

# 我国疟疾疫苗研究进展及前景

张冬梅, 潘卫庆

**【提要】** 研发安全有效的疟疾疫苗是当前全球疟疾防治的重要需求。以生物技术为代表的新型技术的应用, 有效推动了疟疾疫苗的研发进程。30 多年疟疾疫苗研发已取得了重要的成果, 鉴定了一批有价值的疫苗候选抗原, 其中一些已进入临床试验, 一些结果令人鼓舞。我国疟疾疫苗研发同样取得可喜进展。自主研发 PfCP-2.9 疟疾疫苗在国内率先进入临床试验, 一些疟疾疫苗候选抗原也陆续进入临床前研究阶段。近年来, 多种国家科技计划和国际上研究经费的投入也促进我国疟疾疫苗的研发工作。尽管研发有效疫苗以控制乃至根除疟疾是个长期目标, 取得疟疾疫苗突破仍需疟疾免疫学以及多个技术层面上解决一些关键问题, 但我们正在朝着这个目标迈进。

**【关键词】** 疟疾; 疫苗; 研究; 进展

中图分类号: 531.3 文献标识码: A

## Research and Development of Malaria Vaccine in China

ZHANG Dong-mei, PAN Wei-qing

(Department of Pathogen Biology, The Second Military Medical University, Shanghai 200433)

**【Abstract】** It remains an urgent need to develop effective malaria vaccine for global control of malaria. Application of high technologies such as biotechnology has facilitated the process of vaccine development for malaria. In the past 30 years, a large number of vaccine candidate antigens for malaria have been identified and some of them are currently in clinical trials. Major progress in malaria vaccine development has also been made in China. The PfCP-2.9 blood stage vaccine for malaria has entered clinical studies and some other vaccine candidates including combination malaria vaccine are currently in pre-clinical studies. The availability of various national research programs and international funding has stimulated laboratory and pre-clinical studies of malaria vaccine candidates. It remains a long-term goal to develop a safe and effective malaria vaccine to control and even eliminate the disease in the world, and many issues including malaria immunology and various types of technologies need to be addressed. However, efforts need to be continued toward the goal.

**【Key words】** Malaria; Vaccine; Research; Development

疟疾仍是全球最严重的热带传染病之一。由于疟原虫抗药性的产生和扩散, 以及抗杀虫剂蚊媒的出现和蔓延, 使得 20 世纪曾一度极为有效的 DDT 等杀虫剂灭蚊和氯喹抗疟药等疟防措施面临严峻挑战。目前疟疾仍流行于 100 多个国家、近一半的世界人口仍然面临感染疟疾的危险, 每年至少有 3 亿人感染疟疾, 其中近 300 万人死亡。面对如此严峻的疟防形势, 迫切需要寻找新型有效的疟防措施。研发安全有效的疟疾疫苗正是潜在的重要疟防新途径。

### 1 疟疾免疫和研发疟疾疫苗的可行性

疟原虫是真核生物病原体, 不仅其基因组较一般原核生物病原体大, 而且其生活史复杂, 及抗原存在种、株和期的特异性。这些决定了疟疾感染引起的免疫应答更为复杂。一般来说, 机体感染疟疾后能产生

一定程度的保护性免疫力, 包括体液和细胞免疫。尽管这些免疫力不能完全清除体内的原虫, 但能控制原虫率在较低水平, 避免重症疟疾的发生。

疟疾免疫具有期特异性。对红内期原虫而言, 抗体的作用是最为重要。用高疟区成人抗体被动治疗儿童疟疾患者可显著降低原虫血症和减轻临床症状, 且这种治疗无地区特异性。抗体对疟原虫的杀灭机制包括以下几个方面: 阻断裂殖子与红细胞的结合, 从而阻止其入侵; 通过特异抗体使感染红细胞集聚, 形成玫瑰花(结)反应产物或使裂殖子聚集, 这些聚集物可被网状内皮系统清除; 介导抗体依赖的吞噬作用和抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用 (ADCC)。研究显示, 一些疟疾抗体在体外并不抑制疟原虫生长, 但当有单核细胞存在时即可抑制疟原虫的生长。进一步研究显示, 介导单核细胞作用的抗体是高亲细胞型, 属于 IgG1 和 IgG3 亚型。此外, 活化的 CD4<sup>+</sup> T 细胞产生的炎性因子可激活巨噬细胞, 后者分泌活性氧介质

