

疟疾疫苗现场试验研究进展

曹俊 综述, 高琪 审校

【提要】 安全有效的疟疾疫苗可能是预防、控制疟疾的有效途径。然而, 迄今为止, 仍无一个安全有效的疟疾疫苗应用于现场。疟疾疫苗主要分为红前期疫苗、红内期疫苗及传播阻断疫苗, 本文对这 3 类疫苗临床试验的进展进行综述。

【关键词】 疟疾; 疫苗; 现场试验

中图分类号: R531.3

文献标识码: A

Field Trial of Malaria Vaccine

CAO Jun, GAO Qi

(*Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064, China*)

【Abstract】 Vaccine is expected to be a promising tool for malaria prevention and control. However, safe and effective malaria vaccine is not yet available for field use so far. They can be pre-erythrocytic stage vaccine, blood stage vaccine and transmission-blocking vaccine. This review summarizes the progress of the vaccine development in the recent field trials.

【Key words】 Malaria; Vaccine; Field Trial

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30700695)

疟疾是世界上最严重的感染性疾病之一, 目前有超过 41% 的人口生活在疟疾疫区, 20 多亿人面临被感染的威胁。每年有 3~6 亿人感染, 其中 200~300 万人被夺走了生命^[1,2]。从 20 世纪 70 年代开始, 全球疟疾年死亡人数呈直线上升趋势^[3]。

20 世纪 50 年代, WHO 开展的以杀虫剂防制媒介和抗疟药治疗患者为主的全球抗疟方案曾一度明显地减少了疟疾的传播。但是, 媒介按蚊对杀虫剂、疟原虫对氯喹等抗疟药都产生了抗性, 因而使这些疟防措施面临严重的挑战。研制安全有效的疟疾疫苗成为控制和消灭疟疾的可靠途径和迫切需要。

生活在疟疾流行区的人群可以通过反复感染而建立带虫免疫, 控制原虫血症在低度水平而不表现出临床症状。研究表明, 这些免疫者产生的抗体可有效抑制疟原虫的增殖, 从其血清中提取超免疫 IgG 过继给恶性疟感染者, 也可清除感染者体内的外周原虫^[4]。用放射性照射处理的疟原虫子孢子接种人体, 可以产生令人满意的保护率^[5]。这些都为研制疟疾疫苗的可行性提供了依据。

早在 20 世纪 80 年代中期, 科学家就预言将在十

年内发明出有效预防恶性疟的疫苗。20 多年来, 虽然不断有各种疟疾疫苗进入临床试验, 但至今尚无一个安全有效的疫苗应用于现场^[6]。究竟还需要多久, 疟疾疫苗才能问世, 这是广大疟疾防治和科研人员所密切关注的问题。本文就目前疟疾疫苗临床试验的进展进行综述。

1 红前期疫苗

红前期疟疾疫苗又称抗感染疫苗, 主要针对疟原虫子孢子或肝内期疟原虫。疟原虫子孢子入侵肝细胞及进一步的发育增殖虽不引起临床症状, 但可产生大量的裂殖子并释放到血液中从而引起各种临床症状。红前期疫苗通过诱导机体产生特异性抗体来阻止孢子入侵肝细胞, 或诱导机体产生特异性识别感染肝细胞的 T 细胞, 来杀死感染肝细胞或干扰疟原虫在肝细胞内的发育增殖, 阻止其释放出感染性裂殖子, 从而达到抗感染的效果。红前期疟疾疫苗的临床试验一般在非流行区用感染后按蚊叮咬志愿者进行, 或初步证实效果后在流行区进行现场试验。

实验证明, 用放射线照射处理后的恶性疟孢子接种志愿者, 能产生有效且持久的保护性免疫^[5], 但由于这种减毒孢子疫苗的生产工艺和保存方法都存在局限性, 使其应用受到很大限制^[7]。

目前研究较为深入的红前期疫苗是葛兰素史克公

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30700695)

