

## Osiągnięcia i perspektywy w badaniach nad opracowaniem szczepionki przeciwko malarii

### Achievements and perspectives of research into development of a vaccine against malaria

Marcin Wiśniewski, Dagmara Joanna Żak

Zakład Parazytologii i Inwazjologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Adres do korespondencji: Marcin Wiśniewski; E-mail: marcin\_wisniewski@sggw.waw.pl

**ABSTRACT.** Malaria is caused by parasites of the genus *Plasmodium*. Every year from 350 to 500 million of malaria cases are recorded with an estimated annual death toll of over 1.1 million deaths, making malaria the global health problem. Malaria deepens the poverty, limits the education and causes absences at schools and workplaces – what makes the progress of civilization and economy slower. This is why beside the classical methods of malaria prevention, such as the elimination of the places of mosquito breeding and, application of insecticides or chemoprophylaxis, the elaboration of effective malaria vaccine is a necessity. Despite considerably high financial investments for long term malaria research, so far it has not been possible to develop an efficient vaccine against this disease. This is why the main topic of the present review is presenting of achievements and perspectives of research on development of vaccine against malaria with special consideration of tested antigens. Our review also contains an attempt to typify the most prospective vaccine. Currently developed and tested vaccines against malaria may be divided in three groups depending on the parasite living stage which the vaccine influences: pre-erythrocytic stage vaccines, blood stage vaccines and transmission blocking vaccines. At the moment it seems that the most promising vaccine against malaria is RTS,S/ASO2A which represent the pre-erythrocytic stage vaccines. However developing a completely safe, efficient and budget-friendly vaccine still remains the far-reaching goal and requires further years of research.

**Key words:** malaria, *Plasmodium*, antigens, vaccine against malaria

Obok AIDS i gruźlicy malaria jest jedną z najbardziej śmiertelnych chorób, zbierających największe żniwo na świecie. Każdego roku od 350 do 500 milionów osób zapada na malarię z czego ponad milion przypadków kończy się śmiercią – są to głównie dzieci do 5 roku życia. Szacuje się, że ponad 3 miliardy osób mieszka w 107 krajach świata, gdzie występuje ryzyko zarażenia, dlatego też malaria uznana jest za światowy problem zdrowotny. Powoduje pogłębianie się ubóstwa, ogranicza edukację i jest przyczyną absencji w szkołach i miejscach pracy. Rzutuje w ten sposób na spowolnienie rozwoju cywilizacyjno-ekonomicznego i kosztuje afrykańskie kraje ponad 12 miliardów dolarów rocznie [1,2].

*Plasmodium* będące czynnikiem etiologicznym u ludzi to jednokomórkowe pierwotniaki pasożytujące w komórkach miększu wątroby i erytrocytach człowieka. Cztery gatunki *Plasmodium* są przyczyną malarii u ludzi: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* i *P. falciparum*. Każdy gatunek wykazuje odrębne cechy morfologiczne, biologiczne i genetyczne. Najgroźniejszym gatunkiem dla człowieka z racji tego, że najwięcej przypadków zachorowań kończy się śmiercią jest *P. falciparum* [3].

Odporność na malarię jest złożonym zjawiskiem. Istnieje odporność naturalna i nabyta. Z odpornością naturalną mamy do czynienia w przypadku gdy pasożyt ma trudności w rozpoznaniu erytrocytów w wyniku braku glikoforyn, nie może wnikać

nąć do krwinek na skutek owalocytozy, bądź też rozwijać się w erytrocytach z powodu niedokrwistości sierpowatej. Niedokrwistość sierpowata powoduje zmianę w kształcie krwinki czerwonej i nadaje jej charakterystyczny sierpowaty kształt. Taki erytrocyt szybciej ulega eliminacji w śledzionie, uniemożliwiając osiągnięcie dojrzałości rozwijającemu się w nim *Plasmodium* [3].

