



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1934448 B

(45) 授权公告日 2012.01.11

(21) 申请号 200380107599.9  
 (22) 申请日 2003.11.20  
 (30) 优先权数据  
 60/427,911 2002.11.20 US  
 (85) PCT申请进入国家阶段日  
 2005.06.24  
 (86) PCT申请的申请数据  
 PCT/US2003/037498 2003.11.20  
 (87) PCT申请的公布数据  
 W02004/045559 EN 2004.06.03  
 (73) 专利权人 萨那里亚有限公司  
 地址 美国马里兰州  
 (72) 发明人 斯蒂芬·L·霍夫曼  
 托马斯·C·卢克  
 (74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限  
 责任公司 11287  
 代理人 王允方  
 (51) Int. Cl.  
 A61K 39/00 (2006.01)  
 A61K 39/002 (2006.01)  
 A61K 39/015 (2006.01)  
 G01N 33/536 (2006.01)

Zapata JC, et al.. Reproducible infection of intact Aotus lemurinusgriseimembramonkeys by Plasmodium falciparum sporozoiteinoculation.. Journal of Parasitology88 4. 2002, 88(4), 723-729.  
 Schofield L, et al.. Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model ofmalaria.. Nature418 6899. 2002, 418(6899), 785-789.  
 Collins WE, et al.. Potential of the Panama strain of Plasmodium vivax for thetesting of malarial vaccines in Aotus nancymai monkeys.. The American society of Tropical medicine and Hygiene. 67 5. 2002, 67(5), 454-458.  
 Kramer LD and Vanderberg JP.. Intramuscular immunization of mice with irradiatedPlasmodiumberghei sporozoites.. The American journal of Tropical Medicine and Hygiene24 6 Pt 1. 1975, 24(6 Pt 1), 摘要, 第 913 页左栏第 1-5 行、右栏第 5-32 行, 第 914 页表 1 及附注.

审查员 王晓媛

(56) 对比文件  
 US 5766597 A, 1998.06.16, 全文.  
 CN 1053814 A, 1991.08.14, 全文.  
 CN 1341150 A, 2002.03.20, 全文.

权利要求书 1 页 说明书 18 页

(54) 发明名称  
 疟疾预防方法

(57) 摘要  
 本发明包括一种用于保护患者抵抗疟疾的新颖方法。本发明的方法涉及用减毒孢子接种,特别是(但不限于)皮下、肌内、皮内、粘膜、粘膜下层和经皮肤施用。

1. 一种用于在人类宿主中激发一免疫反应并赋予所述宿主抵抗一种或多种引起疟疾的疟原虫子孢子寄生虫种类的保护性免疫的疫苗,其是通过一途径施用,所述途径是从由下列施用组成的群组中选出:皮下、真皮、肌肉、上皮、粘膜、粘膜下层及皮肤组织施用,所述种类是由以下种类组成的群组中选出:恶性疟原虫和间日疟原虫,所述疫苗包括能够侵入所述宿主的细胞的减毒疟原虫子孢子寄生虫和一载体,藉此激发所述免疫反应以抵抗在随后的所述种类寄生虫攻击后发生疟疾。
2. 如权利要求 1 所述的疫苗,其中所述子孢子是从按蚊唾液腺获得。
3. 如权利要求 1 所述的疫苗,其中所述疟原虫寄生虫的种类为恶性疟原虫寄生虫。
4. 如权利要求 1 所述的疫苗,其包括恶性疟原虫子孢子和至少一种额外的疟原虫子孢子种类。
5. 如权利要求 1 所述的疫苗,其中所述细胞包括肝细胞,并且所述寄生虫不会诱导随后的肝细胞破裂。
6. 如权利要求 1 所述的疫苗,其中所述细胞包括肝细胞,所述寄生虫诱导肝细胞破裂,并且所述寄生虫随后不能在宿主红细胞中发育。
7. 如权利要求 1 所述的疫苗,其中所述减毒是通过辐照、基因操作或用化学品处理子孢子达成。
8. 如权利要求 7 所述的疫苗,其包括辐照减毒的疟原虫子孢子。
9. 如权利要求 8 所述的疫苗,其中所述子孢子在处于蚊子体内时受到辐照。
10. 如权利要求 8 或 9 所述的疫苗,其中所述辐照包含减毒辐照剂量为至少 12,000cGy,并且不超过 23,000cGy。
11. 如权利要求 10 所述的疫苗,其中所述剂量约 15,000cGy。
12. 如权利要求 1 所述的疫苗,其包括至少 1,000 个子孢子,但不超过 10,000,000 个子孢子。
13. 如权利要求 1 所述的疫苗,其经配制用于随后将一或多份疫苗加强剂量施用至所述宿主。
14. 如权利要求 1 所述的疫苗,其进一步包括一重组亚单位组分,所述重组亚单位组分是从由下列组分组成的群组中选出:重组蛋白、重组病毒、重组细菌、重组寄生虫、DNA 和 RNA。
15. 如权利要求 13 所述的疫苗,其中一或多份所述疫苗加强剂量包括至少 1,000 个子孢子,但不超过 10,000,000 个子孢子。
16. 如权利要求 13 所述的疫苗,其中一或多份所述疫苗加强剂量进一步包括:
  - i) 重组蛋白,其包括重组亚单位组分,
  - ii) 表达重组亚单位组分的重组病毒,
  - iii) 表达重组亚单位组分的重组细菌,
  - iv) 编码重组亚单位组分的 DNA,或
  - v) 编码重组亚单位组分的 RNA。
17. 如权利要求 15 所述的疫苗,其中所述疫苗剂量包括至少 1000 个子孢子,但不超过 10,000,000 个子孢子。

## 疟疾预防方法

[0001] 对相关申请案的交叉参照

[0002] 本申请基于在 2002 年 11 月 22 日提出申请的美国临时申请案 S. N. 60/427, 911, 并且主张该临时申请案的权利。所述临时申请案的整个揭示内容以引用方式并入本文中。

### 技术领域

[0003] 本申请案涉及通过施用一疫苗来预防疟疾。更具体而言, 本发明涉及一种抵抗疟疾感染的疫苗, 其包括将减毒孢子施用至人类或动物。

### 背景技术

[0004] 疟疾是一种疾病, 这种疾病影响 3 至 5 亿人口, 每年可夺去 100 万至 300 万人的生命, 并且对发展中世界人口, 尤其是对附属于撒哈拉沙漠的非洲地区人口造成巨大经济冲击 [1, 2]。对于世界上由疟疾导致的死亡, 恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 占绝大部分。世界旅游组织 (the World Tourist Organization) 报告说, 2000 年全世界范围有近 7 亿次国际旅游者到达记录, 约 900 万人到西非、中非和东非, 3, 700 万人到东南亚, 600 万人到南亚, 并且 1, 000 万人到大洋州 [3]。据估计, 每年有超过 10, 000 名来自北美、欧洲和日本的旅游者接触到疟疾。100 多年来, 在疟疾传播地进行的军事战役中, 美国军队由疟疾造成的伤亡远超过由敌方火力造成的伤亡。据估计, 第二次世界大战中疟疾共造成损失 12, 000, 000 个人日, 越南战争中疟疾共造成损失 120 万个人日 [4]。

[0005] 通过经感染雌按蚊 (*Anopheles mosquito*) 叮咬, 寄生虫疟原虫 (*Plasmodium*) (引起疟疾的原生性疟原虫) 得以传播, 按蚊从黄昏到黎明一直都很活跃。孢子经血流从叮咬位置迁移至肝脏, 在肝细胞中, 孢子得以繁殖, 以恶性疟原虫为例, 每个感染细胞产生 10, 000 至 40, 000 个子代。这些肝脏阶段寄生虫表达一组抗原, 该组抗原不在孢子中表达。该新一代寄生虫作为裂殖子重新进入血流, 表达一组抗原, 该组抗原不同于孢子和早期肝脏阶段表达的抗原, 并侵犯红细胞, 在红细胞中的额外增殖每 48 小时可使寄生虫数量增加约 10 至 20 倍。肝脏中 5 至 10 天的发育不诱导任何疾病症状或征候, 与之不同, 如果血液阶段感染不经治疗, 则会引起溶血、寒颤、高烧和衰竭。恶性疟原虫是感染人类的四种疟原虫中最危险的一种, 当受其感染时, 该疾病因破坏微循环血流并导致重要器官 (如大脑、肾脏和肺) 的代谢改变而恶化, 如果不及时治疗常会导致死亡。

[0006] 一种能抵抗恶性疟的有效疫苗仍为重大医学挑战之一。尽管经过 100 多年的努力, 在研究中投入数千万美元, 专业医师和科学家为之付出了毕生努力, 并且已研制出许多有希望的实验疫苗, 但市面上仍没有疫苗可减轻人类这些巨大感染性灾祸之一。约 30 年前, 人们提出的使用氯喹、DTT 和媒介控制计划的公共卫生倡议似乎准备要减轻恶性疟在世界范围内的威胁。有效疫苗的缺乏使这些努力难以实施, 但是可持续性控制似乎即将来临。

