗涤 15 分钟。使用 Coulter ACT*10 血球计计数活细胞。将细胞沉淀以 1×10^7 /ml 重悬于 50% dPBS、50%盐水中。滴加 DMSO 至终体积的 10%。将细胞冷冻于 0.55 ml 的小瓶中，每瓶准确为 5 百万个细胞，置于 -70°C 冰箱的控制降温 isopropanol 溶液中过夜，并存在于液氮蒸气相备用。

末次疫苗接种后，在以全抗原和 C 端和 N 端特异性混合肽刺激后 (详见下文)，采用 ELISpot 分析来鉴定来自不同猴子的血液样品中的分泌干扰素 γ (IFN- γ) 的 T 细胞。结果示于图 1 (末次疫苗接种后 2 周) 和图 2 (末次疫苗接种后 3 个月)，并以每百万细胞的中位数点形成单位 (median spot forming unit (SFU)) 分别表示于表 2 和表 4；在对数转换后的数据上使用方差分析 (ANOVA) 进行统计学比较。比较了所有的组。在检测到统计学显著性的情况下，可对组-组比较进行 post-hoc 分析 (结果未显示)。

为比较不同处理策略之间的 ELISpot 结果，计算出了以 Ad35 作为

初始处理的策略的滴度几何平均值的比率。在这些比率中，将单独使用 RTS,S (第 0, 2, 3 个月) 所得到的滴度几何平均值作为参照处理 (图 5 和图 6, 以及表 10)。类似地，计算出了以 Ad35 作为加强处理的策略的比率 (图 7 和图 8, 以及表 11)。

对 N 末端特异性刺激 T 细胞 ELISpots 的结果进行了类似的分析。结果分别示于图 9 和图 10 以及分别表 12 和 14。最后，计算出结果并分别显示于图 11 (Ad35 初始免疫策略) 和图 12 (Ad35 加强免疫策略) 以及表 16 和表 17。

采用标准方法，在底部装有 PVDF 的 MultiScreen-IP ELISpot 板 (Millipore, Bedford, MA) 中，以解冻的冻存 PBMC 进行了 ELISpots。严格遵循无菌操作，直至在第二天取出细胞用于最后的斑点显色 (spot development)。

使用的培养基: 自 RPMI-1640 (BioWhittaker, Walkersville, MD) 新鲜制备完全培养基 (cRPMI)，加入了 1:100 青霉素/链霉素、1:100 L-谷氨酰胺、1:200 NaHCO_3 (Sigma, St. Louis, MO)、1:100 非必需氨基酸、1:100 丙酮酸盐、和 1:300 2-ME (Gibco)。使用的该批次的胎牛血清 (FCS, HyClone, Logan, UT) 以前已经通过非特异性增殖测定进行分析，可对猴的细胞的生长提供良好的支持但几乎不产生刺激背景，cRPMI-10 为加入了 10%，cRPMI-20 为加入了 20%，等等。培养基+ (M+) 额外补充了 1:500 的抗猴 CD28 和抗猴 CD49D 抗体 (BD Pharmingen, San Jose, CA)。

新鲜制备以下刺激物，其浓度为在未添加血清的 M+ 中所欲使用的终浓度的 2 倍：

Con A: 伴刀豆球蛋白 A (Sigma), 2.5 $\mu\text{g/ml}$ (终浓度 1.25 $\mu\text{g/ml}$)，作为所有病毒的阳性对照。

CS-C: 混合 15-聚体多肽，具有 11 个氨基酸的重叠，覆盖 PfCS 分子的 C 端部分 (由 GSK, Rixensart, Belgium 提供)，各种肽的浓度 2.5 $\mu\text{g/ml}$ (终浓度 1.35 $\mu\text{g/ml}$)。

CS-N: 类似的混合 15 聚体肽, 具有 11 个氨基酸的重叠, 覆盖 PfCS 分子的 N 末端。

RTS,S: 纯化的全蛋白复合物 RTS,S 抗原, 适合于细胞培养 (GSK), 浓度为 2 µg/ml (终浓度 1 µg/ml)。

HEF: 纯化的乙型肝炎表面抗原 (HbS) 全蛋白 (RTS,S 的 “S” 组分), 同样适合细胞培养 (GSK), 浓度 23.2 µg/ml (终浓度 11.6 µg/ml)。

HbS-P: 混合 HbS 15 聚体肽 (GSK), 各种肽的浓度为 2.5 µg/ml (终浓度 1.25 µg/ml)。

阴性对照为无进一步补充的 M+。

如下制备板。以每孔 50 µl 的 1:100 稀释于无菌 dPBS 的初级抗猴 IFN-γ 单克隆抗体 (UcyTech #21-43-09, Utrecht, the Netherlands) 包被板, 并在塑料袋中于 4°C 温育 5-6 小时。使用前 1 小时去除包被抗体, 并在 37°C, 5% CO₂ 湿度控制型细胞培养箱中以 cRPMI-10 对板进行封闭。临用前去除封闭培养基。

解冻冻存的 PBMC: 将冷冻的小瓶在温水(37-40°C)中旋转直至几乎不再融化, 将 0.55 ml 内容物立即转移至 8 ml RPMI-20 中。将细胞在 350g 洗涤 13 分钟, 将沉淀物仔细地重悬于 2.0 ml cRPMI-20。取无菌的 40 µl 样品以活细胞数量, 必要时调整体积以产生 2x10⁶ 细胞/ml 的单细胞悬液。

预刺激: 将等体积的 cRPMI-20 的细胞悬液与 M+ 中的刺激物混合于聚丙烯细胞培养管中产生具有所需终浓度的各种试剂。将细胞在培养箱中放置至少 5 小时, 盖子拧松并保持倾斜状态依赖于气体交换。

终刺激: 温育 5-6 小时后, 将细胞在 400g 离心 10 分钟, 弃上清。然后将细胞立即重悬于半量的 cRPMI-20 和半量的刺激物中。再将它们放回培养箱放置 10-20 分钟以使得 pH 达到稳定。然后轻柔地混合细胞并小心地 200 µl (200,000 个细胞) 移至已经封闭的空板的合适的孔中。所有步骤都需要小心以保证孔不会干燥。将板静置温育过夜 (> 16 小时)。