作者单位: 江苏省寄生虫病防治研究所, 卫生部寄生虫病预防与控制技术重点实验室, 江苏省寄生虫分子生物学重点实验室, 江苏省寄生虫病学重点学科, 无锡 214064

司(GSK)开发的 AS02 为佐剂的 RTS,S 疫苗。它以环孢子蛋白 (circumsporozoite protein, CSP) 为靶抗原, 并带有乙肝表面抗原成分, 以此作为免疫原性颗粒。孢子攻击实验证实, 该疫苗免疫后的志愿者中, 有 41% 能获得完全保护, 随后在冈比亚进行的现场实验证实, 该疫苗对成人的保护率为 34%, 在莫桑比克的研究证明该疫苗对儿童的保护率为 30%^[8], 且有效期长达 18 个月^[9]。该疫苗的作用机制主要为诱导机体产生抗孢子抗体, 但也可能包含针对感染肝细胞的 T 细胞免疫。

在红前期疟疾疫苗的研制中, 为激活 T 细胞免疫, 常采用一些 T 细胞诱导疫苗载体进行免疫。如应用禽痘 FP9 株进行初次免疫, 再用重组修饰的安卡拉痘病毒 (modified Vaccinia virus Ankara, MVA) 进行加强免疫^[10]。这种用异源病毒载体进行免疫的优点是, 可让机体产生的免疫反应更多地针对插入的目的片段而不是病毒载体。目前采用这种免疫方式的有以血小板凝集素相关黏附蛋白 (thrombospondin-related adhesive protein, TRAP) 为靶抗原的红前期疫苗, 它还同时融合一串肝内期 T 细胞表位 (多表位 TRAP 或 ME-TRAP) 来加强 T 细胞免疫。

在英国, 研究者发现 DNA-MVA 疫苗具有明显的 T 细胞反应和抗感染保护率 (肝细胞感染率降低 82%), 随后的 FP9-MVA 显示出更高的保护率 (肝细胞感染率降低 92%)^[11]。而且发现 FP9-MVA 产生的保护率和 T 细胞免疫有关^[12]。然而, 在肯尼亚的现场试验中, 这种免疫方式却因为较低的免疫原性而不能达到有效的保护率^[13], 这可能与该地区的疟疾高度流行有关。

为扩大免疫反应, 研究者试图用病毒载体同时表达多个抗原^[14]。红前期疟疾疫苗的保护率往往依赖于 CD8⁺ (而不是 CD4⁺) T 细胞反应, 这可通过新一代的腺病毒载体得以实现。美国海军科研人员用腺病毒载体表达的 CSP 和裂殖子顶端膜抗原 1 (apical membrane antigen 1, AMA1), 进行了 I 期和 II a 期临床试验^[15]。Crucell 等^[16]采用在人群中的自然感染非常罕见的腺病毒载体 Ad35 来表达 CSP, 牛津大学还用来自非人灵长类动物的腺病毒猿猴腺病毒作为载体, 从而避免人体抗腺病毒抗体对载体的损害。此外, 以 CSP 作为靶抗原的间日疟疫苗也进行了 I 期临床试验^[17]。

2 红内期疫苗

红内期疟疾疫苗又称抗病疫苗, 主要针对引起临床症状的红内期疟原虫或受感染红细胞。该类型疫苗

的主要目的是减轻感染, 从而减轻临床症状, 尤其是解救危重病人。其机制一般是阻断裂殖体入侵红细胞或避免感染红细胞黏附于血管内皮细胞。此类疫苗的有效性实验一般在流行区进行。

进行临床试验的红内期疫苗有 ISA720, 它包含裂殖子表面蛋白 1 (merozoite surface protein 1, MSP1)、裂殖子表面蛋白 2 (MSP2) 和环状体感染红细胞表面抗原 (ring-infected erythrocyte surface antigen, RESA) 等 3 个抗原, 巴布亚新几内亚的 II b 期临床试验证实, 在 5~9 岁的儿童中减虫率为 62%, 但不能降低发病率^[18]。