[0007] 成功即将来临的希望转瞬即逝, 失败有多方面的原因。寄生虫对高效和可用抗疟药物的抵抗力日益增加, 媒介控制措施落后, 并且在发展中世界的地方病区域, 移居、战争和经济破坏日益普遍。结果, 恶性疟死而复生, 每年将 25 亿人置于险境, 引起 3 亿至 9 亿例

感染,并夺取 100 万至 300 万人的生命。在困扰发展中世界的许多社会、经济、环境和政治问题中,恶性疟日益被看作是这些不公平的根源,同时又是这些不公平的残酷结果,并且是解决这些复杂问题的一个障碍。在没有一有效疫苗的情况下,也许有可能控制发展中世界的恶性疟。实际上,在社会、政治和经济现实条件下,本发明的发明者相信,疫苗可能是可持续性控制计划中的一基本要素,并且全球根除战役将需要疫苗。

[0008] 正是由于这个原因,疟疾疫苗现代开发阶段尤为挫折。自从 20 世纪 80 年代早期以来,分子生物学和医学科学技术已取得惊人的进展。这些进展加速了阶段特异恶性疟原虫蛋白和抗原表位以及宿主免疫机制和反应的鉴别。这种知识转化为一系列新颖的候选疫苗 [5,6]。就某种意义来说,这个现代阶段是疟疾疫苗研究和人类试验的黄金阶段。然而,尽管疟疾研究者付出了巨大努力,但这些疫苗中大部分已不能在人类中提供任何保护性免疫力,其中仅有一种在 40%至 70%接受者中表现出短时抵抗感染的可复现性保护 [7-9]。

[0009] 如果时间和资源充足,这些疫苗策略或者其它仍待研发的策略最终可能会产生一种有力的疫苗。然而在最近一次名为“疟疾的挑战:从幼儿到基因组到疫苗 (Malaria's Challenge :From Infants to Genomics to Vaccines)”的 Keystone 会议上 (6),在与会者中调查了他们认为疟疾疫苗何时可作为一商业产品投放市场这一问题。许多与会者表示,他们认为直到 2016 年至 2025 年,第一支疟疾疫苗才会投放市场。致力于开发重组恶性疟原虫环孢子蛋白 (PfCSP) 疫苗的 Glaxo Smith Kline (GSK) 领导者表现得最为乐观。表示如果一切运行良好,该单支蛋白疫苗将在 7 至 8 年后 (2009 年至 2010 年) 投放市场。如果自从 1984 年 PfCSP 克隆以来 GSK 和美国军方一直研究一种重组蛋白 PfCSP 疫苗 [10],而且许多疟疾学家仍关注一单支蛋白疫苗是否足以可持续性控制疟疾,那么,该超过 25 年的开发单支蛋白疫苗的时限在开发能够真正减少这种疾病负担的疫苗的可能性上提出一令人沮丧的现实观点。

[0010] 用辐照减毒孢子免疫接种后的保护性免疫:1967 年, Nussenzweig 报道,对 A/J 小鼠静脉施用经辐照减毒的伯氏疟原虫 (*P. berghei*) 孢子可保护小鼠免受感染性伯氏疟原虫孢子的攻击 [11]。这些啮齿动物研究推动了人类研究,并且在 20 世纪 70 年代早期,两个小组确定,用射线照射其唾液腺中携带恶性疟原虫孢子的蚊子后使其叮咬人类志愿者来免疫接种,可保护志愿者免受全感染性恶性疟原虫孢子的攻击 [12-19]。这些研究表明由疟疾疫苗提供的无菌保护性免疫是可能的。然而,在当时产生孢子的唯一方法是用恶性疟原虫感染一志愿者,用一定剂量氯喹治疗志愿者以抑制但不清除寄生虫,允许配子体发育,然后用蚊子叮咬志愿者。即使由这种方法可产生足够数量的孢子,用一经辐照孢子疫苗免疫人类在临床上、技术上和逻辑上都被认为不可行。在很大程度上,这是因为孢子必须以活的形式施用,如同对于小鼠,通过用感染的蚊子叮咬施用,或者通过静脉注射施用。活跃于此领域的科学家总结,与通过静脉注射或通过感染蚊子叮咬的免疫接种比较,其它途径的免疫接种不会提供足够或相当的保护;根据他们的观点,本质上排除了使用减毒孢子作为疫苗。数位这些科学家所发表的观点引用于下文。

[0011] “这个观察结果确证了先前报道 (Nussenzweig, Vanderberg 和 Most, 1967 和 1969) 并且扩展了他们的发现。通过其它非经肠途径 (*i. m.*, *i. p.* 和 *i. c.*) 免疫的各组小鼠表现出的整体保护水平远低于 *i. v.* 免疫小鼠。” [20]

[0012] “这些研究已证实一先前报道,所述报道显示,在保护性免疫小鼠以抵抗孢子诱

导的疟疾方面,肌肉注射伯氏疟原虫的经辐照孢子远不如静脉注射有效。... 阻碍扩展至人类试验的首要限制是所需静脉免疫方法存在不可接受的医疗风险。”(此引用所涉及研究中,由肌肉途径产生的保护在 11%至 42%之间,由皮下途径产生的保护为 0%) [21]。

[0013] “进一步表明,在用于啮齿动物疫苗接种尝试的各种免疫途径 (i. m. , i. v. , 皮下, 口服等) 中, 静脉途径给予最高的保护程度和可复现性最高的结果。另一仅有的非常有效的免疫途径是通过经感染并经辐照的蚊子叮咬。” [22]。在 1980 年的题为“经辐照减毒孢子在疟疾免疫预防中的应用 (Use of Radiation-attenuated Sporozoites in the Immunoprophylaxis of Malaria)” 的这篇评论中, Nussenzweig 博士继续讨论了开发一孢子疟疾疫苗的潜力, 并且总结到: “总而言之, 最近的发现似乎表明, 我们现在拥有必需的有力工具, 这些工具会提供用于阐明孢子诱导免疫力的机制和分离保护性抗原的手段。在这些条件下, 疟疾孢子疫苗开发中的各种障碍似乎均可克服, 希望在不远的将来可以实现。” Nussenzweig 博士没有讨论使用一全减毒孢子疫苗作为适当替代物的想法, 仅讨论了使用孢子提供疫苗的组分, 来诱导抵抗孢子阶段的免疫力。

[0014] 1980 年, 在对经辐照孢子疫苗模型研究近 15 年之后, 此领域所公认的领导者 Nussenzweig 博士总结到, 研制疫苗的途径存在于现代科学; 理解保护的免疫机制和那些保护性免疫反应的抗原靶, 并且构建一“亚单位”孢子疫苗。从那时起, 文献中基本未提及或讨论尝试开发一减毒全寄生虫孢子疫苗作为人类可用疫苗, 这有多种原因, 尤其是, 尽管进行了这 15 年的研究, 但除了通过静脉施用或通过经感染蚊子叮咬外, 仍没有科学家发现一种适当的孢子施用方法。

[0015] 没有进一步的工作来开发一减毒孢子疫苗, 原因在于, 所述孢子必须在无菌蚊子中繁殖, 必须无菌净化, 并且必须以适宜方式保存且在施用前重构, 并且在经此处理之后施用时, 仍必须能够引起保护性免疫反应。

[0016] 曾报道部分生产问题的潜在解决方法, 尽管当时并未认识到此与开发一减毒孢子疫苗有关。1975 年, 报道一体外培养恶性疟原虫的方法 [23, 24], 随后, 1982 年, 报道一从这些培养物中产生配子体的方法 [24]。1986 年, 据报道, 在以这些体外培养物为食的蚊子中产生的孢子可感染人类 [26]。因此, 有一种产生孢子的方式, 其不存在于人体中活体产生配子体的困难。这些发展单独并不足以克服开发减毒孢子疫苗中的所有困难。没有一种方式可产生足够孢子或者在满足常规标准的条件下产生和处理所述孢子。另外, 没有数据表明, 正确产生和处理的孢子能够以临床可接受和可行方式成功地加以施用。

[0017] 因此, 由于疟疾科学界未能发现一种以临床可接受和可行方式来施用减毒孢子来达成高水平保护的方法, 此后减毒孢子疫苗不再受到临床关注, 并且, 正如 Nussenzweig 博士所预见 (上述 [012] 段: 参见原文段落), 疟疾科学界接受了现代分子生物学以期开发出一种疫苗。数个有希望的研制成果开始了疟疾亚单位疫苗开发的现代纪元。已生产出一种抵抗孢子主要表面蛋白即环孢子蛋白 (CSP) 的单克隆抗体, 并且已证明在被动传递实验中该单克隆抗体可保护小鼠 [27]。此外, 编码 PfCSP 蛋白的基因已被克隆, 并已测序 [10]。同时, 已开发出首例纯化重组蛋白疫苗 B 型肝炎表面抗原疫苗并已投放市场 [28]。疫苗科学中证据和趋势的砝码似乎为疟疾研究者提供了一路标, 以快速开发一人类疟疾疫苗。既然认为生产和施用孢子疫苗不可行, 那么重返减毒全寄生虫疫苗似乎已无必要并已过时, 所有接下来的努力都集中在亚单位疫苗的希望上。

