

# PfCP-2.9/PfCSP-2 疟疾联合疫苗免疫效果血清学评价研究

杨英超 王国柱 李喆 张金龙 辛晓芳\*

**【摘要】目的** 对 PfCP-2.9/PfCSP-2 疟疾联合疫苗所诱发的特异性 IgG 抗体进行分析评价。**方法** 将 5 只新西兰白兔分为两组, 其中免疫组 3 只, 非免疫组 2 只。免疫组接种 PfCP-2.9/PfCSP-2 疟疾联合疫苗, 非免疫组注射生理盐水。连续 3 次免疫后, 采集血液样本并经间接 ELISA 检测其 IgG 抗体水平。根据非免疫组兔的吸光度数值 (*A* 值) 计算临界值。临界值=2.1×非疫苗免疫组兔 *A* 值均值。若免疫组兔吸光度值高于临界值, 则被判定为疫苗可诱发特异性 IgG 抗体。**结果** 疫苗可诱发针对 PfCP-2.9 和 PfCSP-2 重组蛋白 IgG 抗体, 经 4 个稀释浓度 (1:100、1:200、1:400、1:800) 检测获得 2 只免疫组兔 *A* 值分别为 0.629/0.544、0.548/0.443、0.479/0.378、0.410/0.281, 均高于相应稀释浓度的临界值 (0.019、0.017、0.016、0.020); 疫苗可诱发针对 PfCSP 的特异性 IgG 抗体 (每孔包被 4 μg/ml 多肽), 经 4 个稀释浓度 (1:100、1:200、1:400、1:800) 检测 2 只免疫组家兔 *A* 值分别为 0.308/0.152、0.194/0.080、0.110/0.040、0.060/0.025, 均高于相应稀释浓度的临界值 (0.027、0.019、0.018、0.018); 疫苗可诱发针对 PfCSP 的特异性 IgG 抗体 (每孔包被 10 μg/ml 多肽), 经 4 个稀释浓度 (1:100、1:200、1:400、1:800) 检测获得 2 只免疫组家兔 *A* 值分别为 0.333/0.129、0.221/0.086、0.133/0.048、0.075/0.029, 均高于相应稀释浓度的临界值 (0.048、0.038、0.036、0.036); **结论** PfCP-2.9/PfCSP-2 疟疾联合疫苗可诱发高水平 IgG 抗体, 该疫苗是安全、有效且耐受性良好。

**【关键词】** 疟疾疫苗; 血清学; 间接 ELISA

## Serological evaluation on the immunization effect of PfCP-2.9/PfCSP-2 combination malaria vaccine

Yang Yingchao, Wang Guozhu, Li Zhe, Zhang Jinlong, Xin Xiaofang\*. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Supported by National High-tech R & D Program (863 Program) (2012AA02A402)

\*Corresponding author: Xin Xiaofang, Email: xinxiaofang08@aliyun.com

**【Abstract】 Objective** To analyze and evaluate the specific IgG antibodies level induced by PfCP-2.9/PfCSP-2 combination malaria vaccine. **Methods** Five New Zealand white rabbits were divided into two groups, three in vaccine immunized group, and two in non-vaccine immunized group. Vaccine immunized group was inoculated PfCP-2.9/PfCSP-2 combination malaria vaccine, non-vaccine immunized group was injected with saline. After 3 consecutive immunizations, blood samples were collected and tested by indirect ELISA to detect IgG antibody. Cut-off values were calculated in accordance with the absorbance value (*A* value) obtained from non-vaccine immunized rabbits. Cut-off value=2.1× average *A* value of two non-vaccine immunized rabbits. If absorbance values acquired from immunized rabbit were higher than the cut-off value, it was judged that the vaccine can induce specific IgG antibodies. **Results** Vaccines can induce specific IgG antibody against PfCP-2.9 and PfCSP-2 recombinant protein, after 4 level of serum dilution (1:100, 1:200, 1:400, 1:800) detection, The *A* values from two vaccine immunized rabbits were 0.629/0.544, 0.548/0.443, 0.479/0.378, 0.410/0.281, higher than the cut-off value of the corresponding dilution (0.019, 0.017, 0.016, 0.020). Vaccine can induce specific IgG antibodies against PfCSP (per well coated 4 μg/ml polypeptide), after 4 levels of serum dilution (1:100, 1:200, 1:400, 1:800) detection, The *A* values from two vaccine immunized rabbits were 0.308/0.152, 0.194/0.080, 0.110/0.040, 0.060/0.025, higher than the cut-off value of corre-

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4122.2015.05.003

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (2012AA02A402)

作者单位: 100050 北京, 中国食品药品检定研究院

\* 通信作者: 辛晓芳, Email:xinxiaofang08@aliyun.com

sponding dilution (0.027, 0.019, 0.018, 0.018); vaccine can induce specific IgG antibody against PfCSP(per well coated with 10 ug/ml polypeptide), after 4 level of serum dilution(1:100, 1:200, 1:400, 1:800) detection, A values from two vaccine immunized rabbits were 0.333/0.129, 0.221/0.086, 0.133/0.048,0.075/0.029, higher than the cut-off value of corresponding dilution (0.048, 0.038, 0.036, 0.036). **Conclusion** PfCP-2.9/PfCSP-2 malaria vaccine can induce high level of IgG antibody. It is a safe, effective and well-tolerated vaccine.