和一氧化氮 (NO) 而杀灭红内期原虫, 其实实验证据是来自于 B 细胞敲除的鼠在感染非致死性疟原虫后可有效地控制原虫密度但不能清除感染, 表明 CD4<sup>+</sup> T 细胞可发挥独立于抗体之外的细胞免疫作用。

对红前期原虫来说, 细胞免疫最为重要。感染疟原虫的肝细胞可诱导 CD8<sup>+</sup> T 细胞活化, 产生细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL), 并杀灭感染的肝细胞; 此外, 活化的 CD4<sup>+</sup> T 细胞能释放  $\gamma$ -干扰素等细胞因子, 后者能作用肝细胞产生 NO 等物质而杀灭肝细胞内的原虫; 抗体对红前期原虫也具有一定免疫保护作用, 包括阻断孢子入侵肝细胞等。

大量研究结果表明, 研制有效的疟疾疫苗是可行的。首先, 在疟疾流行区长期生活的居民可以产生一定的免疫力以抵抗疟疾的感染, 而罹患重症疟疾并死亡的患者主要是 5 岁以下无疟疾免疫力的儿童, 提示机体反复感染疟疾可产生一定的免疫保护力; 其次, 多次接种经辐照减毒的疟原孢子, 可使志愿者在相当长的时间内免于疟原孢子的攻击感染。此外, 很多动物实验也证实, 用天然或重组的疟疾疫苗候选抗原免疫动物, 可使其获得部分或全部的免疫保护力。最近 RTS,S 疟疾疫苗在非洲的临床试验结果显示, 该疫苗的保护效力可达 34% 至 77% 不等。充分表明, 研制有效的疟疾疫苗能够成为预防疟疾的主要措施。

## 2 疟疾疫苗的种类及主要进展

依照疟原虫不同发育阶段的生活史特点, 目前主要研究的疟疾疫苗可分为 3 大类, 分别为抗红前期 (红外期) 疟原虫疫苗、抗红内期疟原虫疫苗和传播阻断疫苗。此外, 采用辐照灭活和转基因减毒的疫苗也成为疟疾疫苗研发的新途径。

**2.1 抗红前期原虫疫苗** 疟原孢子孢子和感染的肝细胞是该类疫苗的作用靶点。由于疟原虫抗原具有期特异性, 针对孢子孢子的疫苗只对孢子孢子发挥作用。如果有孢子孢子逃避该类疫苗的作用, 它们即可在肝细胞及红细胞内大量繁殖, 引起感染并导致疟疾发作。因此, 针对孢子孢子的红前期疟疾疫苗, 需要达到完全的保护效力。

RTS,S 疫苗是当前领先的红前期疟疾疫苗。该疫苗是由恶性疟原虫环孢子蛋白 (CSP) 的 19 个 NANP 重复区及其 C 末端序列并与乙肝表面抗原融合而成。美国陆军医学研究院和葛兰素史克公司合作开展了该疫苗的临床前和临床试验的研究工作。临床试验结果显示该疫苗安全且有较强的免疫原性, 免疫保护效力从 34% 至 77% 不等。RTS,S 疫苗的临床试验先后进行

了十余次, 保护效力和免疫持续时间差异较大。RTS,S 与不同佐剂组合的研究结果显示, AS01E 佐剂可以极大地提高 RTS,S 的免疫原性和保护效力。目前, RTS,S 疫苗的 III 期临床试验已在肯尼亚进行, 旨在扩大疫苗接种人群并评价疟疾保护效力和免疫持续时间。除 CSP 外, 其他红前期疟疾疫苗候选抗原包括 LSA-3 合成肽疫苗、LSA-1 重组蛋白疫苗和 ME-TRAP 联合疫苗等 (由来自红前期抗原的 2 个 B 细胞表位和 14 个 T 细胞表位组成 ME 与 TRAP 融合而成)。上述疫苗候选抗原均已进入临床试验。

**2.2 抗红内期原虫疫苗** 由于在疟原虫的生活史中, 惟有红内期原虫能使人体致病甚至致命。红内期疫苗可降低疟疾的危重程度和死亡率, 因此阻断裂殖子入侵红细胞是设计和研发这一时期疫苗的主要靶点。位于裂殖子表面蛋白和微线体或棒状体的蛋白质可能参与裂殖子入侵的过程, 因此这些蛋白是重要的疫苗候选抗原, 包括裂殖子表面蛋白 (MSPs)、裂殖子顶端膜抗原 1 (AMA1) 和 Mr 175 000 红细胞结合抗原 (EBA-175) 等。