[0018] 1987年,当未证明首例重组蛋白[29]和合成肽[30]疫苗具有所预期的保护性时,科学家没有考虑开发被认为不能生产和施用的减毒孢子疫苗,而是集中了解负责保护性免疫的免疫机制及这些保护性免疫反应的抗原靶,并开发诱导这种保护的亚单位疫苗和疫苗递送系统。许多这种基础工作在伯氏疟原虫和约氏疟原虫(*P. yoelii*)啮齿动物模型系统中开展。这种啮齿动物疟疾工作使人们对经辐照孢子疫苗诱导的保护的免疫学机制和抗原靶有了重要的深入了解,并且导致开发出许多候选疫苗[31-33]。在1984年克隆出编码恶性疟原虫环孢子蛋白(PfCSP)基因后至本千年末期所进行的这些研究无一表明开发一人类经辐照全孢子疫苗的可能性,原因在于这些研究者皆认为,不可能以可行方式生产或施用这样一种疫苗。有趣地是,亚单位(重组蛋白、合成肽、重组病毒、DNA质粒)疫苗制剂已在小鼠中显示可产生极好的保护,但未在人类中达成相似的结果。相反,小鼠中经静脉施用经辐照孢子可产生保护[11]导致了人类研究,所述人类研究表明,由唾液腺中携带恶性疟原孢子孢子的经辐照蚊子叮咬,可诱导保护[34]。

[0019] 1989年,在经过许多令人失望的亚单位PfCSP疫苗临床试验之后,在海军医学研究所(Naval Medical Research Institute, NMRI)即后来的海军医学研究中心(Naval Medical Research Center, NMRC)和华特瑞陆军研究院(WalterReed Army Institute of Research, WRAIR)开始对志愿者进行免疫接种,所述免疫接种经唾液腺携带恶性疟原孢子孢子且后经活体暴露于 $\gamma$ 射线减毒的蚊子叮咬获得。这个研究目标是更好地详细记述临床特征和导致使用经辐照孢子疫苗保护人类的必需条件,评估人类中所引起的保护性免疫反应,并且鉴定在那些蛋白上引起人类免疫反应的抗原和抗原表位。从来没有人想到开发经辐照孢子作为人类疫苗,因为人们认为生产这种疫苗和施用这种疫苗皆完全不可行,并且在技术上难以实施。已经发表了来自这些研究的初步临床结果和大量免疫学分析结果[35至41]。这些免疫学研究与这一学科的其他研究[42至48]结合在一起,增加了我们对辐照减毒恶性疟原孢子所免疫接种的人类中免疫学反应的理解。然而,没有人考虑或提及尝试开发一减毒孢子疫苗。

[0020] 最近报道了通过这些免疫接种和攻击所取得的首个10年临床实验结果,并结合所有已发表的关于辐照疟原孢子免疫接种人类的报道[34],所述已发表的报道来自University of Maryland(20世纪70年代、20世纪80年代和20世纪90年代早期)、芝加哥的Rush-Presbyterian-St Luke's Medical Centre和海军医学研究所(20世纪70年代)[12至19,34]。许多评论来自所实施的分析。

[0021] A). 在通过5至14只经感染蚊子叮咬攻击的志愿者中,其保护性免疫力存在一剂量反应。当在其最后一次初次免疫接种10周内受到攻击时,经超过1000只经感染和经辐照蚊子叮咬免疫接种的14名志愿者中有13名(94%)受到保护,没有发展成血液阶段恶性疟原虫感染。这些志愿者共进行35次攻击,35次攻击中有33次(94%)受到免于发展成抵抗血液阶段感染的完全保护。当在其最后一次初次免疫的10周内受到攻击时,经大于超过200只且小于1000只经感染和经辐照蚊子叮咬免疫接种的10名志愿者中有4名(40%)受到保护,没有发展成血液阶段恶性疟原虫感染,保护性免疫水平显著低于用大于1000次感染性叮咬免疫接种的志愿者的保护性免疫水平( $p = 0.0088$ , Fisher's 精密试验,双尾检定)。对用少于1000次感染性叮咬免疫接种的志愿者进行15次攻击,15次中有5次(33%)存在对抵抗发展成血液阶段感染的完全保护,保护性免疫水平显著低于用大于

1000 次感染性叮咬免疫接种的志愿者中的保护性免疫水平 ( $p = 0.000015$ , Fisher's 精密试验, 双尾检定)。

[0022] B). 保护性免疫至少持续 42 周 (10.5 个月)。在最后一次初次免疫接种或再次免疫接种后从 23 周至 42 周 (23、36、39、41 和 42 周) 攻击上述 14 名志愿者中的 6 个时, 有 5 名受到保护, 可抵抗实验性攻击。除对一名志愿者在最后一次免疫接种后 5 年进行一次攻击外 (未受到保护), 未实施用以评估保护性免疫寿命的其它攻击。

[0023] C). 保护不具菌株特异性。用四种不同于志愿者免疫接种用分离菌的恶性疟原虫分离菌攻击 4 名志愿者。在用不同恶性疟原虫分离菌进行的 7 次攻击中, 所述 4 名志愿者均受到完全保护。

[0024] D). 免疫记忆持续至少 5 年。一名曾经 1601 只经辐照的感染蚊子叮咬的志愿者, 在最后一次呆咬后 9 周和 42 周攻击时, 仍受到保护; 当最后一次受到经辐照的感染蚊子叮咬后 5 年, 再攻击时, 未受到保护。对所述志愿者的疟疾进行治疗, 通过用 147 只经辐照的经感染蚊子叮咬加强治疗, 通过用 5 只未经辐照的感染有恶性疟原虫孢子子的蚊子叮咬重新攻击。这名志愿者受到保护, 可抵抗感染攻击 [34], 其表明用经辐照孢子子处理一次即可加强保护性免疫。

[0025] 因此, 在经超过 1000 只蚊子叮咬后, 在所进行的攻击实验中, 90% 以上可获得保护, 所述保护至少可持续 10.5 个月, 而且不具有分离菌 (菌株) 特异性。

[0026] 人们认为, 在人类受试者中表现出这种保护性功效水平的“亚单位”疫苗为一重要突破。尽管通常观察到, 保护来自于这种实验性经辐照孢子子疫苗, 但直到发表该报告所必需的仔细分析结束后, 人们才认识到减毒孢子子的强大力量。有趣地是, 当我们 (SLH) 中的一成员在 2002 年 3 月名为“疟疾的挑战: 从幼儿到基因组到疫苗”的 Keystone 会议上公布这些结果时, 人们认为这些结果很有趣, 但是听众中甚至没有一个人产生将这种方法作为可行疟疾疫苗继续研究的想法, 原因在于所有人都认为, 这种疫苗不可能产生并且无法施用。科学界中仍旧广泛持有这种观点。在最近出版的 Nature 杂志中 (2003 年 10 月 2 日) [49], 海军医学研究中心疟疾项目临床试验的主持者说: “障碍似乎已足够令人畏缩, 没有人愿意做一次尝试,” 并且, 一位来自英国牛津大学的一名疟疾疫苗专家说: “这是一个远景…… 值得一试, 尽管成功的可能性很小。”相反, 本发明的发明者认为能够制造这种疫苗, 但在转到 cGMP 生产和临床试验之前, 有几个重要问题需要回答。这些问题略述于最近的一出版物中 [50]。最重要问题之一为, 是否能够通过一种对人类疫苗而言可行的途径来施用减毒孢子子?

## 发明内容

[0027] 迄今, 据认为, 用减毒疟原虫孢子子免疫接种人类不现实, 原因在于必须通过经感染和辐照的蚊子叮咬施用孢子子来免疫接种, 或通过静脉注射来施用孢子子, 这正如之前分别在人类和小鼠上进行的那样, 并且被科学界视为获得高水平保护性免疫的唯一方式。

[0028] 已建立如下理论: 当通过蚊子叮咬或静脉注射正确施用经辐照孢子子时, 所述孢子子经血流进入肝脏, 侵入肝细胞, 部分发育, 然后停止发育, 永远不会发育为成熟肝裂殖体, 而肝裂殖体会破裂, 并释放裂殖子, 引起红细胞感染, 这种疾病即为已知的疟疾。因此, 所述孢子子必须经过减毒。数据表明, 为引起足够保护性免疫反应, 寄生虫必须侵入红细

胞,部分发育,并且表达新蛋白作为保护性免疫反应的靶标,尤其是 CD8T 细胞。

[0029] 本发明的发明者提出以下理论,未经辐照孢子制剂的感染性与减毒时引起保护性免疫的能力间存在一直接相关性/联系。另外,我们提出以下理论,当用一特定方法施用,未经辐照孢子的感染性与那些当经辐照并用所述方法施用时的孢子引起保护性免疫的能力间存在一直接相关性/联系。

[0030] 本文所述的本发明是应所提出的以下问题而发现:人们可否通过一种对人类疫苗可行的途径来施用减毒孢子?