斑点显色 (Spot development): 将 1:100 稀释于 dPBS (含 2% FCS) 中的多克隆抗猴 IFN- γ 抗体 (UCyTech) 作为第二抗体。将细胞和培养基自板中轻轻移去; 用 dPBS-0.5% Tween 20 (Sigma) 将孔洗涤 8 次, 加入 50 μ l 稀释的第二抗体。将板置于塑料袋中在摇床上室温温育 3 小时。再次以 dPBS-0.5% Tween 20 洗涤板 8 次, 并加入 50 μ l/孔 1:1000 稀释的链霉抗生物素碱性磷酸酶缀合物 (Southern Biotech #7100-04, Birmingham, AL)。然后将板置于塑料袋中在摇床上再室温温育 2 小时。最后, 如前面一样将板洗涤 8 次, 随后以蒸馏水洗涤 1 次, 加入 100 μ l/孔的发色 NBT-BCIP 底物 (Pierce Biotech, Rockford, IL)。显色 10-20 分钟, 直至背景变为黑色。然后将板以 300 μ l 蒸馏水冲洗至少两次, 空气中干燥过夜后读取数值。

读板: 使用 AID ELISpot Reader v3.1.1, 在 AID ELHR01 Elispot 读取仪上读板。对所有孔进行肉眼检查, 手工排除不合适的点 (有细纤维或者其他杂质)。数据保存于 Excel 表中。取双份或者三份孔进行平均, 将该数值乘以 5 以得到最后的原始数据, 单位是点/百万个细胞。

质量控制: 冻融后的活细胞回收率平均值超过 95%。如果培养基对照孔的平均值大于 20 点/百万个细胞, 或者如果 ConA 孔小于 500 点/百万个细胞, 则重复进行操作。此外, CD4+和 CD8+细胞的总体活力经流式细胞仪以 7-AAD 染料排斥法和表面染色法评估, 均超过 90%, 否则重复进行操作 (数据未显示)。

表 1A. 在恒河猴中进行的初始/加强免疫疗法的实验性疗法，使用基于血清型 5 和 35 的重组腺病毒载体(其包含编码恶性疟原虫 CS 蛋白的基因)和作为蛋白质抗原组分的佐剂化的 RTS,S。

组	初始	第 1 个月	第 3 个月	第 6 个月
1	RTS,S	RTS,S	RTS,S	
2	RTS,S	RTS,S	Ad35-CS	
3	Ad35-CS	RTS,S	RTS,S	
4	Ad35-CS		Ad35-CS	
5	Ad35-CS			Ad35-CS
6	Ad5-CS			Ad35-CS
7	Ad35-空		Ad35-空	

表 1B. 采血时间表。采集 CBC 和细胞需要全血；化学分析和 ELISA 需要血清。估计 1 ml 血清代表 2 ml 全血。仅给出了全血的量。范围表示可能需要自猴子采集更多的样品。CBC/化学分析栏中的“0.5”表示在那些天中仅进行 CBC。*表示不是所有的猴子都在该时间点取血。

周-天	CBC/化学分析	ELISA	细胞	总全血 (ml)
周-4 (大约)	1-3	2.5-5	25-35	28-43
周-1*	1-3	2.5-5		3.5-8
周 0-天 0	1-3	2.5-5		3.5-8
0-1	1-3	2.5		3.5-5.5
0-2	1-3			1-3
0-3	1-3			1-3
1	1-3	2.5-5		3.5-8
2	1-3	2.5-5		3.5-8
4-0	1-3	2.5-5		3.5-8
4-1	1-3	2.5		3.5-5
4-2	1-3			1-3
4-3	1-3			1-3
5	1-3	2.5-5		3.5-8
6	1-3	2.5-5		3.5-8

8	0.5	2.5-5	15-35*	18-40
10	0.5	2.5-5		3-5.5
12-0	1-3	2.5-5		3.5-8
12-1	1-3	2.5		3.5-5.5
12-2	1-3			1-3
12-3	1-3			1-3
13	1-3	2.5-5		3.5-8
14	1-3	2.5-5		3.5-8
15	2.5			2.5
16	1-3	2.5-5	25-35	28-43
18	0.5	2.5-5		3-5.5
20	0.5	2.5-5		3-5.5
22	0.5	2.5-5		3-5.5
25-0	1-3	2.5-5		3-7.5
25-1•	1-5			1-5
25-2•	1-5			1-5
25-3•	1-5			1-5
26	2.5-7.5			1-5
27	0.5	2.5-5	25-35	28-43
28	2.5			2.5
29	0.5	5		5.5
31	0.5	5		5.5
33	0.5	5		5.5
35	0.5	5		5.5
38	0.5	5	25-35*	5.5-43
39	0.5	7		7.5
40*		5-10*	20-35*	25-43*
41*	0.5*	7*		7.5*
44*	0.5*	2.5-5*		3-5.5*
48*	0.5*	5*		5.5*
51*	0.5*	5-10*	25-35*	28-43*
52*	0.5*	5*		5.5*

在下文的表中，将 RTS,S 简称为"RTS"。

表 2. 加强后 2 周的 PfCS C 端特异性 T 细胞免疫: IFN- γ ELISpot (SFU/百万个细胞) 的中位数和几何平均值以及 ANOVA 比较。给出了不同的初始/加强免疫疗法 (左侧)。

	加强后 2 周	
	中位数	几何平均值
RTS,RTS,RTS	20	31
RTS,RTS,Ad35	233	166
Ad35,RTS,RTS	571	553
Ad35,Ad35 (3 个月)	85	78
Ad35,Ad35 (6 个月)	47	42
Ad5,Ad35 (6 个月)	110	89
Ad35 空	2	2
ANOVA		P<0.0001

表 3. Student T-检验。如表 2 所示的加强(末次疫苗接种)后 2 周的 PfCS C 端特异性 IFN- γ ELISpot 比较的 p 值。

	RTS,RTS,RTS	RTS,RTS, Ad35	Ad35,RTS,RTS	Ad35,Ad35 3 个月	Ad35,Ad35 6 个月
RTS,RTS,RTS					
RTS,RTS,Ad35	0.05				
Ad35,RTS,RTS	0.008	0.03			
Ad35,Ad35 3 个月	0.24	0.20	0.001		
Ad35,Ad35 6 个月	0.70	0.015	<0.0001	0.19	
Ad5,Ad35 6 个月	0.16	0.24	0.0004	0.80	0.07

表 4. 加强后 3 个月的 C 端特异性 IFN- γ T 细胞免疫: ELISpot (SFU/百万个细胞) 的中位数和几何平均值以及 ANOVA 比较。给出了初始/加强免疫疗法 (左侧)。

	加强后 3 个月	
	中位数	几何平均值
RTS,RTS,RTS	8	9
RTS,RTS,Ad35	35	49
Ad35,RTS,RTS	128	156
Ad35,Ad35 (3 个月)	25	25
Ad35,Ad35 (6 个月)	15	15
Ad5,Ad35 (6 个月)	77	81
Ad35 空	2	2
ANOVA		P<0.0001