**【Key words】** Malaria vaccine; Serology; Indirect ELISA

根据世界卫生组织2014年疟疾报告, 预计全球有33亿人具有感染疟疾的风险, 其中12亿人是疟疾感染的高危人群(即每年感染疟疾的几率大于1/1 000)。据最新估算, 2013年全球估计有近1.98亿疟疾感染病例和58.4万疟疾死亡病例。90%的疟疾死亡病例发生在非洲地区, 78%的疟疾死亡病例是5岁以下儿童。该报告同时指出, 疟疾防控导致疟疾感染病例及死亡病例大幅减少, 2000—2013年疟疾死亡率降低了47%, 在非洲地区疟疾死亡率降低了54%, 但现有疟疾防控措施的可及性及疟疾耐药株的出现均导致防控形势依然严峻<sup>[1]</sup>。为了更好地防控疟疾, 研制出安全、有效的可预防或阻断疟疾感染的疫苗非常重要。

由上海第二军医大学研发的PfCP-2.9/PfCSP-2重组疟疾联合疫苗是由PfCP-2.9和PfCSP-2重组蛋白并添加铝佐剂和吡喃葡萄糖酰脂质A (glucopyranosyl lipid A, GLA) 配置而成。PfCP-2.9是由恶性疟原虫裂殖子表面蛋白1 (merozoite surface protein 1, MSP1) 和裂殖子顶端膜抗原1 (apical membrane antigen 1, AMA1) 的C-末端区域通过连接序列P28融合而成, 并在毕赤酵母中分泌表达。根据已发表的关于PfCP-2.9文献可知, 其可在免疫动物后诱发高滴度的抗体并可抑制疟原虫侵入红细胞<sup>[2-3]</sup>。添加montanide ISA720佐剂的PfCP-2.9疫苗在I期临床试验<sup>[4]</sup>已经证明具有良好的耐受性、免疫原性及安全性。为了进一步提高疫苗阻断疟疾感染, 在PfCP-2.9中同时加入了由酵母表达的PfCSP-2重组抗原, 并将佐剂更换为铝佐剂和GLA, 观察此联合抗原疫苗免疫家兔后所诱发的抗体情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 PfCP-2.9/PfCSP-2重组疟疾联合疫苗

由浙江海正药业有限公司提供(批号20130204)。

### 1.2 家兔

清洁级新西兰白兔, 约3月龄, 体重2.5~3.5 kg,

由中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所提供, 合格证号: scxk(京)2009-0017。

### 1.3 主要试剂和仪器

PfCSP多肽(由7个连续重复的NANP组成)由上海波泰生物科技有限公司合成; Molevular Devices公司的Spectra Max 384 Plus酶标仪; Thermo公司的Wellwash Versa洗板机; 北京成文免疫化学研究室提供的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG作为二抗; Nunc公司96孔酶标板 (LOT 1029133); Sigma公司牛血清白蛋白 (Lot#051M1873V); MP Biomedicals公司吐温80 (Lot NO.5759J); Amresco公司TMB显色液 (Lot#1291C115)。

### 1.4 动物免疫

将5只新西兰白兔分为疫苗免疫组和非疫苗免疫组。疫苗免疫组为3只家兔, 非疫苗免疫组为2只家兔。将铝佐剂、GLA、PfCP-2.9和PfCSP-2抗原于4℃条件下用混匀器混匀, 随后皮下注射疫苗免疫组家兔。每只家兔每次免疫的疫苗中含有铝3 mg、5 μg GLA、100 μg PfCP-2.9、100 μg PfCSP-2。非免疫组家兔皮下注射生理盐水。每只家兔免疫剂量为1 ml, 背部及双后肢皮下注射。每次免疫间隔3周, 共计免疫3次, 每次免疫后第14天取血检测特异性抗体水平。最后一次免疫后第14天局部麻醉后颈动脉取血处死。

### 1.5 ELISA间接法检测IgG抗体水平

分别取-80℃保存的PfCP-2.9/PfCSP-2重组蛋白和合成的PfCSP多肽融解混匀后包被96孔板。酶标板每孔包被重组蛋白的浓度为1 μg/ml, 包被合成PfCSP多肽的浓度为4 μg/ml和10 μg/ml。