[0031] 使用约氏疟原虫啮齿动物疟疾寄生虫而非使用伯氏疟原虫啮齿动物疟疾寄生虫来解决该问题,所述伯氏疟原虫啮齿动物疟疾寄生虫已在上述引用的所有报道中加以研究[11, 20-22]。伯氏疟原虫模型系统用于确认经辐照孢子可保护 A/J 小鼠,并且这导致了人类研究,所述人类研究表明暴露于经辐照的恶性疟原虫感染蚊子可保护人类。伯氏疟原虫系统还用于向科学界证实,经辐照孢子的肌内、皮下和其它非静脉施用途径在小鼠中不具备足够保护作用[20-22]。事实上,皮下施用辐照减毒孢子后,保护作用为 0% [21]。这些主要在 A/J 小鼠上进行的研究得出以下结论:不可能将辐照孢子开发为一可行且临床上相关的人类疟疾疫苗。20 世纪 80 年代早期到中期,海军医学研究所实验室从在 A/J 小鼠中研究伯氏疟原虫转变为在 BALB/c 小鼠中研究约氏疟原虫。这是由于海军医学研究所的科学家认为,静脉施予约氏疟原虫的 BALB/c 小鼠与静脉施予伯氏疟原虫的 BALB/c 小鼠相比对于人类中的恶性疟原虫感染更具预见性。在很大程度上,这是因为向小鼠静脉施用约氏疟原虫孢子与静脉施用伯氏疟原虫孢子相比,更具感染性。向 BALB/c 小鼠静脉施用约氏疟原虫的 50% 感染剂量比向 BALB/c 小鼠施用伯氏疟原虫的 50% 感染剂量小约 100 至 1000 倍,并且几乎可以肯定与伯氏疟原虫相比其与灵长动物中的疟原虫属寄生虫(例如猴子中的诺氏疟原虫 (*P. knowlesi*) 及人类中的恶性疟原虫)的 50% 感染剂量更加相当。20 世纪 90 年代早期,海军小组开始用约氏疟原虫代替伯氏疟原虫进行研究后约 10 年,在阅读论文和听过来自海军小组科学家的演讲之后, Nussenzweig 博士从发明者 (SLH) 之一索求海军实验室使用的约氏疟原虫寄生虫,并且基本上将她的小组在纽约大学关于啮齿动物疟疾的研究工作改变至约氏疟原虫模型系统,主要用 BALB/c 小鼠进行研究工作。

[0032] 重要的是应注意,所有用约氏疟原虫进行的工作都集中在通过静脉注射或蚊子叮咬的施用,这几乎一定是由上述在伯氏疟原虫模型系统中进行的先前工作导致[11, 20-22]。另外,由于在伯氏疟原虫模型系统中的工作,没有人曾在约氏疟原虫系统中进行实验,尝试利用约氏疟原虫系统作为模型来开发一减毒全孢子疫苗。出于与 1980 年 Nussenzweig 所述相同的科学目的[22],科学家已在约氏疟原虫啮齿动物疟疾系统中用辐照孢子进行免疫接种;以鉴别保护性免疫的免疫机制和这些保护性免疫反应在寄生虫上的抗原靶。因此,既然 25 余年以来,“习知”仅孢子的静脉或蚊子叮咬施用可提供 100% 保护性免疫,使辐照孢子模型如此有效,这些已成为在此系统中工作的科学家使用的施用途径。还未使用其它可使经辐照孢子在临床上可行并且为人接受所需要的途径(使如皮下、肌内、皮内及其它)。

[0033] 本发明的发明者已发现一种用于免疫接种受试者来抵抗疟疾的方法,所述方法容许在相当短的时间内用减毒孢子接种大量受试者,可避免通过感染蚊子叮咬或通过静脉注射(如果为小鼠)的先前方法的不可行性和潜在危险,并且所述方法提供与这些先前方

法所达成的保护相当的保护。

[0034] 更具体而言,我们已发现,通过一不同于静脉注射的途径向受试者以非经肠方式施用一减毒孢子剂量,能够获得抵抗疟疾的有效保护,所述途径包括但不限于皮下、肌肉、皮内、粘膜、粘膜下层、表皮和经皮途径。

### 具体实施方式

[0035] 本发明提供一种在临床上相关且可接受的施用减毒疟原虫属寄生虫的新颖方法,所述方法使减毒孢子可用作在人类、哺乳动物、鸟类和其它相关物类中预防疟疾的疫苗。

[0036] 与先前通过静脉注射或通过感染蚊子叮咬施用减毒孢子的标准方法相比,本发明的显著改进是,其使得可用一种在临床上可行且安全的方法施用疫苗,提供与先前标准方法相当的保护。显而易见,通过感染蚊子叮咬施用永远不会用作疫苗,通过静脉注射施用这一方法通常不用于疫苗,因为静脉注射是一种技术困难的施用方法,尤其是在幼儿中,因是直接注入血流中而具有潜在危险。

[0037] 根据本发明,非经肠施用可在皮肤(经皮、表皮、皮下)、皮下组织(皮下)、肌肉(肌肉)中、通过粘膜或较佳地在粘膜下层组织中施用。最佳以粘膜下层、皮内或肌肉方式施用。

[0038] 减毒的目的在于减弱寄生虫,使其生存能力足以侵入宿主细胞并产生新蛋白,但不能产生一可引起疾病的无性血液阶段感染。减毒可通过多种方式进行。例如,可通过使寄生虫减毒,以便经接种孢子可侵入宿主细胞,在这些细胞中部分发育,并在到达与成熟肝脏阶段寄生虫相当的阶段之前停止发育,而成熟肝脏阶段寄生虫会破裂而释放裂殖子,侵入红细胞并引起疾病。这种类型的减毒寄生虫可命名为代谢上活性的非复制型寄生虫。减毒也可通过产生寄生虫来进行,所述寄生虫可侵入并在宿主细胞中正常发育至与成熟肝脏阶段寄生虫相当的阶段,可从宿主细胞破裂,但不能在红细胞中发育至引起疾病所需的程度。这也可通过使寄生虫减毒来进行,以便寄生虫可侵入并在宿主细胞中正常发育至与成熟肝脏阶段寄生虫相当的阶段,从宿主细胞破裂,但不能在红细胞中发育至引起重大疾病所需的程度。这也可通过使寄生虫减毒来进行,以便孢子部分发育并产生新蛋白,但在到达与成熟肝脏阶段寄生虫的阶段前停止发育,而成熟肝脏阶段寄生虫会破裂而释放裂殖子,侵入红细胞并引起疾病。

[0039] 虽然可使用许多减毒方法,但我们发现,目前通过辐照减毒来产生上代谢活性的非复制型寄生虫较佳。孢子减毒可通过多种方式和多种剂量方案来完成。减毒可在以下时期完成:当孢子仍在蚊子体内时,在孢子已从蚊子体内分离出之后和诸如冷冻保存等介入之前,或在孢子已从蚊子体内分离出之后和在诸如冷冻保存等介入之后。基于先前经验,对于恶性疟原孢子,目前的辐照剂量通常大于 12,000Rads(cGy) 并小于 23,000Rads(cGy),最常用剂量为 15,000Rads(cGy) [34]。所属技术领域的技术人员可了解,该剂量可因种类不同、或菌株不同、或用于辐照孢子的装置和技术不同而变化。所属技术领域的技术人员可了解,可使用各种方法完成辐照,包括但不限于  $\gamma$  射线、x-射线、紫外线、或者其它诸如电子、质子等亚原子粒子,及这些方法的组合。

[0040] 将来,如上述 [39] 段(见原文段落)所介绍的减毒可在将寄生虫引入疫苗受体之前通过对寄生虫进行基因操作来完成。

[0041] 减毒也可通过以下方法达成:在暴露于孢子下之前或之后用可抑制寄生虫发育

的药物治疗个体,以便寄生虫可在肝细胞中复制。

[0042] 减毒也可通过以下方法达成:在暴露于孢子之前或之后用可抑制寄生虫发育的药物治疗个体,以便寄生虫可在红细胞中复制。

[0043] 减毒也可用可将寄生虫减毒的化学品处理孢子来达成。

[0044] 施用方法可以是除蚊虫叮咬或静脉注射施用外的任何其它接种方法,例如,但不限于用一个针和注射器、多个针和注射器阵列、具有一至成百上千个针孔的微针注射、通过弹道技术无针注射,等等。所述减毒孢子也可通过一经皮贴片或者在一微粒材料(使如金珠)上施用。虽然单次接种即可获得一定水平的保护,但实施两次或多次的系列接种或暴露较佳。