表 5. Student T-检验。如表 4 所示的加强(末次疫苗接种)后 3 个月 ELISpot 比较的 p 值。

	RTS,RTS,RTS	RTS,RTS,Ad35	Ad35,RTS,RTS		Ad35,Ad35 3 个月	Ad35,Ad35 6 个月
RTS,RTS,RTS						
RTS,RTS,Ad35	0.03					
Ad35,RTS,RTS	0.003	0.03				
Ad35,Ad35 3 个月	0.15	0.26	0.0009			
Ad35,Ad35 6 个月	0.48	0.07	0.0009		0.36	
Ad5,Ad35 6 个月	0.006	0.38	0.12		0.04	0.009

表 6. 末次加强后 2 周的 B 细胞免疫 (抗重复片段的抗体滴度): ELISA 的中位数和几何平均值以及 ANOVA 比较。给出了不同的初始/加强免疫疗法 (左侧)。

	加强后 2 周	
	中位数	几何平均值
RTS,RTS,RTS	3313	3385
RTS,RTS,Ad35	3705	3400
Ad35,RTS,RTS	1737	2059
Ad35,Ad35 (3 个月)	295	336
Ad35,Ad35 (6 个月)	161	171
Ad5,Ad35 (6 个月)	339	347
Ad35 空	1	1
ANOVA		P<0.0001

表 7. Student T-检验。如表 6 所示的末次加强(末次疫苗接种)后 2 周抗体比较的 p 值。

	RTS,RTS,RTS	RTS,RTS,Ad35	Ad35,RTS,RTS	Ad35,Ad35 3 个月	Ad35,Ad35 6 个月
RTS,RTS,RTS					
RTS,RTS,Ad35	0.99				
Ad35,RTS,RTS	0.07	0.10			
Ad35,Ad35 3 个月	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001		
Ad35,Ad35 6 个月	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.06	
Ad5,Ad35 6 个月	< 0.0001	< 0.0001	0.0002	0.93	0.086

表 8. 加强后 3 个月的与恶性疟原虫 CS 有关的 B 细胞免疫 (抗体滴度): ELISA (SFU) 的中位数和几何平均值和 ANOVA 比较。给出了不同的初始/加强免疫疗法 (左侧)。

	加强后 3 个月	
	中位数	几何平均值
RTS,RTS,RTS	528	521
RTS,RTS,Ad35	487	357
Ad35,RTS,RTS	288	275
Ad35,Ad35 (3 个月)	67	78
Ad35,Ad35 (6 个月)	70	65
Ad5,Ad35 (6 个月)	92	141
Ad35 空	0	1
ANOVA		P<0.0001

表 9. Student T-检验。如表 8 所示的加强(末次疫苗接种)后 3 个月抗体比较的 p 值。

	RTS,RTS,RTS	RTS,RTS,Ad35	Ad35,RTS,RTS	Ad35,Ad35	Ad35,Ad35
RTS,RTS,RTS					
RTS,RTS,Ad35	0.40				
Ad35,RTS,RTS	0.12	0.59			
Ad35,Ad35 3 个月	< 0.0001	0.005	0.002		
Ad35,Ad35 6 个月	< 0.0001	0.003	0.002	0.32	
Ad5,Ad35 6 个月	0.01	0.088	0.17	0.15	0.067

表 10. 几何平均值的比率*。T 细胞应答和 B 细胞应答。Ad35 用作初始疫苗。

	T 细胞应答		B 细胞应答	
	比率*	比率*	比率*	比率*
	(95%可信限) 2 周	(95%可信限) 3 个月	(95%可信限) 2 周	(95%可信限) 3 个月
Ad35,RTS,RTS	17.7 (4.4-72.1)	17.8 (5.1-61.9)	0.61 (0.35-0.85)	0.53 (0.23-1.22)
Ad35,Ad35 (3 个月)	2.5 (0.5-12.9)	2.9 (0.7-12.5)	0.10 (0.05-0.18)	0.15 (0.08-0.28)
Ad35,Ad35 (6 个月)	1.3 (0.3-6.0)	1.7 (0.4-7.9)	0.05 (0.03-0.10)	0.12 (0.07-0.22)

* 以 RTS,RTS,RTS 作为参照

表 11. 几何平均值的比率*。T 细胞应答和 B 细胞应答。Ad35 用作加强疫苗。

	T 细胞应答		B 细胞应答	
	比率*	比率*	比率*	比率*
	(95%可信限) 2 周	(95%可信限) 3 个月	(95%可信限) 2 周	(95%可信限) 3 个月
RTS,RTS,Ad35	5.3 (1.0-29.0)	5.6 (1.2-26.1)	1.00 (0.54-1.87)	0.69 (0.27-1.77)
Ad5,Ad35 (6 个月)	2.8 (0.6-13.2)	9.2 (2.2-39.0)	0.10 (0.05-0.22)	0.27 (0.11-0.68)

* 以 RTS,RTS,RTS 作为参照

表 12. 末次疫苗接种后 2 周的 PfCS N 端特异性 IFN- γ T 细胞免疫: ELISpot (SFU/百万个细胞) 的中位数和几何平均值以及 ANOVA 比较。给出了初始/加强免疫疗法 (左侧)。

	加强后 2 周	
	中位数	几何平均值
RTS,RTS,RTS	5	4
RTS,RTS,Ad35	17	11
Ad35,RTS,RTS	130	126
Ad35,Ad35 (3 个月)	68	78
Ad35,Ad35 (6 个月)	108	69
Ad5,Ad35 (6 个月)	68	72
Ad35 空	1	2
ANOVA		P<0.0001

表 13. Student T-检验。如表 12 所示的末次加强(末次疫苗接种)后 2 周的 ELISpot 比较的 p 值。

	RTS,RTS,RTS	RTS,RTS,Ad35	Ad35,RTS,RTS	Ad35,Ad35 3 个月	Ad35,Ad35 6 个月
RTS,RTS,RTS					
RTS,RTS,Ad35	0.12				
Ad35,RTS,RTS	< 0.0001	0.002			
Ad35,Ad35 3 个月	0.0002	0.012	0.39		
Ad35,Ad35 6 个月	< 0.0001	0.011	0.23	0.84	
Ad5,Ad35 6 个月	< 0.0001	0.007	0.22	0.88	0.94

表 14. 加强后 3 个月的 PfCS N 端特异性 IFN- γ T 细胞免疫: ELISpot (SFU/百万个细胞) 的中位数和几何平均值以及 ANOVA 比较。给出了不同初始/加强免疫疗法 (左侧)。