酶标板每孔中加入100 μl相应浓度的重组蛋白或合成多肽后, 4℃放置过夜。随后洗板3次并拍干。每孔加入200 μl封闭液, 室温反应1.5 h。取血样加入稀释溶液并振荡混匀, 每孔加入100 μl稀释的血样, 每个样品做3个复孔。室温反应1.5 h, 洗

板后拍干。随后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗，室温反应 1.5 h，洗板后拍干。随后加入显色液显色，室温孵育 10~20 min 后，加入终止液，随后酶标仪读取数据（双波段：波长 405 nm、630 nm），记录吸光度（A）值。试验重复 3 次，取 3 次试验的平均值进行分析。

### 1.6 统计学分析

临界值计算公式为：临界值（cut off 值）=2.1×非疫苗免疫组家兔 A 值均值。

若疫苗免疫组家兔 A 值高于临界值，则认为疫苗诱发了特异性的 IgG 抗体。

## 2 结果

### 2.1 血样中 PfCP-2.9/PfCSP-2 重组蛋白诱发的 IgG 抗体水平

酶标板每孔包被重组蛋白的浓度为 1 μg/ml，其它步骤详见 1.5。相比非免疫组家兔，免疫组 2 只家兔均具有较高的 A 值，且随着血样稀释比例的逐渐增加 A 值逐步降低，不同稀释比例血样所获得的 A 值均高于相应稀释比例的临界值；非免疫组家兔血样具有接近于 0 的 A 值，且随着稀释比例的增加却无显著变化（表 1）。因而免疫接种 PfCP-2.9/PfCSP-2 疟疾联合疫苗可诱发家兔产生高水平的针对 PfCP-2.9/PfCSP-2 重组蛋白的特异性 IgG 抗体。

表 1 PfCP-2.9/PfCSP-2 重组蛋白诱发的 IgG 抗体 A 值

Table 1 A value of IgG antibody induced by PfCP2.9/PfCSP-2 recombinant protein

家兔编号 Rabbits ID	1:100	1:200	1:400	1:800
P1	0.629	0.548	0.479	0.410
P2	0.544	0.443	0.378	0.281
N1	0.010	0.008	0.008	0.011
N2	0.008	0.008	0.007	0.008
临界值 Cut off value	0.019	0.017	0.016	0.020

P1 和 P2 为免疫组家兔，N1 和 N2 为非免疫组家兔  
P1 and P2 were vaccine immunized rabbits, N1 and N2 non-vaccine were non-vaccine immunized rabbits

### 2.2 血样中 PfCSP-2 重组蛋白诱发的 IgG 抗体水平

#### 2.2.1 PfCSP-2 重组蛋白诱发的 IgG 抗体水平

酶标板每孔包被的多肽浓度为 4 μg/ml，其它步骤详见 1.5。相比非免疫组家兔，免疫组家兔具有相对较高的 A 值，且随着血样稀释比例的逐渐增加 A 值逐步降低，不同稀释比例血样所获得的 A 值

均高于相应稀释比例的临界值。非免疫组家兔血样的 A 值接近于 0，且随着稀释比例的增加无显著变化（表 2）。因而，免疫接种 PfCP-2.9/PfCSP-2 疟疾联合疫苗可诱发家兔产生针对 PfCSP-2 重组蛋白的特异性 IgG 抗体。

表 2 PfCSP-2 重组蛋白诱发的 IgG 抗体 A 值

Table 2 A value of IgG antibody induced by PfCSP-2 recombinant protein

家兔编号 Rabbits ID	1:100	1:200	1:400	1:800
P1	0.308	0.194	0.110	0.060
P2	0.152	0.080	0.040	0.025
N1	0.014	0.008	0.010	0.008
N2	0.012	0.010	0.007	0.009
临界值 Cut off value	0.027	0.019	0.018	0.018

P1 和 P2 为免疫组家兔，N1 和 N2 为非免疫组家兔  
P1 and P2 were vaccine immunized rabbits, N1 and N2 non-vaccine were non-vaccine immunized rabbits

#### 2.2.2 PfCSP-2 重组蛋白诱发的 IgG 抗体水平（添加牛血清白蛋白）

酶标板每孔包被的多肽浓度为 10 μg/ml，牛血清白蛋白浓度为 5 mg/ml<sup>[5]</sup>，其它与 2.2.1 一致。结果再次证明了免疫接种 PfCP-2.9/PfCSP-2 疟疾联合疫苗可诱发产生针对 PfCSP-2 多肽的 IgG 抗体（表 3）。虽然将每孔多肽的包被量提高到 10 μg/ml，且同时加入了浓度为 5 mg/ml 的牛血清白蛋白，但是未见免疫组 A 数值有明显升高。