[0045] 较佳接种菌为一疟疾免疫接种有效量的减毒恶性疟原虫或其它疟原虫属孢子。人类中每次接种剂量在约 1,000 至 10,000,000 范围内变化,虽然这可能视行医者评估或者减毒孢子制剂的免疫原性/效力而有所变化。

[0046] 本发明方法中可使用任何疟原虫属寄生虫,即使其基因改变。在一实施例中,寄生虫是恶性疟原虫。举例而言,在另外一些实施例中,寄生虫可以是间日疟原虫(*P. vivax*)、卵形疟原虫(*P. ovale*)或三日疟原虫(*P. malariae*)。在另外一些实施例中,寄生虫可以是这些寄生虫的混合物。在再一些实施例中,寄生虫可以是诺氏疟原虫、约氏疟原虫、或者其它疟原虫属寄生虫。

[0047] 在一实施例中,本发明提供一种医药试剂盒,其包括置于一施用器械(如注射器)中的减毒孢子。

[0048] 在另一实施例中,本发明提供一种试剂盒,其包括一含有冷冻减毒孢子的容器(例如但不限于药瓶)、一含有稀释这些减毒孢子的液体的容器(例如药瓶)和实际施用器件(例如一注射器和针)。

[0049] 在另一实施例中,本发明提供一试剂盒,其包括一含有冷冻干燥(冻干)减毒孢子的容器(例如但不限于药瓶)、一含有稀释这些减毒孢子的液体的容器(例如药瓶)和实际施用器件(例如一注射器和针)。

[0050] 在其它实施例中,本发明提供一种试剂盒,其包括一含有所保存减毒孢子的容器(例如药瓶,但不限于药瓶)、一含有稀释这些减毒孢子的流体的容器(例如药瓶)和实际递送器件(例如一注射器和针)。

[0051] 本发明进一步提供利用非经肠施用本文所述的减毒疟原虫属孢子来施用疫苗以预防或降低疟疾严重程度。

[0052] 本发明提供对人类的部分、提高的或完全保护,此人此前未暴露于引起疟疾的病原体,或者已暴露但未受到完全保护。本发明还可用于降低发展成疟疾感染的机率,降低受到感染时变为疾病的机率,降低已感染时疾病(如发烧)的严重程度,降低受感染人体中的寄生虫浓度,或者降低当暴露于疟疾寄生虫时由疟疾导致的死亡率。在许多情况下,即使是部分保护也是有益的。例如,如果一疫苗治疗策略可对约 30% 的人群产生这些益处中的任何一种益处,则此策略即可对一个社区的健康及社区中的个人健康产生重要影响。

[0053] “疫苗”是一物质组合物,其包括一含有致病因子或其组分的制剂,施用其可激发一免疫反应,以保护人类免受由所述致病因子引起的疾病。治疗疫苗是在感染后施用,它意欲降低或停止疾病发展。预防疫苗则意欲预防初始感染。疫苗中所用致病因子可以是完全

失活（灭活）、活力减弱或者人工制造。疫苗可进一步包括一稀释剂、一佐剂、一载剂或其组合，所属领域的技术人员可容易地了解这一点。

[0054] 一疫苗可由数种分离组分构成。本文所用“分离组分”是指这样一种状况，其中术语疫苗实际包括两个分立疫苗，这两个分立疫苗将分开施用至受试者。从这种意义来说，一由分离组分构成的疫苗可视为是包括分离疫苗组分的试剂盒或包装。例如，就本发明来说，一包装可包括一减毒孢子组分和重组亚单位疫苗组分，该重组亚单位疫苗组分包括（但不限于）一重组蛋白、重组病毒、重组细菌、重组寄生虫、DNA 疫苗或 RNA 疫苗。

[0055] 一“有效”免疫剂量可在 1000 至 10,000,000 个子孢子范围内变化，但如果疫苗免疫原性/效力增加，则所述剂量可以更低。该疫苗可在多种时刻施用。一接种有效数量可为于一年内介于 1 至 6 剂之间，并且在随后数年施用“加强”剂量。

[0056] 上述概括介绍和下述详细介绍仅用于举例说明，而非限制本发明，本发明仅受权利要求书的限定。而且，本发明不限于所述具体实施例中，因此当然可有所变化。另外，由于本发明范围仅由其权利要求书限制，因此用于阐述具体实施例的术语并不意欲具限制性。

[0057] 关于数值范围，除非上下文另有明确说明，否则本发明涵盖该范围上下限之间的每一中间值，至该下限单位的至少十分之一。另外，本发明涵盖任何其它所述中间值。此外，除非明确不包括在所述范围内，否则本发明也涵盖不包括该范围上下限之一或二者的范围。

[0058] 除非另有说明，否则本文所用所有技术和科学术语的意义皆为本发明所属领域的技术人员所熟知。所属领域的技术人员也会理解，还可使用类似于或等效于本文所述方法和材料的任何方法和材料来实施或验证本发明。此外，所有本文所提及的出版物皆以引用方式并入本文中。

[0059] 必须注意的是，除非上下文中另有明确说明，否则本文和随附权利要求书中所用的单数形式“一 (a 或 and)”和“该 (the)”包括复数指示物。因此，例如，提及“一减毒孢子疫苗”时，包括一复数个该等孢子，并且，提及“该试剂”时包括指一或多种试剂及为所属领域的技术人员所熟知的其等效物，等等。

[0060] 另外，除非另有说明，否则说明书和权利要求书中用到的所有表示成分数量、反应条件、纯度百分比等数字均由术语“约”修饰。因此，本说明书和权利要求书中所示数字参数为近似值，其可视本发明的所需性质而有所变化。无论如何并非意欲限制权利要求书范围的等效项的原则的应用，每一数字参数皆应至少根据所报道的有效位的数量使用普通舍入技术来解释。虽然如此，仍尽可能精确地报道具体实例中所示的数值。然而，因实验方法的标准偏差，任何数值均固有地包含某些误差。

[0061] 显而易见，根据上述教导，可对本发明进行多种修改和改变。因此应了解，在随附权利要求书范围内，本发明可以不同于所具体阐述者的方式实施。

[0062] 下述实例进一步解释本发明。它们仅是解释本发明并揭示本发明某些实施例的各种有益性质。不应将这些实例理解为限制本发明。

[0063] 实例

[0064] 实例 1

[0065] 孢子皮内、肌内、皮下和静脉注射的感染性比较

[0066] 进行一项研究以调查经皮内 (ID)、肌内 (IM)、皮下 (SQ) 或静脉 (IV) 施用的新鲜解剖分离孢子的感染性比较。可注意到，IV 施用被视为达成感染的最可靠方法。

[0067] 方法:通过 ID、IM、SQ 或 IV 施与,用人工解剖唾液腺所分离的约氏疟原虫子孢子感染 BALB/c 小鼠。施用后 1 天至 14 天,通过评估厚血液薄膜来测定感染水平。结果显示于表 I 中。

[0068] 表 I

[0069]

组	子孢子数量	小鼠数量	感染数量	感染百分比
IV	100	10	10	100
ID	100	10	9	90
ID	500	10	10	100
IM	500	10	10	100
SQ	500	10	10	100

[0070] 这些数据表明通过在皮肤、肌肉或皮下组织中施用于孢子可以常规方式感染 BALB/c 小鼠。

[0071] 实例 2

[0072] 皮内、肌内、皮下和静脉施用多剂量子孢子的感染性比较

[0073] 进行一项研究以调查使用数量少于实例 1 所用新鲜解剖所分离孢子孢子的感染性比较。

[0074] 方法:通过多种途径 [皮内 (ID)、肌内 (IM)、皮下 (SQ) 或静脉 (IV)],用人工解剖唾液腺所分离的约氏疟原虫子孢子感染 BALB/c 小鼠。感染后至 14 天,通过评估厚血液薄膜来测定感染水平。结果显示于表 II 中。

[0075] 表 II

[0076]

组	子孢子数量	小鼠数量	感染数量	感染百分比
IV	10020 4	101010	109 3	10090 30
ID	10020 4	101010	831	803010
IM	10020 4	101010	731	70301
SQ	10020 4	101010	940	90400

[0077] 这些数据表明,通过 ID、IM 或 SQ 途径施用较小数量的由人工解剖唾液腺所分离的约氏疟原虫子孢子可导致小鼠感染,效率与通过 IV 途径感染几乎相同。由于我们已建立如下理论:当通过特定方法施用时的未经辐照孢子的感染性与彼等孢子当经辐照并通过该方法减毒时引起保护性免疫的能力之间存在一直接相关性 / 联系,因此,这些数据显示,通过 ID、IM 及 SQ 途径以及标准 IV 途径应能成功地进行免疫接种。