	加强后 3 个月	
	中位数	几何平均值
RTS,RTS,RTS	3	2
RTS,RTS,Ad35	12	10
Ad35,RTS,RTS	32	40
Ad35,Ad35 (3 个月)	25	32
Ad35,Ad35 (6 个月)	30	17
Ad5,Ad35 (6 个月)	63	55
Ad35 空	3	2
ANOVA		P<0.0001

表 15. Student T-检验。如表 14 所示的加强(末次疫苗接种)后 3 个月的 ELISpot 比较的 p 值。

	RTS,RTS,RTS	RTS,RTS,Ad35	Ad35,RTS,RTS		Ad35,Ad35 3 个月	Ad35,Ad35 6 个月
RTS,RTS,RTS						
RTS,RTS,Ad35	0.035					
Ad35,RTS,RTS	0.0005	0.066				
Ad35,Ad35 3 个月	0.0005	0.10	0.73			
Ad35,Ad35 6 个月	0.011	0.48	0.27		0.39	
Ad5,Ad35 6 个月	< 0.0001	0.01	0.58		0.31	0.08

表 16. 抗 PfCS 的 N 末端的 T 细胞应答的几何平均值的比率*。Ad35CS 用作初始疫苗。

	T 细胞应答	
	比率* (95%可信限)	比率* (95%可信限)
	2 周	3 个月
Ad35,RTS,RTS	32.4 (12.1-87.2)	16.5 (4.7-58.3)
Ad35,Ad35 (3 个月)	20.0 (6.1-66.0)	13.2 (4.1-42.3)
Ad35,Ad35 (6 个月)	17.9 (6.5-49.4)	7.1 (1.7-29.3)

* 以 RTS,RTS,RTS 作为参照

表 17. 抗 CS 的 N 末端的 T 细胞应答的几何平均值的比率*。Ad35CS 用作加强疫苗。

	T 细胞应答	
	比率* (95%可信限)	比率* (95%可信限)
	2 周	3 个月
RTS,RTS,Ad35	2.8 (0.7-10.9)	4.1 (1.1-15.2)
Ad5,Ad35 (6 个月)	18.5 (7.4-46.2)	22.4 (9.8-51.1)

* 以 RTS,RTS,RTS 作为参照

参考文献

- Bruña-Romero O et al. (2001) Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11491-11496
- Caspers P et al. (1989) The circumsporozoite protein gene from NF54, a *Plasmodium falciparum* isolate used in malaria vaccine trials. *Mol Biochem Parasitol* 35:185-189
- Clyde DF et al. (1973) Immunization of men against sporozoite-induced *falciparum* malaria. *Am J Med Sci* 266:169-177
- De Jong JC et al. (1999) Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol* 37:3940-3945
- Doolan DL et al. (1998) DNA vaccination as an approach to malaria control: current status and strategies. *Curr Topic Microbiol Immunol* 226:37-56
- Estcourt MJ et al. (2002) Prime-boost immunization generates a high frequency, high-avidity CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte population. *Int Immunol* 14:31-37
- Gandon S et al. (2001) Imperfect vaccines and the evolution of pathogen virulence. *Nature* 414:751-756
- Gordon DM et al. (1995) Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine. *J Infect Dis* 171:1576-1585
- Hoffmann SL and Doolan DL. (2000) Malaria vaccines-targeting infected hepatocytes. *Nature Med* 6:1218-1219
- Horn NA et al. (1995) Cancer Gene Therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials. *Human Gene Therapy* 6:565-573

- Kester KE et al. (2001) RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 183:640-647
- Kurtis JD et al. (2001) Pre-erythrocytic immunity to *Plasmodium falciparum*: the case for an LSA-1 vaccine. *Trends in Parasitology* 17:219-223
- Lalvani A et al. (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* 180:1656-1664
- Lockyer MJ et al. (1989) Wild isolates of *Plasmodium falciparum* show extensive polymorphism in T cell epitopes of the circumsporozoite protein. *Mol Biochem Parasitol* 37:275-280
- Luke TC and Hoffman SL (2003) Rationale and plans for developing a non-replicating, metabolically active, radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *J Exp Biol* 206:3803-3808
- Nardin EH et al. (2001) A totally synthetic polyoxime malaria vaccine containing *Plasmodium falciparum* B cell and universal T cell epitopes elicits immune responses in volunteers of diverse HLA types. *J Immunol* 166:481-489
- Mosmann TR and Coffman RL. (1989) TH1 And TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev of Immunol* 7:145-173
- Musti AM et al. (1983) Transcriptional mapping of two yeast genes coding for glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase isolated by sequence homology with the chicken gene. *Gene* 25:133-143
- Narum DL et al. (2001) Codon optimization of gene fragments encoding *Plasmodium falciparum* merzoite proteins enhances DNA vaccine protein expression and immunogenicity in mice. *Infect and Immun* 69:7250-7253

- Nussenzweig RS et al. (1967) Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature* 216:160-162
- Romero P et al. (1989) Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. *Nature* 341:323-326
- Stoute JA et al. (1997) A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 336:86-91
- Stoute JA et al. (1998) Long-term efficacy and immune responses following immunization with the RTS,S malaria vaccine. *J Infect Dis* 178:1139-1144
- Sun PF et al. (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* 171:6961-6967
- Valenzuela P et al. (1979) Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen. *Nature* 280:815-819
- Vogels R et al. (2003) Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell interaction and bypass of pre-existing adenovirus immunity. *J Virol* 77:8263
- Wang R et al. (2001) Induction of CD4+ T cell-dependent CD8+ type 1 responses in humans by a malaria DNA vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10817-10822
- Zevering Y et al. (1994) Effect of polymorphism of sporozoite antigens on T-cell activation. *Res Immunol* 145:469-476.