Istotną rolę w rozpoznawaniu krwinek czerwonych przez pasożyta mają glikoforyny. Ich brak powoduje niemożność identyfikacji erytrocytów podczas inwazji. Proces inwazji erytrocytów ludzkich przez zarodźca malarii jest wynikiem kaskady interakcji pomiędzy pasożytem a krwinką czerwoną. Poznano wiele ligandów ekspresjonowanych przez komórki zarodźca, biorących udział w tym procesie, w tym białka należące do rodziny DBL (Duffy binding ligand). Stwierdzono, że receptorami dla przynajmniej dwóch ligandów *Plasmodium falciparum* z rodziny DBL: antygeny EBA-175 oraz EBA-140 (BAEBL), są sjałoglikoproteiny erytrocytów ludzkich – glikoforyny A, B i C. Wykazano, że antygen EBA-175 wiąże się do glikoforyny A, a w wiązaniu biorą udział reszty kwasu sjałowego O-glikozydowych łańcuchów cukrowych. Funkcję glikoforyny A może przejąć druga pod względem ilości glikoforyna B. Podobnie jak w przypadku glikoforyny A, wiązanie *Plasmodium falciparum* jest zależne od reszty kwasu sjałowego, lecz bierze w nim udział inny, nie poznany dotąd ligand merozoitów. Występująca na erytrocytach, w najmniejszej ilości glikoforyna C, jest receptorem dla homologicznego do EBA-175 liganda BAEBL. Stwierdzono, że w wiązaniu antygeny BAEBL do glikoforyny C biorą udział reszty kwasu sjałowego O- i N-glikozydowych łańcuchów cukrowych, a także reszty aminokwasowe łańcucha polipeptydowego glikoforyny. [4].

Owalocytoza następuje na skutek zaburzenia budowy białek erytrocytów (głównie spektryny), co powoduje zmianę ich kształtu. Spektryna jest głównym składnikiem kory erytrocytów odpowiadającym za utrzymanie kształtu komórek, z błoną wewnątrzkomórkową połączona jest ona za pomocą białek łączących. W przypadku, gdy dochodzi do powstania w erytrocytach nieprawidłowej spektryny, komórki te tracą swój kształt – powoduje to utrudnienia we wnikięciu *Plasmodium* do krwinki czerwonej [5].

Rodzaj odpowiedzi immunologicznej przeciwko pasożytom zależy od miejsca bytowania w organizmie i stadium rozwojowego. W zwalczaniu paso-

żyta jako pierwsza uczestniczy odpowiedź nieswoista. Podczas zarażenia *Plasmodium* do zapoczątkowania odpowiedzi nieswoistej dochodzi poprzez rozpoznanie m.in. pochodnych glikozylofosfatydiloinozytolu oraz hemozoiny, które tworzą struktury PAMP (pathogen associated molecular patterns) będące ligandami dla receptorów rozpoznających wzorce (PRR). Aktywacja układu dopełniacza, granulocytów i makrofażów jak również wydzielanie cytokin prozapalnych ma na celu ograniczenie zarażenia. Później dochodzi do zapoczątkowania mechanizmów swoistych, które polegają na wytworzeniu przeciwciał przeciwko stadiom krwinkowym i mechanizmów odporności komórkowej przeciwko stadiom pozakrwinkowym. Odpowiedź immunologiczna to proces dynamiczny i zazwyczaj przebieg zarażenia jest wypadkową równowagi pomiędzy odpowiedzią typu Th1 i Th2 [6].

Szerzeniu się malarii można zapobiegać poprzez likwidację miejsc lęgowych komarów, stosowanie insektycydów oraz chemioprophylaktykę u ludzi. Nie ma jednak leku przeciwmalarycznego w pełni skutecznego i całkowicie bezpiecznego, dodatkowo występuje coraz większa lekooporność ze strony *Plasmodium*. Malarii zapobiega się także poprzez unikanie kontaktów z komarami głównie od zmierzchu do świtu przez właściwe ubranie – długie rękawy i spodnie, skarpetki, jak również stosowanie na odkryte części ciała repelentów. Zabezpiecza się mieszkania poprzez zawieszanie siatek w oknach i drzwiach wejściowych, spanie pod moskitierami oraz klimatyzację pomieszczeń. Patrząc jednak na dane statystyczne, ukazujące ogrom przypadków zachorowań na malarię widać, że metody te są zawodne. Konieczne zatem wydaje się pilne opracowanie skutecznej szczepionki przeciwko malarii, na której skupia się obecnie uwaga naukowców na całym świecie [3].