[0078] 实例 3

[0079] 通过皮内、肌内、皮下和静脉途径施用的单次剂量经辐照孢子的保护性功效

[0080] 进行一项研究以调查通过用单次剂量 (150,000 个经辐照减毒孢子) 免疫接种提供的保护作用比较。

[0081] 方法:通过 ID、IM 或 IV 途径使用单次剂量 (150,000 个辐照减毒孢子, 10,000Rads/cGy) 约氏疟原虫子孢子接种 BALB/c 小鼠。用于免疫接种的孢子通过密度梯度离心获得。10 天后,通过注射 100 个人工解剖唾液腺所分离的约氏疟原虫子孢子攻击小鼠。攻击后至 14 天,通过厚血液涂片评估感染。根据等级 1+(几乎检测不到)至 4+(严重感染)来评估感染水平。对照组未接受免疫接种。结果显示于表 III 中。

[0082] 表 III

[0083]

组	小鼠数量	4 天经保护 / 经	4 天感染水平	5 天经保护 / 经	5 天感染水	14 天经保护 / 经攻
		攻击		攻击	平	击
对	8	0/8	++++	0/8	++++	0/8
IV	6	2/6	+	1/6	+	0/6
ID	6	4/6	+	2/6	+	1/6
IM	6	3/6	+	2/6	+	0/6

[0084] 这些数据表明,通过 ID 和 IM 途径施用单次剂量经辐照孢子可引起一提供保护来抵抗孢子攻击的保护性免疫反应,所述保护作用与通过 IV 途径施用单次剂量经辐照孢子后所见到的保护作用相当。该发现通过上述实例 1 和 2 中所示感染性预知。因为 IM 和 ID 方法更易于大数量人群,并且所述施用与通过 IV 施用进行时更安全、更容易,因此本发明使得以一比之前所述更容易的方式用减毒孢子有效免疫接种大量人口成为可能。事实上,本发明第一次使减毒孢子疫苗的构思成为可能。施用单次剂量的经辐照孢子可降低所攻击小鼠中的寄生虫含量,这是许多疟疾疫苗学家所希望的效果,这种效果可能足以显著降低受体中疟疾的发病率和死亡率。然而,其不能完全抵抗感染。

#### [0085] 实例 4

##### [0086] 通过皮下和静脉途径施用的三份剂量经辐照孢子的保护功效

[0087] 进行一项研究以调查由通过 ID 或 IV 途径用一三份剂量辐照减毒约氏疟原孢子标准方案免疫接种所提供的对照保护作用;该方案预计可引起抵抗孢子攻击的完全保护作用。

[0088] 方法:用第一份约氏疟原孢子剂量 (50,000 个辐照减毒孢子,10,000RADS/cGy) 通过 SQ 或 IV 途径对 BALB/c 小鼠进行接种。这些小鼠接受两次加强剂量的 30,000 个辐照减毒孢子 (总共 110,000 个子孢子,分为三剂)。用于免疫接种的子孢子通过密度梯度离心获得。施用最后一次加强剂量之后 14 天,用 100 个人工解剖唾液腺所分离的约氏疟原孢子攻击经接种小鼠。测试后至 14 天,通过厚血液涂片评估感染。所述感染评估为有或无。结果显示于表 IV 中。

#### [0089] 表 IV

[0090]

组	小鼠数量	14 天保护 / 攻击	14 天保护百分比
对照	8	0/8	0
IV	7	7/7	100%
SQ	8	8/8	100%

[0091] 表 IV 中数据明显表明,通过皮下施孢子 (SQ) 可获得对抗感染的 100% 保护。这些结果可根据上述实例 1、实例 2 和实例 3 中所示研究结果预测到,但却首次于本实验中证明。已知通过 SQ、ID 和 IM 途径获得的感染性相当 (实例 2),似乎很明显,通过那些途径施孢子时可提供相当的保护作用。实例 4 中所报道的 100% 保护与先前所报道用经辐照减毒伯氏疟原孢子皮下免疫接种 A/J 小鼠获得的 0% 保护 [21] 形成鲜明对照。如上所述,我们认识到,在人类中,约氏疟原虫-BLAB/c 模型比伯氏疟原虫-A/J 模型系统与恶性疟原虫更为相关,我们认为这一认识使我们的发现成为可能。

#### [0092] 实例 5

[0093] 当通过静脉途径施用时由密度梯度离心所分离的子孢子与人工解剖唾液腺所获

### 得的子孢子的感染性比较

[0094] 在实例 3 和 4 中,通过施用经辐照子孢子使小鼠得到免疫,所述子孢子通过密度梯度离心分离。我们已推测,通过蚊子头部和胸节密度梯度离心所分离的子孢子与通过人工解剖唾液腺所分离的子孢子相比,感染性更低。如果是这样,并且如上所述,子孢子感染性与其引起保护性免疫的能力之间存在直接联系(段落 [068](见原文段落)),那么,为达成保护性免疫所需要的人工解剖唾液腺所分离的子孢子要远少于通过密度梯度离心所分离的子孢子。因此,本发明的发明者首先进行一试验,对通过密度梯度离心分离的约氏疟原虫子孢子的感染性与通过人工解剖唾液腺分离的子孢子感染性进行比较。

[0095] 方法:通过密度梯度离心或通过人工解剖唾液腺,从斯氏按蚊(*Anopheles stephensi*)分离出约氏疟原虫子孢子。通过用不同数量子孢子静脉注射接种 BLAB/c 小鼠。攻击后至 14 天,通过厚血液涂片评估感染。感染评估为有或无。结果显示于表 V 中。

[0096]

表 V

[0097]

#### 通过人工解剖或密度梯度离心分离的子孢子

[0098] 所注射

感染数量 / 攻击数量

[0099] 子孢子数量

人工解剖

密度梯度离心

[0100] 625

10/10

7/10

[0101] 125

10/10

4/10

[0102] 25

10/10

0/10

[0103] 5

5/10

0/10

[0104] 1

0/9

0/10

[0105] 50%感染剂量 (ID<sub>50</sub>) 4.9

433

[0106] 表 V 中数据明显表明,通过人工解剖唾液腺分离的子孢子与通过密度梯度离心分离的子孢子比较,更具感染性。对于通过密度梯度离心分离的子孢子,其 50%感染剂量超过 80 倍。如果许多减毒子孢子的保护功效与这些子孢子减毒前的感染性直接相关这一假设成立,那么,这些数据可表明,获得免疫所需的通过唾液腺人工解剖分离的子孢子数量要实质少于通过密度梯度离心分离的子孢子数量,其已成为在约氏疟原虫-BLAB/c 模型系统中分离子孢子进行免疫接种研究的标准方法。

[0107] 实例 6

[0108] 当通过静脉途径施用由密度梯度离心分离的子孢子与由人工解剖唾液腺获得的子孢子保护功效比较

[0109] 根据实例 5 中的感染性实验结果,设计一保护功效实验。根据先前实验已知通过密度梯度离心所分离的经辐照子孢子的方案的保护功效为 90%,将其与更低剂量的通过人工解剖唾液腺分离且经辐照的子孢子达成保护性免疫的能力进行比较。

[0110] 方法:用 10,000 Rads/cGy 的射线辐照感染有约氏疟原虫子孢子的斯氏按蚊。子孢子通过密度梯度离心分离,或通过人工解剖唾液腺分离。以两周的间隔通过静脉注射三份剂量的经辐照约氏疟原虫子孢子对 BALB/c 小鼠进行接种。组 1 接受通过密度梯度离心分离的子孢子(第一、二、三次剂量分别为 24,000、8,000 和 8,000 个)。组 2 至组 5 接受通过人工解剖唾液腺分离的子孢子。组 6 未接受免疫接种。在第三次免疫接种剂量之后 14 天,

用 100 个通过人工解剖唾液腺分离的约氏疟原虫子孢子攻击组 1 至组 6 中的小鼠。测试后至 14 天,通过厚血液涂片评估感染。感染评估为有或无。结果显示于表 VI。

[0111] 表 VI

[0112]

组	小鼠数量	感染数量	保护百分比
密度梯度离心 24000、8000、8000(1)	9	1	88.8%
人工解剖 18000、6000、6000(2)	10	0	100%
人工解剖 9000、3000、3000(3)	10	0	100%
人工解剖 4500、4500、4500(4)	10	0	100%
人工解剖 4500、1500、1500(5)	10	0	100%
对照未免疫接种小鼠(6)	10	10	0

[0113] [0113] 表 VI 中数据表明,用总共 40,000 个 (24000、8000、8000) 通过密度梯度离心分离且经辐照约氏疟原虫子孢子免疫的小鼠具有 90% 保护。用总共 7500 个 (4500、1500、1500) 通过人工解剖唾液腺分离且经辐照子孢子免疫的小鼠具有 100% 保护。这些数据结合实例 5 中的数据表明,一子孢子制剂的感染性和这些子孢子所引起的保护功效之间存在直接联系。事实上,目前仍不清楚用多低剂量的经辐照人工解剖分离子孢子可使受体获得免疫并仍获得 90% 至 100% 的保护功效。这些数据表明,不论是通过 IV、ID、IM 还是 SQ 途径,小剂量经辐照子孢子都将产生保护功效。