表 3 PfCSP-2 重组蛋白诱发的 IgG 抗体 A 值

（添加牛血清白蛋白）

Table 3 A value of IgG antibody induced by PfCSP-2 recombinant protein (plus bovine serum albumin)

家兔编号 Rabbits ID	1:100	1:200	1:400	1:800
P1	0.333	0.221	0.133	0.075
P2	0.129	0.086	0.048	0.029
N1	0.023	0.019	0.017	0.017
N2	0.023	0.017	0.017	0.017
临界值 Cut off value	0.048	0.038	0.036	0.036

P1 和 P2 为免疫组家兔，N1 和 N2 为非免疫组家兔  
P1 and P2 were vaccine immunized rabbits, N1 and N2 non-vaccine were non-vaccine immunized rabbits

## 3 讨论

家兔在免疫接种 3 剂 PfCP-2.9/PfCSP-2 疟疾联合疫苗后，可诱发出针对 PfCP-2.9/PfCSP-2 重组蛋白

的特异性IgG抗体。新型疟疾疫苗被设计为PfCP-2.9和PfCSP-2联合疫苗,且两重组蛋白被混合在一起经冻干后制备成最终成品。因而,对于疫苗诱发的血清学方面的更合适评价应是同时检测两个重组蛋白所诱发的特异性IgG抗体。

相比酶标板直接包被蛋白,使用包含有B细胞表位的7个NANP连续重复序列<sup>[6]</sup>的多肽来检测疫苗诱发的针对恶性疟原虫孢子子的IgG抗体,由于孢子蛋白仅在疟原虫的孢子阶段大量表达,纯天然孢子抗原不容易获得,且多肽片段较小,因而导致IgG抗体检测无法获得非常理想的结果。虽然已经有多种评价孢子蛋白疫苗的免疫学方法<sup>[7]</sup>的报道,但由于方法较为复杂并没有被疟疾研究和评价专业实验室掌握,因而只能选取合成抗原多肽的方法。

根据文献报道,在溶解有合成多肽的溶液中加入牛血清白蛋白可提高免疫组家兔血样中抗体检出水平<sup>[5]</sup>,其原理可能是通过减少非特异性结合,本研究也进行了这方面的尝试。结果表明,加入牛血清白蛋白并未显著提高经酶标仪检测的IgG抗体吸光度数值。

本实验共计免疫了3只家兔,其中1只家兔在最后一次免疫后颈动脉取血时死亡,没有采集到血样。

虽然PfCP-2.9/PfCSP-2疟疾联合疫苗诱发了较高水平的IgG抗体,但是否能够在红细胞阶段抑制裂殖子进入红细胞仍需要后续的生长抑制试验<sup>[8]</sup>来确认。

无论是免疫接种期间还是免疫接种后,家兔均未出现任何异常反应。因而该疫苗是安全、有效且

耐受性良好的。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] World Health Organization. World malaria report 2014 [R]. Geneva: WHO, 2014: 1-242.
- [ 2 ] Zhang D, Pan W. Evaluation of three *Pichia pastoris*-expressed *Plasmodium falciparum* merozoite proteins as a combination vaccine against infection with blood-stage parasites [J]. Infect Immun, 2005, 73(10): 6530-6536.
- [ 3 ] Pan W, Huang D, Zhang Q, et al. Fusion of two malaria vaccine candidate antigens enhances product yield, immunogenicity, and antibody-mediated inhibition of parasite growth *in vitro* [J]. J Immunol, 2004, 172(10): 6167-6174.
- [ 4 ] Malkin E1, Hu J, Li Z, et al. A phase 1 trial of PfCP-2.9: an AMA1/MSP1 chimeric recombinant protein vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria [J]. Vaccine, 2008, 26(52): 6864-6873.
- [ 5 ] Kirsten M, Inger L, Hedvig P, et al. Methods in malaria research [M]. 5th ed. Manassas: Malaria Research and Reference Reagent Resource Center, 2008: 179-184.
- [ 6 ] Herrington DA, Clyde DF, Losonsky G, et al. Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites [J]. Nature, 1987, 328(6127): 257-259.
- [ 7 ] Plassmeyer ML, Reiter K, Shimp RL Jr, et al. Structure of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein, a leading malaria vaccine candidate [J]. J Biol Chem, 2009, 284(39): 26951-26663.
- [ 8 ] Persson KE, Lee CT, Marsh K, et al. Development and optimization of high-throughput methods to measure *Plasmodium falciparum*-specific growth inhibitory antibodies [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(5): 1665-1673.

(收稿日期: 2015-06-29)

(本文编辑: 孙雅雯, 陈勤)