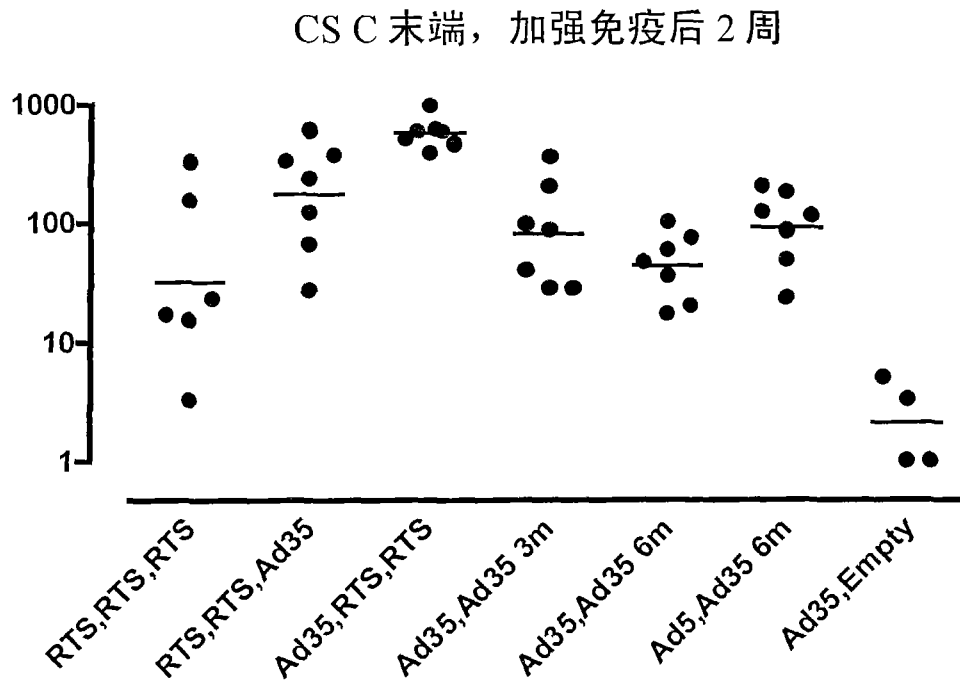


图 1

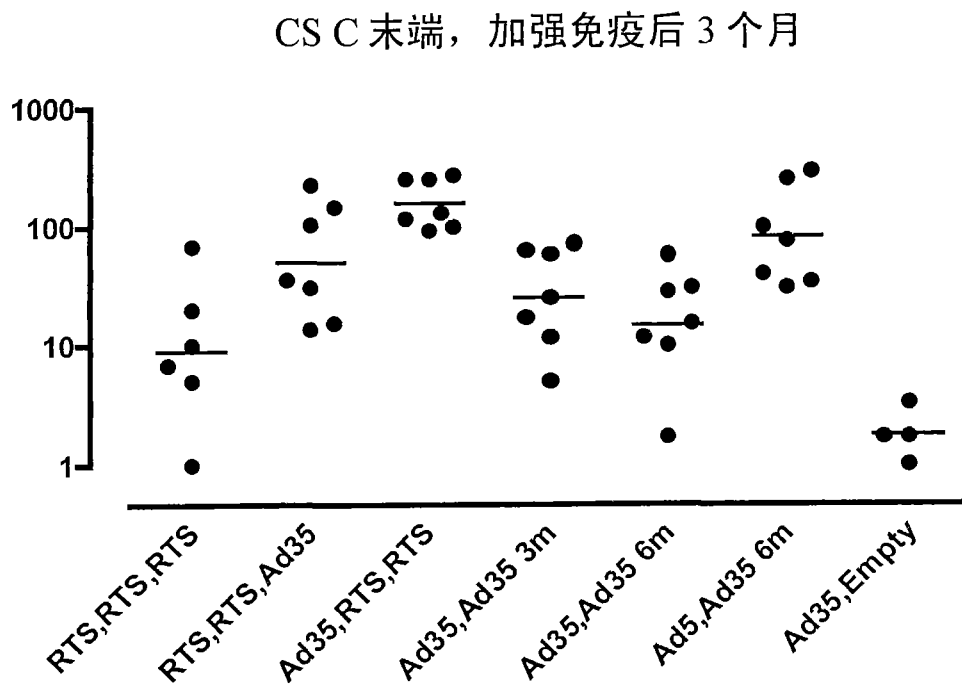


图 2

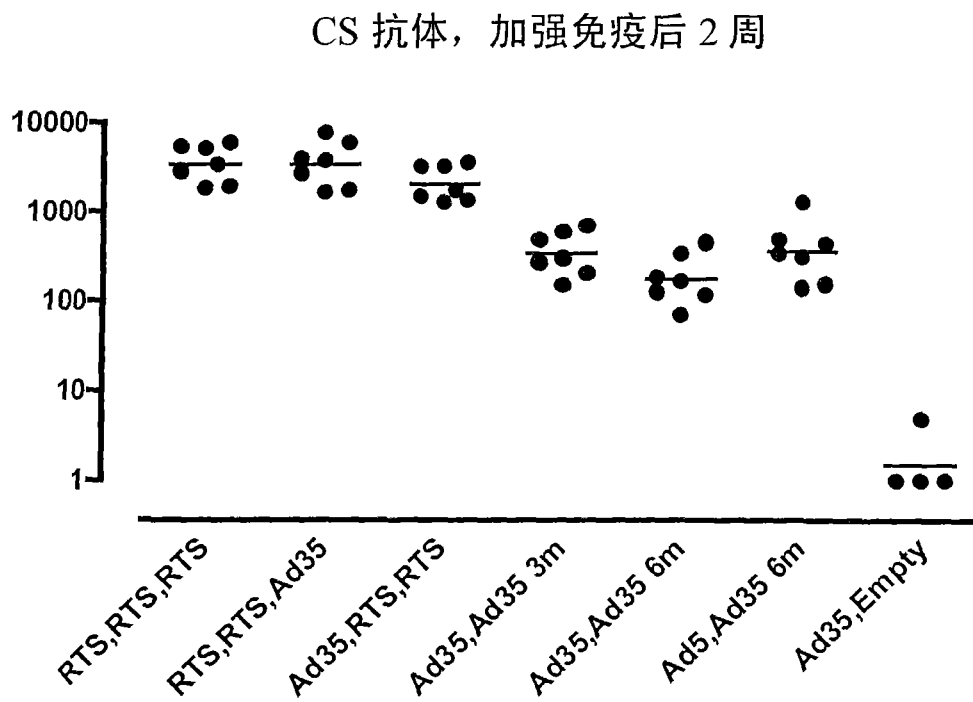


图 3