目前约有 6 种红内期疫苗候选抗原进入临床试验。美国 Walter Reed 研究所 (WRA IR)、葛兰素史克公司 (GSKBio) 和美国健康相关的技术规划组织 (PATH) 及其属下的疟疾疫苗规划署 (MVI) 等机构联合对 MSP1 的 Mr 42 000 C 末端片段 (MSP1-42) 抗原进行临床试验, 结果显示疫苗具有较好的安全性和免疫原性, 但在 II 期临床试验中却未产生有效的保护效果。恶性疟原虫 AMA-1 也是当前红内期疫苗领先的候选抗原, 动物和临床试验结果显示, AMA-1 具有较强的抗体依赖的免疫保护作用。美国 Walter Reed 研究所等多家单位在不同的异源系统中制备了 AMA-1 重组蛋白, 经与 AS02A、铝佐剂和 CPG 7909 等佐剂乳化后进行 I 期临床试验, 目前在马里的儿童中开展 II 期临床试验。

**2.3 传播阻断疫苗** 该类疫苗是通过阻断疟原虫在蚊体内的生殖、发育和繁殖, 以实现阻断疟疾传播的目的。这类疫苗虽然不能保护疫苗接种者本人, 但能阻断疟疾的传播, 因此可与其他疟疾疫苗或抗疟药联合应用, 以实现预防感染和阻断传播的双重目标。当前进入临床试验的传播阻断疫苗是酵母表达的 Pf525 抗原, 在动物实验中该蛋白的抗体能阻断配子体的发育。

## 3 我国疟疾疫苗研究现状和进展

我国对疟疾疫苗研发也经历 20 多年, 并取得了重要进展。目前, 我国有多个自主研发的疟疾疫苗处在不同的研发阶段, 其中红内期疫苗 PfCP-2.9 已进入

临床试验, 另外至少有两个疫苗进入临床前研发阶段, 其中一个是由红内期和红前期抗原组成的多价多期疫苗, 另一个是新型多表位人工抗原疟疾疫苗。此外, 一些处在实验室研究阶段的疫苗候选抗原、疫苗载体或佐剂也取得有价值的研究进展。我国在疟疾疫苗研发领域里之所以能取得重要进展, 这与近年来多种国家科技计划对这一领域的大力支持是分不开的。

PfCP-2.9 抗原是我国第一个批准进入临床试验的疟疾疫苗, 该疫苗抗原是由两个裂殖子表面抗原 (MSP1 和 AMA1) 的 C-末端融合而成, 在裂殖子入侵红细胞过程中, 这两个蛋白发生酶解, 最后只有其 C-末端位于裂殖子表面, 并随裂殖子入侵红细胞。显然, 这两个 C-末端片段参与疟原虫入侵过程。在动物免疫学研究发现, 与单个抗原相比, 融合抗原显著提高了抗原免疫原性和抗体介导的抑制疟原虫体外生长效力。WHO 对全球多个 MSP1 相关的疟疾疫苗进行平行实验比较, 结果显示 PfCP-2.9 疫苗的两个组分均能诱导产生抑制性抗体, 显示出明显的优势。第二军医大学与上海万兴生物制药公司合作完成了该疫苗临床前研究, 并获国家食品药品监督管理局 (SFDA) 批准进入临床试验。目前完成的 2 个临床试验分别由 WHO 和美国比尔盖茨基金会作为主办者负责实施。

研究表明, Mr 175 000 恶性疟原虫红细胞结合蛋白 (PfEBA-175) 能与红血球表面血型糖蛋白结合, 介导裂殖子入侵, 该蛋白的第二区域 (PfEBA-175 II f2) 是结合的功能域。为从不同途径抑制疟原虫入侵, 提高抑制效力, 将 3 个裂殖子蛋白, 即 PfCP-2.9 和 PfEBA-175 II f2 进行联合免疫。结果显示了各抗原组分均能产生抑制原虫生长的抗体, 从不同途径阻断疟原虫入侵宿主细胞。

如前所述, 疟疾红内期疫苗主要作用是降低疟疾危重程度和死亡率, 但不具有抗疟疾感染作用, 而红前期疫苗主要作用是阻断孢子进入肝细胞, 具有抗感染的作用。因此, 将红内期和红前期抗原联合, 组成的多价多期疫苗具有双重功能。本文作者所在实验室构建了由 PfCP-2.9 和 PfCSP-2 组成的多价多期疟疾疫苗, 实验表明该疫苗诱导抗体具有杀灭红内期原虫并能识别红前期原虫。目前, 该疫苗已进入临床前研究。