另一个进入临床试验的红内期疫苗 AS02A 以 MSP1 一个 Mr 42 000 的片段为靶抗原, 在肯尼亚和马里进行了 I 期和 II 期临床试验^[19], 但未报道有明确的抗虫效果。在其他临床试验中, 一些研究者用腺病毒载体表达 AMA1 和不同的佐剂组合 (表 1), 也有人用病毒核蛋白颗粒表达 AMA1 的第三区域环化肽, 并在英国进行了 II a 期临床试验。最近, 瑞士热带医学研究所对用流感病毒颗粒同时重组表达 AMA1 和 CSP 的多期疟疾疫苗进行了 I a 期临床试验, 显示了较好的安全性和耐受性^[20]。我国研究者也对 MSP1-19 和 AMA-1 的组合疫苗 PfCP-2.9/ISA720 进行了 I 期临床试验, 结果证实该疫苗具有较好的安全性、耐受性和免疫原性^[21]。另外, 同时含有 MSP3 的 B 细胞和 T 细胞表位的合成多肽疫苗在布基纳法索进行了临床试验, 结果显示该疫苗能产生较为长效的抗体, 且具有一定体外抑虫效果^[22]。

在以避免感染红细胞黏附于血管内皮细胞为目的的抗病疫苗研制中, 以恶性疟原虫红细胞膜蛋白 1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1, PEEMP1) 为靶抗原的疫苗, 虽然已证实其自然免疫获得的抗体具有明显的效果^[23], 但由于该抗原蛋白高度变异使得研制非常困难。

3 传播阻断疫苗

传播阻断疫苗诱导机体产生针对有性繁殖期疟原虫的抗体, 从而阻止原虫在蚊胃内的合子形成或进一步发育, 从而阻断疟疾的传播^[24,25]。其主要抗原原有表面抗原 Pfs25、Pfs28、Pfs48/45 和 Pfs230 等^[26,27]。这类疫苗虽然不能对接受免疫的个体起到保护作用, 但可以防止他们作为传染源造成进一步的传播和扩散。除了有个别间日疟传播阻断疫苗 (Pvs25H) 进行了 I 期临床试验外^[28], 尚未见其他传播阻断疟疾疫苗进行临床试验的报道。

表 1 进行临床试验的部分疟疾疫苗
Table 1 Malaria vaccine candidates under recent or current clinical trials

类型 Type	作用目标 Target	疫苗名称 Vaccine candidate	候选分子 Antigen	临床试验期 Phase	试验地点 Location	开发者 Developer
红前期疫苗 Pre-erythrocytic stage vaccine	子孢子 Sporozoite	RTS, S-AS01/AS02	CSP	I b/ II b	非洲 Africa	GSK ^[8,9]
	感染肝细胞 Infected hepatocyte	FP9/MVA, ME-TRAP	ME-TRAP	II b	肯尼亚 Kenya	University of Oxford ^[11,13]
	感染肝细胞 Infected hepatocyte	Simian adenovirus/MVA	ME-TRAP	I a/ I b	英国 UK	University of Oxford
	感染肝细胞 Infected hepatocyte	LSA-1-AS02	LSA-1	I a/ II a	美国 USA	WRAIR ^[33]
	感染肝细胞 Infected hepatocyte	AdHu35	CSP	I a	美国 USA	Crucell ^[16]
红内期疫苗 Blood stage vaccine	裂殖子 Merozoite	FMP1-AS02	MSP-142	I b/ II b	肯尼亚/马里 Kenya/Mali	WRAIR ^[34]
	裂殖子 Merozoite	AMA1-AS02	AMA1	I a/ II a	美国 USA	WRAIR ^[35]
	裂殖子 Merozoite	MSP142-Alum, bi-allelic	MSP-1	I a	美国 USA	NIH ^[36]
	裂殖子 Merozoite	AMA1-FVO	AMA1	I a	荷兰 Netherlands	BPRC
	裂殖子 Merozoite	GMZ2	GLURP/MSP-3	I a	德国 German	SSI ^[37]
	裂殖子 Merozoite	PfCP2.9	AMA1/MSP-119	I	中国 China	SMMU ^[21]
疫苗 Multi-stage vaccine	子孢子, 肝细胞, 裂殖子 Sporozoite, hepatocyte, merozoite	FP9/MVA polyprotein	6 个不同的候选分子 Six antigens	II a	英国 UK	University of Oxford ^[14]
	子孢子, 裂殖子 Sporozoite, merozoite	PEV3a	AMA1/CSP	II a	英国 UK	Pevion
	子孢子, 裂殖子 Sporozoite, merozoite	Adenovirus 5	AMA1/CSP	I / II a	美国 USA	US Navy