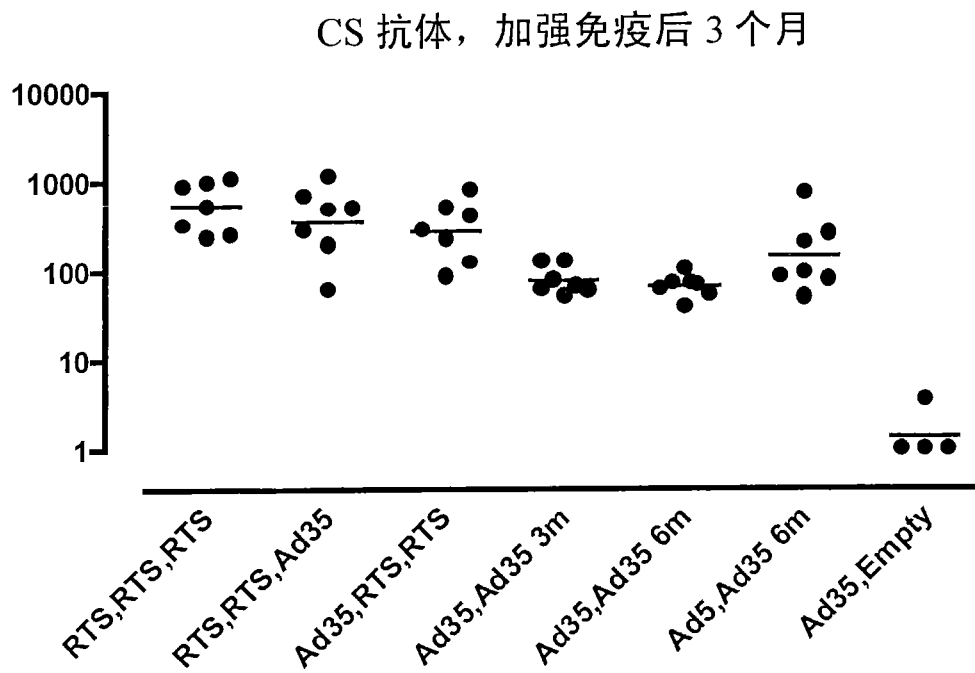


图 4

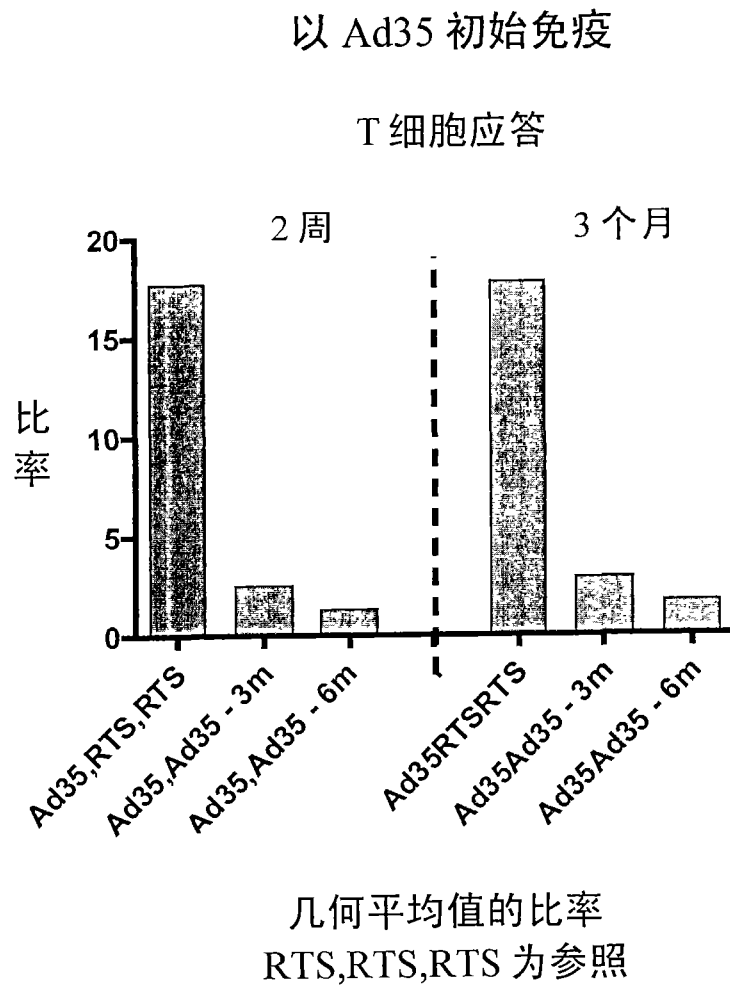


图 5

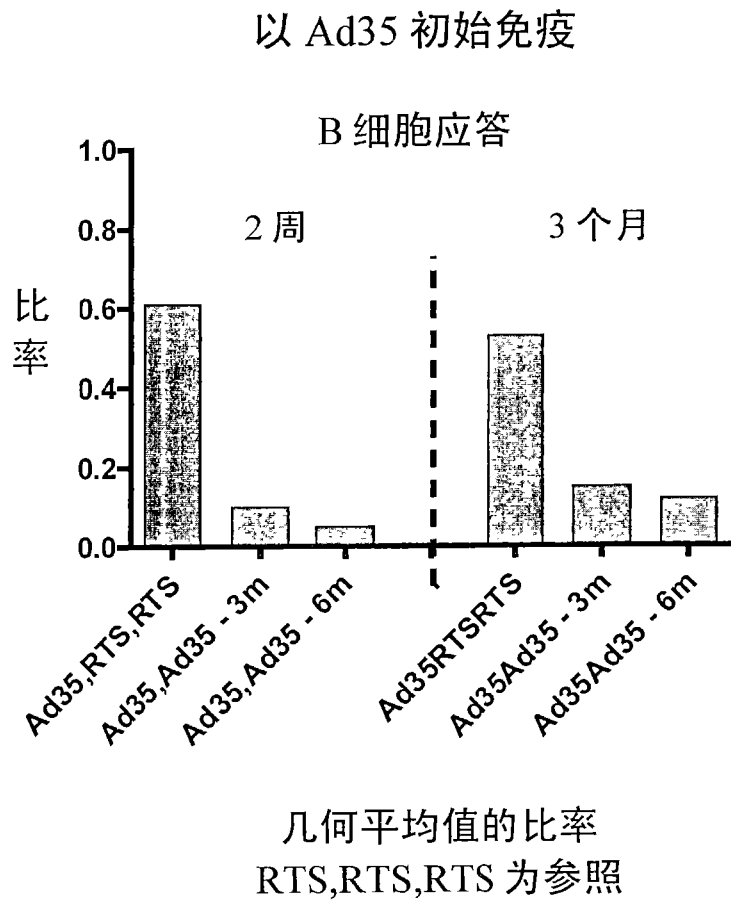


图 6