协和医科大学是国内较早从事疟疾免疫与疫苗相关研究工作的单位, 早在 20 世纪 80 年代初, 制备了多个能在体外抑制恶性疟原虫生长的单克隆抗体, 并进一步筛选出疟原虫特异性 B 细胞表位, 在此基础上采用具有自主知识产权的表位随机重组技术, 构建了新型多表位人工抗原疟疾疫苗, 目前该疫苗已进入临床前研究; 原第一军医大学疟疾疫苗学课题组使

用多次部分换人血猕猴模型, 检测含有疟疾疫苗候选抗原的痘苗病毒的免疫保护作用, 尽管动物数量有限, 但已观察到了接种该疫苗可产生一定的免疫保护效力; 第四军医大学课题组采用 MSP1、AMA1 的 DNA、痘苗病毒以及重组蛋白混合免疫, 在小鼠体内能诱生出有效的保护性抗体; 中山大学课题组采用化学拼接法将恶性疟原虫多价保护性抗原的基因 (或与 IL-2 等基因) 拼接, 并在大肠埃希菌中成功表达。此外, 国内一些单位在疟疾 DNA 疫苗和重组蛋白疫苗研究方面也取得不同程度的进展。

综上所述, 我国疟疾疫苗研究已取得重要的阶段性进展, 其中一些研究已受到国际上的关注, 包括美国比尔盖茨基金会和 WHO 等国际组织, 对我国自主研制的疟疾疫苗予以资金和技术的支持, 反映了我国在这一领域的研究工作已达到国际水平。其他一些尚处在实验室研发阶段的疫苗候选抗原也显示出良好的发展前景, 并已取得了有价值的研究结果。基于上述的工作基础, 完全有理由相信我国对疟疾疫苗的研发将会更上一层楼。

#### 4 疟疾疫苗研发面临的困难和展望

疟疾疫苗研究已进行了 30 多年, 但至今尚无成熟疟疾疫苗产品推入市场, 用于疟疾预防。目前疟疾疫苗研发面临的主要困难包括对疟疾免疫保护机制、疟原虫入侵机制和抗原变异机制等缺乏全面深入的了解, 缺少合适的动物模型用于疫苗功效的评价, 以及缺乏合适于人用的佐剂等。疟疾疫苗研发要取得突破, 还需要进一步鉴定更具保护效力和免疫持续时间的疫苗候选抗原, 建立合适的疫苗传递系统和拓展疫苗研发的思路和途径。

疟原虫、蚊媒, 以及人类基因组计划的陆续完成, 这为疟疾疫苗的研究提供了重要信息和视觉。得益于疟原虫蛋白质组和结构生物学的研究, 人类可通过建模和分析多个关键疟原虫蛋白质的三维结构, 以优化疟原虫疫苗的表位设计, 推动疟原虫疫苗研究进程; 另外, 免疫学的飞速发展也极大地推进了包括疟疾疫苗在内的疫苗学研究。在未来疟疾疫苗研究中应注重以下几方面的研究内容: ① 充分利用免疫学研究的新发现, 在更加深入了解疟疾免疫保护机制的前提下, 有的放矢地将免疫细胞的作用体现在疫苗设计中; ② 利用反向疫苗学、基因组学、蛋白组学和高通量筛选技术大规模地筛选鉴定新的候选抗原及表位; ③ 研究新型疫苗传递系统, 包括合适的人用型佐剂、新型疫苗载体等, 以提高疫苗在人体的免疫原性和增强免疫记忆等; ④ 联合不同期疟原虫抗原以

构建多期多价疫苗, 从不同途径阻断疟原虫生长, 从而提高疫苗的保护效力; ⑤ 采用现代新型技术, 拓展疫苗研发的思路和途径, 包括采用转基因减毒或用物理方法减毒孢子疫苗, 着力解决大规模孢子制备技术的工艺问题等, 寻找疫苗研发新途径; ⑥ 建立合适有效的动物模型以评价疟疾疫苗的效果, 包括构建携带疫苗抗原基因的转基因鼠疟原虫等, 以推进疫苗研发进程。

几十年疟疾疫苗研发经历和积累的经验告知我们, 尽管研制有效的疫苗是人类控制疟疾潜在的重要途径, 但人类试图用疫苗根除疟疾的目标仍有很长的路要走。然而, 研制能降低疟疾发病率和死亡率, 用于预防儿童疟疾的疫苗应该是为期不远。