注: AdHu35: human adenovirus serotype 35, 人腺病毒血清型 35; AMA1: apical membrane antigen1, 顶端膜抗原 1; BPRC: Biomedical Primate Research Centre, 荷兰生物医学灵长类研究中心; CSP: circumsporozoite protein, 环孢子蛋白; FP: fowlpox, 禽痘; GLURP: glutamate-rich protein, 富谷氨酸蛋白; GSK: GlaxoSmithKline, 葛兰素史克公司; ME-TRAP: multi-epitope thrombospondin-related adhesive protein, 多表位血小板凝集素相关黏附蛋白; MSP: merozoite surface protein, 裂殖子表面蛋白; MVA: modified vaccinia virus Ankara, 重组修饰的安卡拉痘病毒; NIH: National Institutes for Health, 美国国立医学研究中心; SSI: Statens Serum Institute, 丹麦国立血清研究所; SMMU: Second Military Medical University, 第二军医大学; WRAIR: Walter Reed Army Institute of Research, 美国沃尔特里德陆军研究所。

4 结语及展望

疟原虫在人体内绝大部分时期都寄生在宿主细胞内, 而且在生活史的不同阶段表达不同的期特异性蛋白, 从而有效逃避机体的免疫反应。针对疟原虫不同阶段的疟疾疫苗也各有缺点: 红前期抗感染疫苗必须达到 100% 的保护率才能真正达到保护效果, 因为只要有单个孢子逃逸就可能引起机体的感染; 红内期疟疾疫苗的机制大多为阻断疟原虫对宿主红细胞的入侵, 但由于裂殖子从裂殖体中释放出来到入侵新的红细胞之前, 只有极短的时间(约 2 min)暴露于机体免疫系统, 且入侵过程中的各个步骤往往不是单一的方式, 阻断了其中的一个方式, 疟原虫还可利用其他替代途径进行入侵; 而传播阻断疫苗虽然能对社区人群达到保护效果, 但免疫者本身却不受益, 这种利他性可能会阻碍将来的现场应用。因此, 多期疟疾疫苗或许可以让不同的抗原扬长避短、互补, 从而达到更好的保护效果。

目前进行的疟疾疫苗临床实验中, 很少获得令人

满意的结果。部分原因是由于一些疫苗的免疫原性不够理想, 不能激发机体产生足够的免疫反应; 另一个重要原因是, 在体外实验或动物体内显示较好效果的疫苗候选分子, 在人体中未必奏效。因此, 必须对机体的免疫反应机制和疫苗候选分子功能进行进一步的深入研究, 才能为疟疾疫苗的研发提供理论基础, 从而更科学地决定在众多的疫苗候选分子中, 哪些应该优先进入目前规模有限且费用高昂的临床试验。