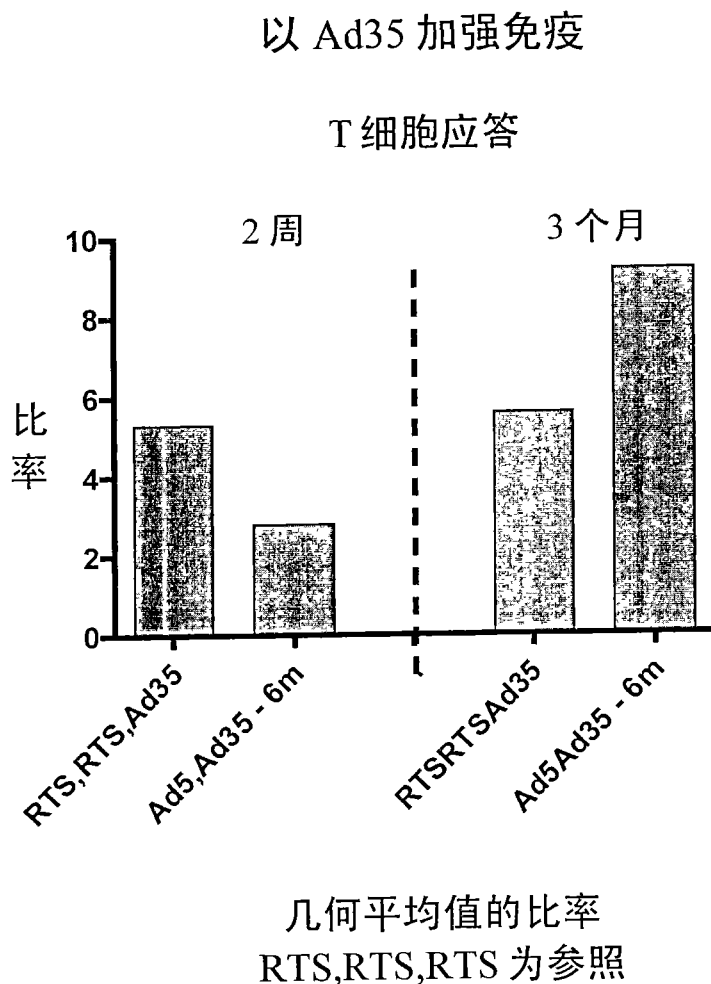


图 7

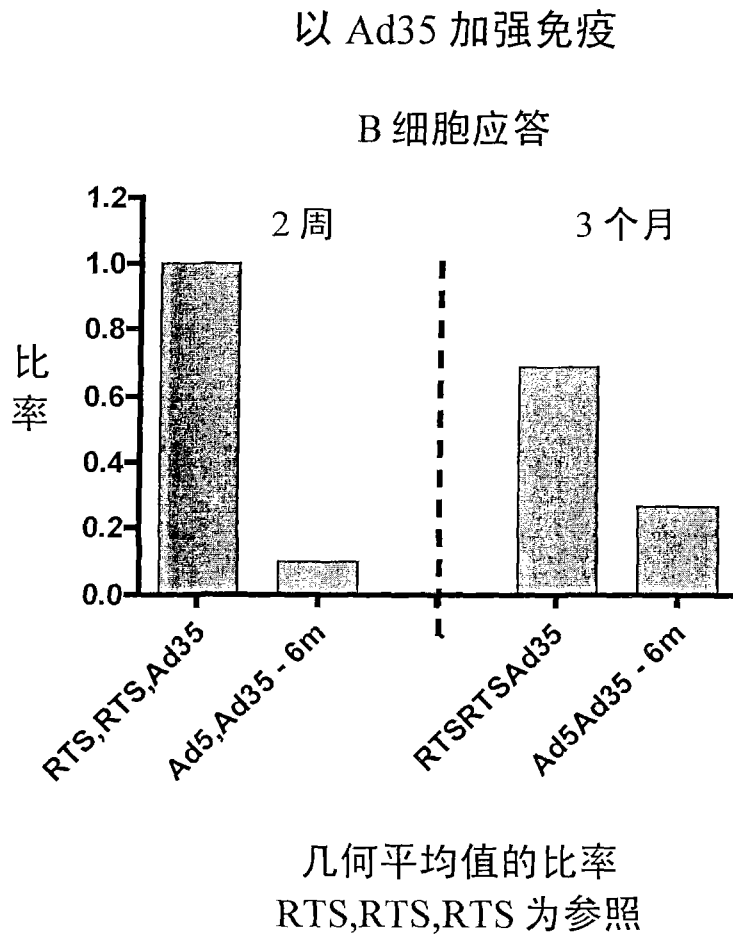


图 8

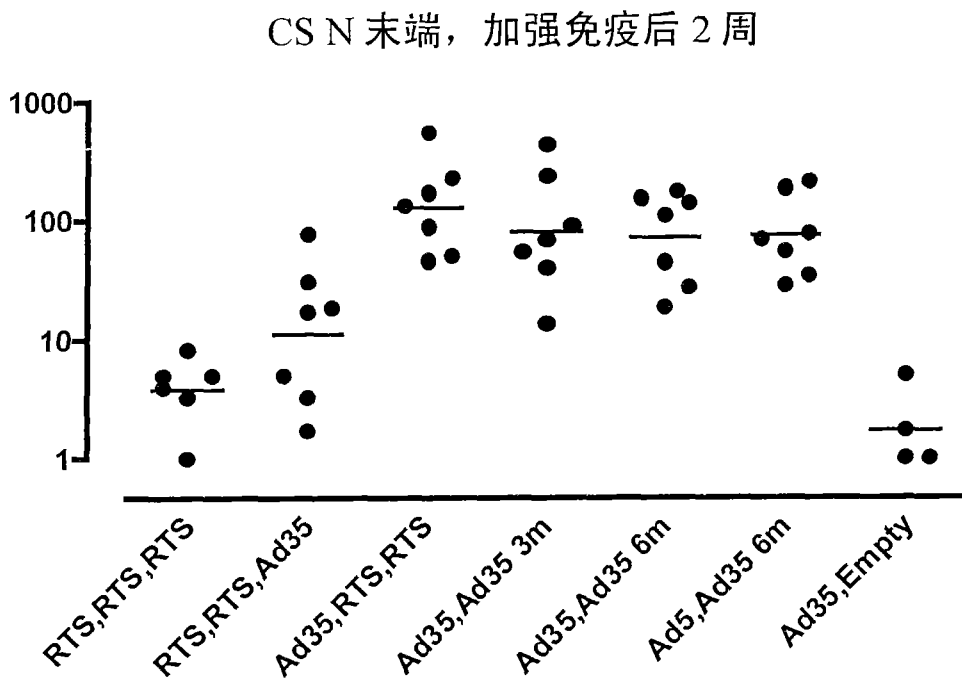


图 9