[0114] 这些数据还支持下述假设:与伯氏疟原虫 -A/J 小鼠模型系统比较,约氏疟原虫 -BLAB/c 模型系统可更接近地预测恶性疟原虫在人体中会发生的情况,部分原因是约氏疟原虫系统中的子孢子具有更高的感染性。通过 1000 只经辐照且由恶性疟原虫感染的蚊子叮咬,人类可获得完全免疫 [34]。据认为,喂养蚊子时,一只蚊子至多接种 10 个子孢子 [51]。如果情况确是如此,那么,仅大约接种 10,000 个子孢子即可使人类完全免疫并受到完全保护 [50]。相反,在伯氏疟原虫 -A/J 小鼠模型系统中,通过静脉注射,用多于 100,000 个自人工解剖唾液腺分离的子孢子才可获得保护,并且该免疫接种剂量方案在通过皮下施用不能提供保护 [21]。实例 6 中显示,将 7500 个通过人工解剖唾液腺所分离的约氏疟原虫子孢子施用至小鼠,可提供 100% 保护。事实是,用减毒约氏疟原虫子孢子免疫的小鼠和用减毒恶性疟原虫子孢子免疫的人类,在暴露于相似数量的减毒子孢子下后,可获得保护,而用伯氏疟原虫子孢子免疫的 A/J 小鼠用超过 10 倍数量的子孢子才获得免疫,这一事实支持了我们的假设,即与伯氏疟原虫 -A/J 模型系统比较,约氏疟原虫 -BLAB/c 模型系统更能预测在人体中会发生的情况。

[0115] 结论

[0116] 已证实,开发一种可抵抗诸如恶性疟原虫等感染的有效且持久疫苗的进程,比预期更加缓慢、更加困难和复杂。目前没有批准疟疾疫苗,但现已知,通过 1000 多只经感染蚊子叮咬用经辐照减毒恶性疟原虫子孢子来免疫接种,可在至少 10.5 个月时间内在 90% 以上的免疫接种个体中提供无菌保护性免疫,抵抗来自全世界多种恶性疟原虫分离菌。将这一免疫疗法变为人类疫苗的主要障碍之一是,不可能通过经感染蚊子叮咬向大量个体提供一可调型疫苗。另外,许多科学家的工作表明,极好的保护仅能通过静脉施用减毒子孢子在小鼠模型系统中达成,而这种施用方法通常不用于接种疫苗,因为该方法在技术上困难且

与标准施用方法相比潜在地更加危险。因为如皮下和肌内接种等常用于人类免疫接种的施用方法在该小鼠模型系统中不能产生足够的保护性免疫,因此之前人们认为不可能开发一人类减毒孢子疫苗。利用一不同于先前研究者使用的模型系统,我们已发现一种施用孢子的方法,其可导致高水平保护,并且可行、安全且可接受。该发现可有助于利用该施用减毒孢子的方法开发并提供一可行且可大量施用的减毒孢子疟疾疫苗。

[0117] 下述出版物和在那些本申请案中其它处所提及的出版物特此明确地以引用方式并入本文中。

[0118] 1. Breman JG. Ears of the hippopotamus :manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden, *Am J Trop Med Hyg* 2001 ;64 :1-11.

[0119] 2. Gallup JL, Sachs JD. The economic burden of malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001 ;64 :85-96,

[0120] 3. World Tourism Organization. International tourist arrivals by (sub) region. June 2002 ;[http://www.world-tourism.org/market\\_research/facts&figures/latestdata/tita0107-02.pdf](http://www.world-tourism.org/market_research/facts&figures/latestdata/tita0107-02.pdf).

[0121] 4. Beadle, C. and Hoffman, S. L. History of malaria in the United States Naval Forces at war :World War I through the Vietnam conflict. *Clin. Infect. Dis.* 16 : 30-329, 1993.

[0122] 5. Richie TL, Saul A. Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature* 415 (6872) :694-701, 2000.

[0123] 6. Long CA, Hoffman SL. Parasitology :Malaria—from infants to genomics to vaccines. *Science* 297 :345-7, 2002.

[0124] 7. Stoute JA, Kester KE, Krzych U, Welde BT, Hall T, White K, Glenn G, Ockenhouse CF, Garçon N, Schwenk R, Lanar DE, Sun P, Momin P, Wirtz RA, Golenda C, Slaoui M, Wortmann G, Holland C, Dowler M, Cohen J, Ballou WR. Long-term efficacy and immuneresponses following immunization with the RTS,S malaria vaccine. *J Infect Dis* 178 :1139-44, 1998.

[0125] 8. Kester KE, McKinney DA, Tornieporth N, Ockenhouse CF, Heppner DG, Hall T, Krzych U, Delchambre M, Voss G, Dowler MG, Palensky J, Wittes J, Cohen J, Ballou WR. Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 183 :640-7, 2001.

[0126] 9. Bojang KA, Milligan PJ, Pinder M, Vigneron L, Allouche A, Kester KE, Ballou WR, Conway DJ, Reece WH. Efficacy of RTS, S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia :a randomised trial. *Lancet*. 2001 Dec 8 ;358 (9297) :1927-34.

[0127] 10. Dame JB, Williams JL, McCutchan TF, Weber JL, Wirtz RA, Hockmeyer WT, Maloy WL, Haynes JD, Schneider I, Roberts D, Sanders GS, Reddy EP, Diggs CL, Miller LH. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 225 : 593-9, 1984.

- [0128] 11. Nussenzweig RS, Vanderberg J, Most H, Orton C. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature* 216 :160-2, 1967.
- [0129] 12. Clyde DF, Most H, McCarthy VC, Vanderberg JP. Immunization of man against sporozoite-induced falciparum malaria. *Am J Med Sci* 266 :169-77, 1973.
- [0130] 13. Clyde DF, McCarthy VC, Miller R M, Homick RB. Specificity of protection of man immunized against sporozoite-induced falciparum malaria. *Am J Med Sci* 266 : 398-401, 1973.
- [0131] 14. Rieckmann KH, Carson PE, Beaudoin RL, Cassells JS, Sell KW. Sporozoite induced immunity in man against an Ethiopian strain of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 68 :258-9, 1974.
- [0132] 15. Clyde DF, McCarthy VC, Miller RM, Woodward WE. Immunization of man against falciparum and vivax malaria by use of attenuated sporozoites. *Am J Trop Med Hyg* 24 :397-401, 1975.
- [0133] 16. McCarthy VC, Clyde DF. *Plasmodium vivax*: correlation of circumsporozoite precipitation (CSP) reaction with sporozoite-induced protective immunity in man. *Exp Parasitol* 41 :167-71, 1977.
- [0134] 17. Rieckmann KH, Beaudoin RL, Cassells JS, Sell DW. Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against falciparum malaria. *Bull World Health Organ* 57 :261-5, 1979.
- [0135] 18. Clyde DF. Immunity to falciparum and vivax malaria induced by irradiated sporozoites: a review of the University of Maryland studies, 1971-75. *Bull World Health Organ* 68 :9-12, 1990.
- [0136] 19. Rieckmann KH. Human immunization with attenuated sporozoites. *Bull World Health Organ* 68 :13-6, 1990.
- [0137] 20. Spitalny GL, Nussenzweig RS. Effect of various routes of immunization and methods of parasite attenuation on the development of protection against sporozoite-induced rodent malaria. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*. 39 (Special Issue) :506-514, 1972.
- [0138] 21. Kramer LD, Vanderberg JP. Intramuscular immunization of mice with irradiated *Plasmodium berghei* sporozoites: Enhancement of protection with albumin. *Am J Trop Med Hyg*. 24(6) :913-916, 1975.
- [0139] 22. Nussenzweig R. Use of radiation-attenuated sporozoites in the immunoprophylaxis of malaria. *International Journal of Nuclear Medicine and Biology* 7 :89-96, 1980.
- [0140] 23. Trager W, Jensen JB. Culture of human malaria parasites *Plasmodium falciparum*. *Science* 193(4254) :673-5, 1976.
- [0141] 24. Haynes JD, Diggs CL, Hines FA, Desjardins RE. Human malaria parasites in continuous culture. *Nature* 263(5580) :767-9, 1976.