### Szczepionki przeciwko malarii

Biorąc pod uwagę złożoność cyklu życiowego pierwotniaków rodzaju *Plasmodium*, konstruowane obecnie szczepionki przeciwko malarii można podzielić na trzy grupy z uwagi na etap życiowy pasożyta na który oddziałują:

- szczepionki etapu pre-erytrocytarnego
- szczepionki etapu krwinkowego
- szczepionki blokujące transmisję

### Szczepionki etapu pre-erytrocytarnego

Szczepionka pre-erytrocytarna nazywana inaczej

antysporozoitową zapobiegałaby zarażeniu hepatocytów przez sporozoitów i/lub zapobiegałaby dojrzewaniu pasożytów etapu wątrobowego. Kluczem dla rozwoju takiej szczepionki jest indukcja produkcji przeciwciał, które blokowałyby zarażenie sporozoitami, jak również indukcja efektorowych limfocytów T CD4 i CD8, które mogłyby niszczyć zarażone hepatocyty bezpośrednio bądź też przez ich mediatory takie jak cytokiny [7].

W latach 60. XX wieku naukowcy badali wpływ atenuowanych za pomocą promieniowania gamma i promieniowania rentgenowskiego sporozoitów, co dodało impetu rozwojowi szczepionki przeciwko malarii [8]. Tego typu szczepionki zapewniają ochronę u ponad 90% zaszczepionych osób na okres co najmniej 10 miesięcy. Istnieją jednak duże obawy dotyczące tego typu szczepionek, wiążące się z dawką promieniowania. Przy zbyt małej dawce promieniowania sporozoitów mogą zachować część zjadliwości i zarażać erytrocyty, zaś nadmierna dawka promieniowania może spowodować brak indukcji odporności [9]. Obawy dotyczące bezpieczeństwa i genetycznej stabilności były kluczowymi barierami produkcji na dużą skalę i dystrybucji atenuowanych sporozoitów za przystępną cenę [10]. Dlatego też były i nadal są poszukiwane inne rozwiązania.

Sklonowanie w 1983 roku genu CSP (Circumsporozoite protein) *Plasmodium knowlesi*, bytującego u ssaków naczelnych – głównie małp, dało nadzieję na rozwój dostępnej, podjednostkowej szczepionki. Podążając w tym kierunku naukowcy sklonowali gen CSP *Plasmodium falciparum* [8].

#### **Antygen CSP**

Jest wysoce immunogennym białkiem powierzchniowym sporozoitów *Plasmodium*, które tworzy gęsty płaszcz na powierzchni pasożyta. Białka CSP wszystkich gatunków *Plasmodium* posiadają kilka wspólnych cech. Zawierają w centralnej części region powtórzeń, którego sekwencja aminokwasowa jest specyficzna gatunkowo (powtórzona sekwencja czteroaminokwasowa, NANP dla *P. falciparum*). Dodatkowo posiadają dwa konserwatywne regiony: pięcioaminokwasową sekwencję nazwaną regionem I, która występuje bezpośrednio przed regionem powtórzeń oraz sekwencję, która wykazuje adhezję do komórek i nazywana jest TSR. Dodatkowo 20 pierwszych reszt aminokwasowych CSP posiada cechy eukariotycznej sekwencji sygnałnej, natomiast COOH – terminalna sekwencja zawiera dodatkowe miejsce wiązania GPI (glikozylfosfatydyloinozytol). Tak więc C-terminalny re-

gion tego białka jest prawdopodobnie używany do kotwiczenia w błonie [11].