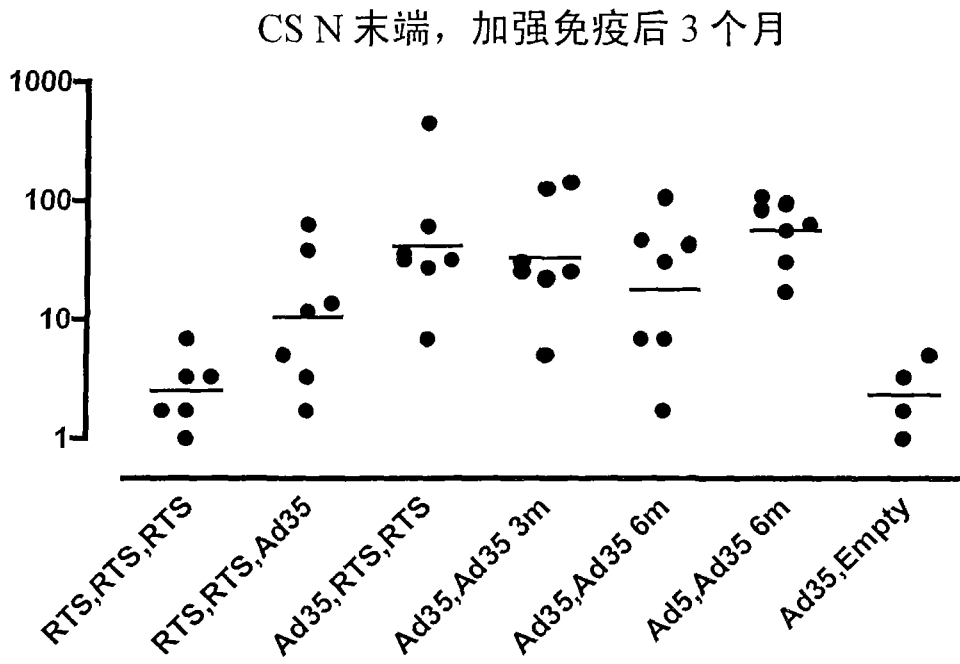


图 10

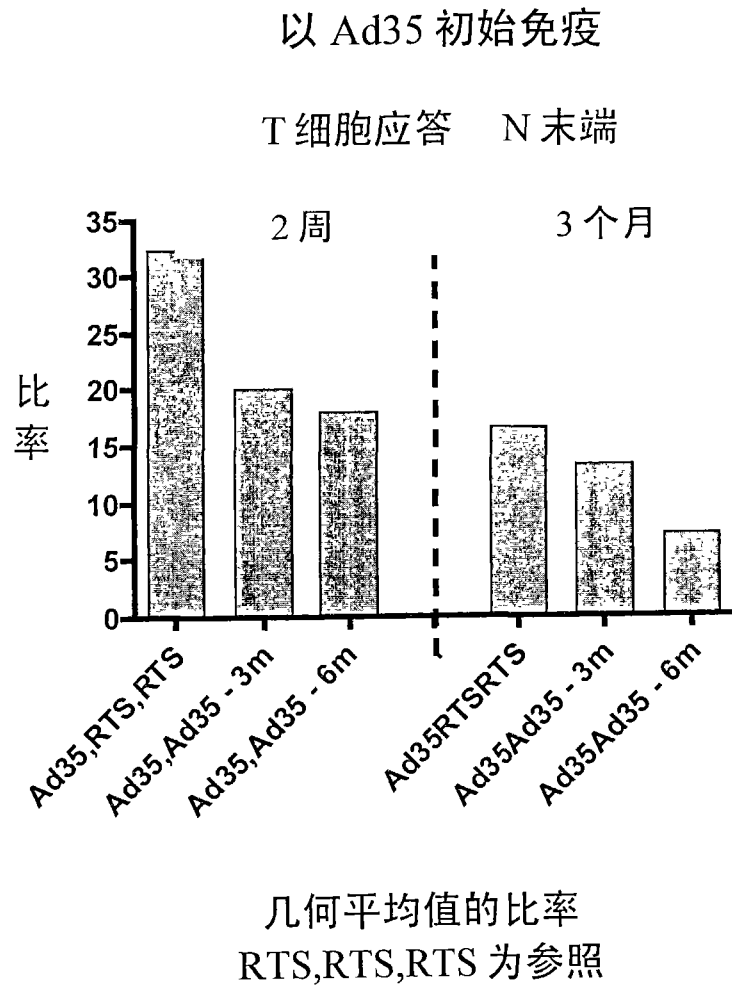


图 11

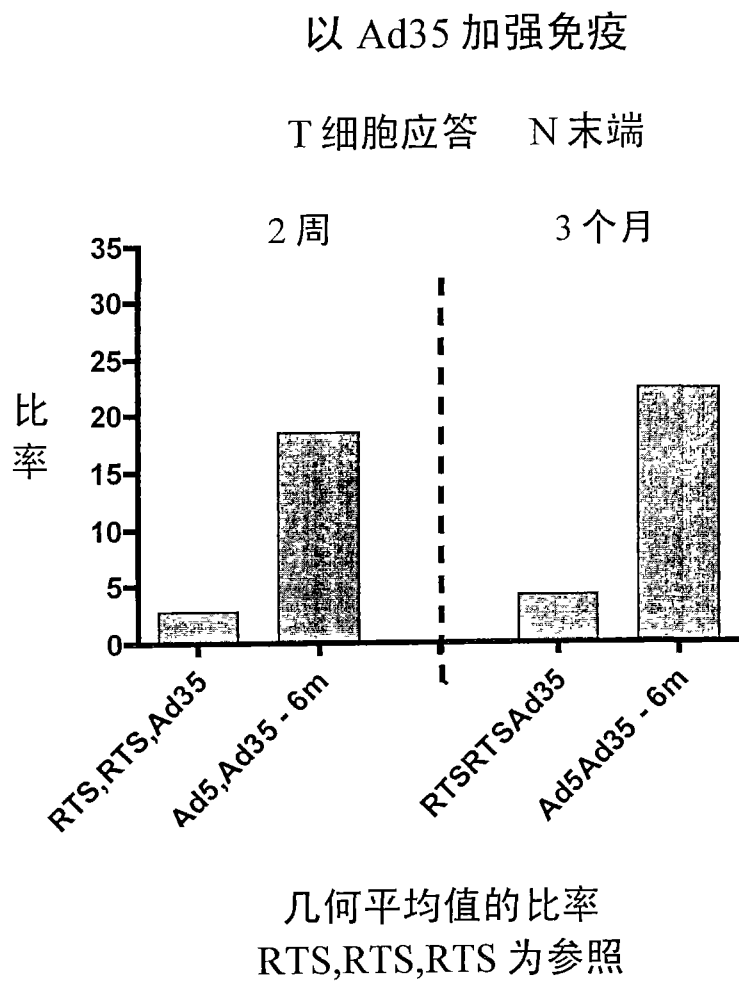


图 12