- [0142] 25. Campbell CC, Collins WE, Nguyen-Dinh P, Barber A, Broderson JR. Plasmodium falciparum gametocytes from culture in vitro develop to sporozoites that are infectious to primates. *Science* 217(4564) :1048-50, 1982.
- [0143] 26. Chulay JD, Schneider I, Cosgriff TM, Hoffman SL, Ballou WR, Ouakry IA, Carter R, Trosper JH, Hockmeyer WT. Malaria transmitted to humans by mosquitoes infected from cultured Plasmodium falciparum. *Am J Trop Med Hyg.* 1986 Jan ;35(1) : 66-8.
- [0144] 27. Yoshida N, Nussenzweig RS, Potocnjak P, Nussenzweig V, Aikawa M. Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria Parasite. *Science* 207(4426) :71-3, 1980
- [0145] 28. Hilleman MR. Yeast recombinant hepatitis B vaccine. *Infection* 15(1) : 3-7, 1987.
- [0146] 29. Ballou WR, Hoffman SL, Sherwood JA, Hollingdale MR, Neva FA, Hockmeyer WT, Gordon DM. Safety and efficacy of a recombinant DNA Plasmodium falciparum sporozoite vaccine. *Lancet* 1(8545) :1277-81, 1987.
- [0147] 30. Herrington DA, Clyde DF, Losonsky G, Cortesia M, Murphy JR, Davis J, Bager S, Felix AM. Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against Plasmodium falciparum sporozoites. *Nature* 328(6127) : 257-9, 1987.
- [0148] 31. Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Rationale for the development of an engineered sporozoite malaria vaccine. *Adv Immunol* 45 :283-334, 1989.
- [0149] 32. Hoffman SL, Franke ED, Hollingdale MR, Druilhe P. Attacking the infected hepatocyte. In : Hoffman SL, ed. *Malaria Vaccine Development: A Multi-Immune Response Approach*. Washington, D. C. :ASM Press, pp. 35-75, 1996.
- [0150] 33. Hoffman SL, Miller LH. Perspectives on malaria vaccine development. In : Hoffman SL, ed. *Malaria Vaccine Development: a Multi-Immune Response Approach*. Washington, D. C. :ASM Press, pp. 1-13, 1996.
- [0151] 34. Hoffman SL, Goh LM, Luke TC, Schneider I, Le TP, Doolan DL, Sacci J, de la Vega P, Dowler M, Paul C, Gordon DM, Stoute JA, Church LW, Sedegah M, Heppner DG, Ballou WR, Richie TL. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated Plasmodium falciparum sporozoites. *J Infect Dis* 185 : 1155-64, 2002.
- [0152] 35. Egan JE, Hoffman SL, Haynes JD, Sadoff JC, Schneider I, Grau GE, Hollingdale MR, Ballou WR, Gordon DM. Humoral immune responses in volunteers immunized with irradiated Plasmodium falciparum sporozoites. *Am J Trop Med Hyg* 49 : 166-73, 1993.
- [0153] 36. Malik A, Egan JE, Houghten RA, Sadoff JC, Hoffman SL. Human cytotoxic T lymphocytes against the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 :3300-4, 1991.

- [0154] 37. Wize B, Houghten RA, Parker K, Coligan JE, Church P, Gordon DM, Ballou WR, Hoffman SL. Irradiated sporozoite vaccine induces HLA-B8-restricted cytotoxic T lymphocyte responses against two overlapping epitopes of the Plasmodium falciparum surface sporozoite protein 2. *J Exp Med* 182:1435-45, 1995.
- [0155] 38. Wize B, Houghten R, Church P, Tine JA, Lanar DE, Gordon DM, Ballou WR, Sette A, Hoffman SL. HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple Plasmodium falciparum sporozoite surface protein 2 epitopes in sporozoite-immunized volunteers. *J Immunol* 155:766-75, 1995.
- [0156] 39. Krzych U, Lyon JA, Jareed T, Schneider I, Hollingdale MR, Gordon DM, Ballou WR. T lymphocytes from volunteers immunized with Irradiated Plasmodium falciparum sporozoites recognize liver and blood stage malaria antigens. *J Immunol* 155:4072-7, 1995.
- [0157] 40. Doolan DL, Hoffman SL, Southwood S, Wentworth PA, Sidney J, Chestnut RW, Keogh E, Appella E, Nutman TB, Lal AA, Gordon DM, Oloo A, Sette A. Degenerate cytotoxic T cell epitopes from P. falciparum restricted by HLA-A and HLA-B supertypes alleles. *Immunology* 7:97-112, 1997,
- [0158] 41. Doolan DL, Southwood S, Chesnut R, Appella E, Gomez E, Richards A, Higashimoto YI, Maewal A, Sidney J, Gramzinski RA, Mason C, Koech D, Hoffman SL, Sette A. HLA-DR-promiscuous T cell epitopes from Plasmodium falciparum pre-erythrocytic-stage antigens restricted by multiple HLA class II alleles. *J Immunol* 165:1123-37, 2000.
- [0159] 42. Herrington D, Davis J, Nardin E, Beier M, Cortese J, Eddy H, Losonsky G, Hollingdale M, Sztein M, Levine M, Nussenzweig RS, Clyde D, Edelman R. Successful immunization of humans with Irradiated sporozoites; humoral and cellular responses of the protected individuals. *Am J Trop Med Hyg* 45:539-47, 1991.
- [0160] 43. Edelman R, Hoffman SL, Davis JR, Beier M, Sztein MB, Losonsky G, Herrington DA, Eddy HA, Hollingdale MR, Gordon DM, Clyde DF. Long-term persistence of sterile immunity in a volunteer immunized with X-Irradiated Plasmodium falciparum sporozoites. *J Infect Dis* 168:1066-70, 1993.
- [0161] 44. Nardin EH, Herrington DA, Davis J, Levine M, Stuber D, Takacs B, Caspers P, Barr P, Altszuler R, Clavijo P, Nussenzweig RS. Conserved repetitive epitope recognized by CD4+ clones from a malaria-immunized volunteer. *Science* 246:1603-6, 1989.
- [0162] 45. Nardin EH. T cell responses in a sporozoite-immunized human volunteer and chimpanzee. *Immunol Lett* 25:43-8, 1990.
- [0163] 46. Nardin EH, Nussenzweig RS, Altszuler R, Herrington D, Levine M, Murphy J, Davis J, Bathurst I, Barr P, Romero P, Zavala F. Cellular and humoral immune responses to recombinant P. falciparum CS protein in sporozoite-immunized

rodents and human volunteers. Bull World Health Organ 68 :85-7, 1990.

[0164] 47. Moreno A, Clavijo P, Edelman R, Davis J, Sztein M, Herrington D, Nardin E. Cytotoxic CD4+T cells from a sporozoite-immunized volunteer recognize the Plasmodium falciparum CS protein. Int Immunol 13 :997-1003, 1991.

[0165] 48. Moreno A, Clavijo P, Edelman R, Davis J, Sztein M, Sinigaglia F, Nardin E. CD4+T cell clones obtained from Plasmodium falciparum sporozoite-immunized volunteers recognize polymorphic sequences of the circumsporozoite protein. J Immunol 151 :489-99, 1993.

[0166] 49. Butler D. Mosquito production mooted as fast track to malaria vaccine. Nature 435 :437, 2003.

[0167] 50. Luke TC, Hoffman SL. Rationale and Plans for Developing a Non-Replicating, Metabolically Active Radiation Attenuated Plasmodium falciparum Sporozoite Vaccine. Journal of Experimental Biology 206 :3803-3808, 2003.

[0168] 51. Beier, JC., et al. Quantitation of Plasmodium falciparum sporozoites transmitted in vitro by experimentally infected Anopheles gambiae and Anopheles stephensi. Am J Trop Med Hyg 44(5) :564-70, 1991.

[0169] Other embodiments of the invention will be apparent to those skilled in the art from consideration of the specification and practice of the invention disclosed herein. It is intended that the specification and examples be considered as exemplary only, with a true scope and spirit of the invention being indicated by the following claims.

[0170] 所属领域的技术人员通过研究本文所揭示的本发明说明书和实践可明了本发明的其它具体实施例。该说明书及该等实例仅意欲视为具例示性，本发明的实际范围及精神由随附权利要求书指明。

专利名称(译)	疟疾预防方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1934448B</a>	公开(公告)日	2012-01-11
申请号	CN200380107599.9	申请日	2003-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	萨那里亚有限公司		
申请(专利权)人(译)	萨那里亚有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	萨那里亚有限公司		
[标]发明人	斯蒂芬L霍夫曼 托马斯C卢克		
发明人	斯蒂芬· L· 霍夫曼 托马斯· C· 卢克		
IPC分类号	A61K39/00 A61K39/002 A61K39/015 G01N33/536 A61K		
CPC分类号	A61K39/015 A61K2039/515 Y02A50/412		
审查员(译)	王晓媛		
优先权	60/427911 2002-11-20 US		
其他公开文献	CN1934448A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明包括一种用于保护患者抵抗疟疾的新颖方法。本发明的方法涉及用减毒孢子接种，特别是(但不限于)皮下、肌内、皮内、粘膜、粘膜下层和经皮肤施用。

...  
American journal of Tropical Medicine  
Hygiene 24 6 Pt 1. 1975, 24(6 Pt 1), 摘  
第 913 页左栏第 1-5 行、右栏第 5-32 行，第  
页表 1 及附注。

审查员 王晓媛