放射性照射处理的减毒活疫苗是目前效果最为满意的疟疾疫苗, 但生产和保存上的技术难度使其现场应用受到限制。最近的研究发现, 敲除疟原虫的某些基因 (UIS3、UIS4 或 P36p) 后, 子孢子不能在肝细胞内进一步发育, 但可刺激机体产生非常有效的保护性免疫^[29-32], 这为疟原虫疫苗的研制提供了新途径——转基因减毒疟疾疫苗。

参 考 文 献

[1] Snow RW, Guerra CA, Noor AM, *et al.* The global distribution

- of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria[J]. Nature, 2005, 434(7030): 214-217.
- [2] Guerra CA, Snow RW, Hay SI. Mapping the global extent of malaria in 2005[J]. Trends Parasitol, 2006, 22(8): 353-358.
- [3] WHO Expert Committee on Malaria. World Health Organ Tech Rep Ser, 2000, 892(i-v): 1-74.
- [4] Cohen S, Butcher GA. Properties of protective malarial antibody [J]. Nature, 1970, 225(5234): 732-734.
- [5] Hoffman SL, Goh LM, Luke TC, et al. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites[J]. J Infect Dis, 2002, 185(8): 1155-1164.
- [6] Waters A. Malaria: new vaccines for old[J]. Cell, 2006, 124(4): 689-693.
- [7] Ripley Ballou W. Obstacles to the development of a safe and effective attenuated pre-erythrocytic stage malaria vaccine[J]. Microbes Infect, 2007, 9(6): 761-766.
- [8] Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, et al. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children; randomised controlled trial[J]. Lancet, 2004, 364(9443): 1411-1420.
- [9] Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, et al. Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children; single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial[J]. Lancet, 2005, 366(9502): 2012-2018.
- [10] Hill AV. Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy [J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(1): 21-32.
- [11] Webster DP, Dunachie S, Vuola JM, et al. Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(13): 4836-4841.
- [12] Keating SM, Bejon P, Berthoud T, et al. Durable human memory T cells quantifiable by cultured enzyme-linked immunospot assays are induced by heterologous prime boost immunization and correlate with protection against malaria[J]. J Immunol, 2005, 175(9): 5675-5680.
- [13] Bejon P, Mwacharo J, Kai O, et al. A phase 2b randomised trial of the candidate malaria vaccines FP9 ME-TRAP and MVA ME-TRAP among children in Kenya[J]. PLoS Clin Trials, 2006, 1(6): e29.
- [14] Prieur E, Gilbert SC, Schneider J, et al. A *Plasmodium falciparum* candidate vaccine based on a six-antigen polyprotein encoded by recombinant poxviruses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(1): 290-295.
- [15] Li S, Locke E, Bruder J, et al. Viral vectors for malaria vaccine development[J]. Vaccine, 2007, 25(14): 2567-2574.
- [16] Stewart VA, McGrath SM, Dubois PM, et al. Priming with an adenovirus 35-circumsporozoite protein (CS) vaccine followed by RTS,S/AS01B boosting significantly improves immunogenicity to *Plasmodium falciparum* CS compared to that with either malaria vaccine alone[J]. Infect Immun, 2007, 75(5): 2283-2290.
- [17] Herrera S, Bonelo A, Perlaza BL, et al. Safety and elicitation of humoral and cellular responses in colombian malaria-naive volunteers by a *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein-derived synthetic vaccine[J]. Am J Trop Med Hyg, 2005, 73(5 Suppl): 3-9.
- [18] Genton B, Al-Yaman F, Betuela I, et al. Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine (MSP1, MSP2, RESA) against *Plasmodium falciparum* in Papua New Guinean children[J]. Vaccine, 2003, 22(1): 30-41.
- [19] Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, et al. Safety and allele-specific immunogenicity of a malaria vaccine in Malian adults; results of a phase I randomized trial[J]. PLoS Clin Trials, 2006, 1(7): e34.