Pierwsze badanie szczepionki opartej na rejonie powtórzeń (NANP)n zostało przeprowadzone w 1987 roku. Nie uzyskano jednak pożądanego efektu, a odniesiona porażka związana była z brakiem epitopu rozpoznawanego przez limfocyty T, dlatego też przy kolejnych próbach dwa immunodominujące epitopy dla limfocytów T zostały dodane do szczepionki. Restrykcja MHC (major histocompatibility complex) odpowiedzi na (NANP)n jak również potwierdzenie, że napromieniowane sporozoitów generują T-zależną odpowiedź na (NANP)n wskazują na problemy w użyciu tej domeny w opracowaniu skutecznej szczepionki. Pomimo tego, (NANP)n pozostaje najszerzej rozpowszechnioną domeną antygenową wykorzystywaną do opracowywania szczepionek i jest składnikiem większości podjednostkowych kompozycji [8].

CSP jest antygenem sporozoitów, nad którym skupia się w przeważającej mierze uwaga naukowców z całego świata, czyniąc go najszerzej badany antygenem. Zostało udowodnione, że CSP jest niezbędnym białkiem strukturalnym, brak tego białka powoduje zablokowanie etapów rozwoju pasożyta zachodzących u żywiciela ostatecznego. Również inne antygeny etapu pre-erytrocytarnego zostały zidentyfikowane i są na różnych etapach badań. Zalicza się do nich LSA-1 (Liver stage antigen-1), LSA-3 (Liver stage antigen-3), TRAP (Thrombospondin related adhesion protein). Jednak żaden z nich nie jest tak obiecujący jak CSP [8].

#### **Szczepionka RTS, S/ASO2A**

Opracowana przez firmę GlaxoSmithKline we współpracy z Walter Reed Army Institute of Research jest najbardziej zaawansowaną i obiecującą szczepionką przeciwko malarii [12]. RTS, S jest rekombinacyjnie produkowany w *Saccharomyces cerevisiae* i składa się z C-terminalnego fragmentu CSP (od 207 do 395 aminokwasów) laboratoryjnego szczepu 3D7, izolatu NF54 *Plasmodium falciparum*, powtórzonej sekwencji NANP i epitopów rozpoznawanych przez limfocyty B. Składowe te przyłączone są do aminowego końca antygeny powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B – HbsAg. Silny trzyskładnikowy adjuwant ASO2A – emulsja olej w wodzie z monofosforylowym lipidem A i pochodną saponiny QS2 jest centralnym elementem tej formuły [10,13,14].

Pierwsza faza badań tej szczepionki, która była prowadzona na dzieciach z Gambii w przedziale wiekowym 1–5 lat oraz 6–11 lat pokazała, że szcze-

cionka jest bezpieczna, dobrze tolerowana i wykazuje działanie immunogenne. Te obiecujące wyniki skłoniły naukowców do dalszych badań tej szczepionki na sześćdziesięciorgu dzieciach z Mozambiku w wieku od 1 do 4 lat. Na podstawie tego badania wysunięto podobne wnioski co umożliwiło zaplanowanie i przeprowadzenie fazy II badań. Badania te przeprowadzono na dorosłych mężczyznach z Gambii, w tym przypadku szczepionka wykazała 34% skuteczność przed naturalnym zarażeniem podczas czterech miesięcy od zaszczepienia. Następnie testowanie tej szczepionki wkroczyło w fazę II b badań. Były to próby losowe, z losowym doborem 2022 dzieci w przedziale wiekowym od 1 do 4 lat. Badanie obejmowały dzieci, którym podano przy pomocy trzech dawek RTS, S/ASO2A. Skuteczność trzech dawek szczepionki RTS, S/ASO2A przed pierwszym zarażeniem malarią wyniosła ok. 30% zaś częstotliwość występowania ostrej postaci malarii zmniejszyła się o 58% po 6 miesiącach. Ostatnie doniesienia wskazują, że po okresie dłuższym niż 18 miesięcy sytuacja wygląda odpowiednio 35,3% oraz 48,6% [12,14,15]. Szczepionka ta zakończyła niedawno III fazę badań i wszystko wskazuje na to, że zainwestowane w opracowanie tej szczepionki 300 mln dolarów z czego 107 mln wyłożyła fundacja Billa i Melindy Gatesów, to dobra inwestycja dla ludzkości.