### 参 考 文 献

- [1] Moorthy VS, Pinder M, Reece WH, *et al.* Safety and immunogenicity of DNA/modified vaccinia virus ankara malaria vaccination in African adults[J]. *J Infect Dis*, 2003, 188(8): 1239-1244.
- [2] 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.
- [3] Long CA, Hoffman SL. Enhanced: Malaria-from infants to genomics to vaccines[J]. *Science*, 2002, 297(5580): 345-347.
- [4] Preiser PR, Khan S, Costa FT, *et al.* Stage-specific transcription of distinct repertoires of a multigene family during plasmodium life cycle[J]. *Science*, 2002, 295(5553): 342-345.
- [5] Bejon P, Lusingu J, Olotu A, *et al.* Efficacy of RTS, S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age[J]. *N Engl J Med*, 200, 359(24): 2521-2532.
- [6] Gregson AL, Oliveira G, Othoro C, *et al.* Phase I trial of an alhydrogel adjuvanted hepatitis B core virus-like particle containing epitopes of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein [J]. *PLoS ONE*, 2008, 3(2): e1556.
- [7] Malkin E, Long CA, Stowers AW, *et al.* Phase I study of two merozoite surface protein 1 (MSP1-42) vaccines for *Plasmodium falciparum* malaria[J]. *PLOS Clin Trial*, 2007, 2(4): e12.
- [8] Bojang KA, Milligan PJM, Pinder L, *et al.* Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial[J]. *Lancet*, 2001, 358(9297): 1927-1934.
- [9] Wu Y, Ellis RD, Shaffer D, *et al.* Phase I trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51[J]. *PLoS ONE*, 2008, 3(7): e2636.
- [10] Genton B, Betuela I, Felger I, *et al.* A recombinant blood stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase1-2b trial in Papua New Guinea[J]. *J Infect Dis*, 2002, 185(6): 820-827.
- [11] Pan WQ, Huang DQ, Zhang QF, *et al.* Fusion of two malaria vaccine candidates enhances product yield, immunogenicity and antibody-mediated inhibition of parasite growth *in vitro*[J]. *J Immunol*, 2004, 172(10): 6167-6174.
- [12] Hu JH, Chen ZH, Pan WQ, *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): 1-14.
- [13] Malkin E, Hu J, Li Z, *et al.* A Phase I trial of PfCP2.9: An AMA1/MSP1 chimeric recombinant protein vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria[J]. *Vaccine*, 2008, 26(52): 6864-6873.
- [14] Dong WQ, Li M, Bi HX, *et al.* Evaluation of protective immunity of a vaccinia virus vectored multi-epitope live vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* multiple partial replacement transfused human blood macaca monkey models[J]. *Chin J Immunol*, 2000, 16(5): 271-274. (in Chinese)  
(董文其, 李明, 毕惠祥, 等. 恶性疟原虫保护性抗原复合基因-痘苗病毒重组活疫苗株在换人血猕猴模型的抗攻击试验[J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(5): 271-274.)
- [15] Tang YY, Wang H. Construction and immunogenicity prediction of *Plasmodium falciparum* CTL epitope minigene vaccine [J]. *Sci Chin*, 2001, 31(1): 59-65. (in Chinese)  
(唐玉阳, 王恒. 恶性疟原虫 CTL 抗原微表位基因重组疫苗的构建和免疫原性预测[J]. 中国科学, 2001, 31(1): 59-65.)
- [16] Luo SH, Yu XB, Xu J, *et al.* Study on *Plasmodium falciparum* vaccine VII: connection and cloning of a hybrid gene encoding protective antigens of *Plasmodium falciparum* and human interleukin-2[J]. *Acta Parasitol Med Entomol Sin*, 1997, 4(2): 65-70. (in Chinese)  
(罗树红, 余新炳, 徐劲, 等. 恶性疟原虫疫苗研究 VII: PFCMR 基因与人白细胞介素-2 基因的连接与克隆[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 1997, 4(2): 65-70.)
- [17] Li SM, Li X, Miao J, *et al.* Protective immunity induced by the combined vaccination with merozoite surface protein 1 and apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum*[J]. *Chin J Zoonoses*, 2006, 22(10): 936-940. (in Chinese)  
(李淑梅, 李珣, 缪军, 等. 以恶性疟原虫 MSP1 和 AMA1 疫苗组合免疫小鼠诱导保护性免疫[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(10): 936-940.)

(收稿日期: 2009-09-14 编辑: 盛慧锋)