- [20] Genton B, Pluschke G, Degen L, et al. A randomized placebo-controlled phase in malaria vaccine trial of two virosome-formulated synthetic peptides in healthy adult volunteers[J]. PLoS ONE, 2007, 2(10): e1018.
- [21] Hu J, Chen Z, Gu J, et al. Safety and immunogenicity of a malaria vaccine, *Plasmodium falciparum* AMA-1/MSP-1 chimeric protein formulated in montanide ISA 720 in healthy adults [J]. PLoS ONE, 2008, 3(4): e1952.
- [22] Sirima SB, Nebie I, Ouedraogo A, et al. Safety and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 long synthetic peptide (MSP3-LSP) malaria vaccine in healthy, semi-immune adult males in Burkina Faso, West Africa[J]. Vaccine, 2007, 25(14): 2723-2732.
- [23] Chen Q. The naturally acquired immunity in severe malaria and its implication for a PIEMP-1 based vaccine[J]. Microbes Infect, 2007, 9(6): 777-783.
- [24] Carter R. Transmission blocking malaria vaccines[J]. Vaccine, 2001, 19(17-19): 2309-2314.
- [25] Tsuboi T, Tachibana M, Kaneko O, et al. Transmission-blocking vaccine of vivax malaria[J]. Parasitol Int, 2003, 52(1): 1-11.
- [26] Pradel G. Proteins of the malaria parasite sexual stages: expression, function and potential for transmission blocking strategies [J]. Parasitology, 2007: 1-19.
- [27] Kristoff J. Malaria stage-specific vaccine candidates[J]. Curr Pharm Des, 2007, 13(19): 1989-1999.
- [28] Malkin EM, Durbin AP, Diemert DJ, et al. Phase 1 vaccine trial of Pvs25H; a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria[J]. Vaccine, 2005, 23(24): 3131-3138.
- [29] Mueller AK, Labaied M, Kappe SH, et al. Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine [J]. Nature, 2005, 433(7022): 164-167.
- [30] Mueller AK, Camargo N, Kaiser K, et al. *Plasmodium* liver stage developmental arrest by depletion of a protein at the parasite-host interface[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(8): 3022-3027.
- [31] Douradinha B, van Dijk MR, Ataide R, et al. Genetically attenuated P36p-deficient *Plasmodium berghei* sporozoites confer long-lasting and partial cross-species protection[J]. Int J Parasitol, 2007, 37(13): 1511-1519.
- [32] Van Dijk MR, Douradinha B, Franke-Fayard B, et al. Genetically attenuated, P36p-deficient malarial sporozoites induce protective immunity and apoptosis of infected liver cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(34): 12194-12199.
- [33] Brando C, Ware LA, Freyberger H, et al. Murine immune responses to liver-stage antigen 1 protein FMP011, a malaria vaccine candidate, delivered with adjuvant AS01B or AS02A [J]. Infect Immun, 2007, 75(2): 838-845.
- [34] Stoute JA, Gombe J, Withers MR, et al. Phase 1 randomized double-blind safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* malaria merozoite surface protein FMP1 vaccine, adjuvanted with AS02A, in adults in western Kenya[J]. Vaccine, 2007, 25(1): 176-184.
- [35] Polhemus ME, Magill AJ, Cummings JF, et al. Phase I dose escalation safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* apical membrane protein (AMA-1) FMP2.1, adjuvanted with AS02A, in malaria-naive adults at the Walter Reed Army Institute of Research[J]. Vaccine, 2007, 25(21): 4203-4212.
- [36] Malkin E, Long CA, Stowers AW, et al. Phase 1 study of two merozoite surface protein 1 (MSP1(42)) vaccines for *Plasmodium falciparum* malaria[J]. PLoS Clin Trials, 2007, 2(4): e12.
- [37] Theisen M, Soe S, Brunstedt K, et al. A *Plasmodium falciparum* GLURP-MSP3 chimeric protein; expression in *Lactococcus lactis*, immunogenicity and induction of biologically active antibodies[J]. Vaccine, 2004, 22(9-10): 1188-1198.