Sukces formuły RTS, S/ASO2A w indukcji ochronnej odpowiedzi immunologicznej może wywrzeć ogromny wpływ na rozwój kolejnej generacji szczepionek podjednostkowych. Decydujące kwestie to wybór dodatkowych antygenów, które można dołączyć do fragmentu CSP jak również dobór adjuwanta, który silniej mógłby wspierać efektywność RTS, S [16].

Opracowane zostały również inne szczepionki etapu pre-erytrocytarnego, które są obecnie w trakcie badań. Niestety poziom ich zaawansowania jest dużo niższy w porównaniu z RTS, S/ASO2A.

### Szczepionki etapu krwinkowego

Z uwagi na fakt, że kliniczne objawy malarii ujawniają się tylko podczas bezpłciowego etapu krwinkowego, szczepionka skierowana na ten etap cyklu życiowego pasożyta redukowalaby zachorowalność i śmiertelność poprzez eliminację lub redukcję pasożyta. Dodatkowo łagodziłaby przebieg choroby, zmniejszając występowanie powikłań prawdopodobnie eliminowałaby malarię gdyby osiągnięta została odporność sterylna. Dla rozwoju tej szczepionki istotna jest produkcja przeciwciał,

które neutralizują/niszczą merozoity i zarażone erytrocyty, blokowanie przylegania cytokin jak również aktywacja efektorowych limfocytów T CD4, które mogą kierować odpowiedzią komórkową [17].

Pierwotniaki rodzaju *Plasmodium* wydają się być dobrze umiejscowione w krwinkach czerwonych, ponieważ mogą unikać odpowiedzi ze strony układu immunologicznego żywiciela. Erytrocyty nie posiadają cząsteczek MHC klasy I i II, jak również mechanizmu przetwarzania antygenów. Z tego też powodu nie jest indukowana bezpośrednia odpowiedź limfocytów T, na napotkane na powierzchni komórek żywiciela determinanty antygenowe. Pierwotniak rodzaju *Plasmodium* zostaje bezpośrednio odsłonięty jedynie zaraz po rozerwaniu struktury schizonta, kiedy przez bardzo krótki okres czasu potomne merozoity przylączają się do nowych erytrocytów przed wejściem do ich wnętrza. Z tego też powodu więcej uwagi poświęca się tym antygenom pasożyta, które oddziałują z komórkami gospodarza podczas zarażania krwinek czerwonych stając się tym samym potencjalnym celem odpowiedzi immunologicznej. Do takich antygenów, bezpłciowego etapu krwinkowego należą z pewnością MSP (Merozoite Surface Protein), RESA (Ring – infected Erythrocyte Surface Antigen) i inne [17].

### Antygen MSP

Powierzchniowe białka merozoitu syntetyzowane są podczas schizogonii jako prekursor polipeptydowe, które różnią się pod względem wielkości i sekwencji aminokwasowej. Do chwili obecnej zostało zidentyfikowanych osiem MSP *Plasmodium falciparum* (MSP1–8). MSPs są potencjalnymi kandydatami na szczepionkę ponieważ odgrywają istotną rolę we wstępnym rozpoznaniu i przyłączeniu merozoitów do powierzchni krwinek czerwonych. Z uwagi na fakt, że białka występujące na powierzchni merozoitów wystawione są na działanie systemu immunologicznego żywiciela, są one celem odpowiedzi immunologicznej. Przeciwciała przeciwko MSP neutralizują pasożyta poprzez aglutynację lub opsonizację merozoitów, zapobiegając tym samym rozpoznaniu i zarażeniu erytrocytów [18].

MSP1 jest glikoproteina, syntetyzowaną jako prekursor białka o wysokiej masie cząsteczkowej (185–205 kDa). Prekursor białka ulega dwóm modyfikacjom do kilku fragmentów pod wpływem proteaz. Podczas rozpadu schizonta dochodzi do głównej modyfikacji, która daje początek fragmentom MSP1<sub>83</sub>, MSP1<sub>30</sub>, MSP1<sub>38</sub> i MSP1<sub>42</sub>, które tworzą niekowalencyjnie powiązany kompleks

dołączony do wolnej powierzchni merozoitu poprzez fragment 42 kDa. Podczas inwazji merozoitu dochodzi do drugiej obróbki, która jest wstępnym warunkiem zarażania krwinek czerwonych. Zależna od wapnia, proteolityczna obróbka rozdziela fragment 42 kDa zakotwiczony w błonie C–końcem na dwa mniejsze fragmenty. Rozpuszczalny, 23 kDa fragment, który odpowiada N–terminalnemu regionowi MSP1<sub>42</sub> zostaje zrzucany z wolnej powierzchni merozoitu. Natomiast związany z błoną 19 kDa, C–terminalny region, który zawiera dwie domeny podobne do EGF (Epidermal growth factor) jest jedynym fragmentem niesionym przez merozoity, które dokonują inwazji nowych erytrocytów. Dlatego też naukowcy zajmujący się opracowaniem szczepionki przeciwko etapowi krwinkowemu poświęcają MSP1<sub>19</sub> najwięcej uwagi [17,19]. Strukturalne determinanty MSP1<sub>19</sub>, uformowane przez dwa moduły podobne do EGF, razem wydają się być kluczowe dla immunogenności tego białka. Badania prowadzone na myszach wykazały, że uzyskiwały one ochronę kiedy zaszczepiono je rekombinowanym białkiem zawierającym oba moduły. W przypadku szczepienia przy pomocy każdego modułu z osobna nie uzyskano pożądaných efektów [20].

#### **Antygen RESA**

RESA znajduje się w gęstych granulach, szczytowego regionu merozoitów. Uwolniony zostaje do wakuoli podczas inwazji merozoitów i przemieszcza się na wewnętrzną powierzchnię błony krwinek czerwonych. Indukuje humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną. Wytworzone przeciwciała przeciwko RESA hamują wzrost *Plasmodium falciparum* w warunkach in vitro [17].

W przypadku bezpłciowego etapu krwinkowego naukowcy mają szerokie spektrum możliwości ponieważ zidentyfikowano wiele antygenów, które są w trakcie badań. Należą tu głównie powierzchniowe białka merozoitu, peryferyjne białka powierzchniowe oraz białka organelli wydzielniczych (mikronemy i roptrie) [10], a dokładnie AMA–1 (Apical membrane antigen–1), DBL (*P. vivax* Duffy binding ligand), GLURP (Glutamate rich protein), PfEMP–1 (*P. falciparum* Erythrocyte membrane protein–1), Pfen (enolase), PfP0 (ribosomal phosphoprotein P0), SERA–5 (Serine repeat antigen–5), EBA–175 (Erythrocyte binding antigen–175) [8].

#### **Kombinacja B**

Jest najbardziej zaawansowaną szczepionką bezpłciowego etapu krwinkowego. Obejmuje rekombinowane białko MSP1 (konserwatywny blok 3 i 4)

połączone z fragmentem CSP *Plasmodium falciparum*, dodatkowo w jej skład wchodzi MSP2 (alleliczna forma 3D7) niemal pełnej długości, jak również 70% C–terminalnego końca RESA. Dla usprawnienia odpowiedzi immunologicznej cała ta formuła połączona jest z adjuwantem Montanide ISA 720 [12,21].

Pięć prób klinicznych Kombinacji B prowadzonych na 217 uczestnikach wykazało, że szczepionka jest bezpieczna, co więcej dodatkowo dwie próby dowiodły jej skuteczności. Faza I/II b badań Kombinacji B prowadzona na 120 dzieciach w przedziale wiekowym 5–9 lat w Papua Nowa Gwinea nie wykazała mniej licznego występowania klinicznych postaci malarii, wykazała zaś redukcję parazytemii o 62%. Powyższe wyniki uzyskano jednak jedynie u dzieci, które nie przyjmowały leków przeciwmalarycznych. Kombinacja B zawiera jedynie formę alleliczną 3D7 MSP2. Przełomowe analizy genotypu pasożytów pokazały znaczny wzrost ilości pasożytów z genotypem FC27, przeciwną dimorficzną formą MSP2. Trwają prace nad rozwojem nowej wersji tej szczepionki zawierającej oba warianty MSP2, która będzie skierowana przeciwko pasożytom obu genotypów [21–23].

Podsumowując Kombinacja B dała nadzieję na redukcję ostrych postaci malarii, potwierdza zatem tezę użycia szczepionek podjednostkowych w celu kontrolowania etapu krwinkowego malarii. Szczepionki etapu bezpłciowego należą jak dotąd do najliczniejszych szczepionek przeciwko malarii – obecnie testowanych jest około 15 kombinacji będących kandydatami na szczepionkę etapu krwinkowego [8].

#### **Szczepionki blokujące transmisję**

Szczepionka blokująca transmisję, której celem są antygeny na powierzchni gamet, zygot i ookinet, skierowana jest na płciowe etapy cyklu życiowego pasożyta. Tego typu szczepionka zapobiegałaby rozwojowi sporozoitów w gruczołach ślinowych komarów rodzaju *Anopheles* przez blokowanie transmisji pasożyta wskutek indukcji przeciwciał, które inaktywują gametocyty i przeszkadzają w zapłodnieniu. W przeciwieństwie do szczepionek przeciwko innym stadiom życiowym pasożyta rodzaju *Plasmodium*, przeciwciała powstałe pod wpływem szczepionki blokującej transmisję zabijają pasożyta poza organizmem zaszczepionej osoby. Taka strategia mogłaby być wykorzystywana w kontrolowaniu malarii, z uwagi na szczególną biologię pasożyta rodzaju *Plasmodium*, u którego

indukowanie transmisyjnych i patologicznych form następuje u dwóch różnych żywicieli. Idea szczepionek blokujących transmisję wywodzi się z obserwacji prowadzonych w 1976 roku. Wykazały one, że przeciwciała przeciwko gametocytom ptasiego pasożyta *Plasmodium gallinaceum* zdolne są do zabijania powstających gametocytów w komarze, a nie w ptasim gospodarzu [8,17,24].

#### **Antygeny Pfs25/Pvs25**

Antygen Pfs25 *Plasmodium falciparum* i jego homolog Pvs25 u *Plasmodium vivax* należą do rodziny bogatych w cysteinę, 25 kDa antygenów P25. Składają się one z czterech domen, które są podobne do EGF i występują na powierzchni zygot i dojrziałych ookinet. Prawdopodobnie zakotwiczone są do powierzchni pasożyta za pomocą fragmentu GPI. Ponieważ geny białek P25 ulegają ekspresji jedynie w jelicie środkowym komara i nie ma ich u żadnego innego żywiciela należącego do kręgowców, białka te nie podlegają selekcji ze strony systemu immunologicznego żywiciela [25].

#### **Antygen Pfs48/45**

Powierzchniowe białko makrogamet, które składa się z sześciocysteinowego modułu tworzącego C–koniec, czterocysteinowego modułu stanowiącego centralną część białka, jak również N–terminalnego modułu. Białko to odgrywa kluczową rolę w procesie zapłodnienia i przeciwciała, które skierowane są przeciwko epitopom białka Pfs48/45 zapobiegają zapłodnieniu. Co więcej przeciwciała anty-Pfs48/45 obecne są w surowicy osób z terenów endemicznych i korelują z aktywnością blokującą transmisję. Opracowanie szczepionek opierających się na tym antygenie skupia się na otrzymaniu rekombinowanego białka Pfs48/45 z charakterystycznymi dla niego modyfikacjami posttranslacyjnymi. Badania z użyciem takich szczepionek prowadzone są obecnie na myszach [26,27].

Pozostałe zidentyfikowane antygeny, które są potencjalnymi kandydatami na szczepionkę blokującą transmisję to Pvs28 oraz Pfs230. Jednak żaden z nich oprócz Pvs25 nie wchodzi w skład szczepionki, która awansowałaby do badań klinicznych [8].

#### **Szczepionka Pvs25H**

Opiera się na rekombinowanym białku powierzchniowym ookinet Pvs25 (od 23 do 195 aminokwasów), izolatu Salvador 1 *Plasmodium vivax*. Białko to ulega ekspresji w *Saccharomyces cerevisiae*, zostaje oczyszczone i zaadsorbowane do Alhydrożelu. Badania prowadzone na myszach, królikach i małpach wykazały, że formuła Pvs25 połączona z żelem wodorotlenku aluminium (Alhydro-

żel) indukuje przeciwciała, które blokują rozwój *Plasmodium vivax* w komarach karmionych sztucznie w warunkach ex vivo [28].

Zakończona I faza badań szczepionki wykazała, że jest ona bezpieczna i indukuje przeciwciała, które blokują rozwój pasożyta w komarach. Wyniki te sugerują, że możliwe jest opracowanie skutecznej szczepionki blokującej transmisję [28].

Na uwagę zasługuje również szczepionka SPf66, która była pierwszą chemicznie zsyntetyzowaną, ponad 20 lat temu szczepionką przeciwko malarii. Cząsteczka SPf66 o długości 45 aminokwasów to syntetyczna hybryda złożona z sekwencji aminokwasowej białka merozoitu *Plasmodium falciparum* – pochodnej 3 syntetycznych peptydów oraz powtórzonej sekwencji PNANP sporozoitu, do której C–końca dodane zostały glicyna i cysteina pozwalając tym samym na polimeryzację przez utlenianie. Szczepionka ta zawierała również w swoim składzie Al(OH)<sub>3</sub> pełniące rolę adjuwanta. SPf66 to szczepionka wieloetapowa, skierowana głównie przeciwko etapom bezpłciowym. Po zakończeniu III fazy badań klinicznych zaprzestano jednak dalszych badań nad tą szczepionką z powodu zbyt niskiej skuteczności w działaniu ochronnym wynoszącej 33,6% [29].

### **Perspektywy**

Z uwagi na dużą złożoność zarodźca malarii próby opracowania skutecznej szczepionki podjednostkowej mogą w najbliższych latach ustąpić miejsca ponownej próbie opracowania szczepionek zawierających całego pasożyta – stadium sporozoitu. Duże nadzieje budzą wyniki badań prowadzonych przez Muellera i współpracowników [30]. Według nich poznanie pełnej sekwencji genomu pasożyta daje możliwość bardziej precyzyjnych i ściśle ukierunkowanych manipulacji genetycznych. Zespół Muellera zidentyfikował grupę genów UIS *Plasmodium*, dających swoistą ekspresję w przederytrocytarnym cyklu życiowym pasożyta. Ten sam zespół konstruował następnie pierwszego zarodźca malarii, nie mogącego się rozwijać w wątrobie gospodarza. Było to możliwe przez pozbawienie *Plasmodium berghei* genu UIS3. Gen ten nie odgrywa żadnej roli w cyklu życiowym pasożyta aż do chwili jego dotarcia do wątroby. Mutantowy sporozoit wnika do hepatocytów, ale nie może się dalej rozwijać. Nie dochodzi w ten sposób do fazy krwinkowej i rozwoju choroby. Uodpornienie za pomocą sporozoitów pozbawionych UIS3 zapewniło pełną ochronę my-

szy przed pełnozjadliwymi sporozoitami. W ten sposób wykazana została możliwość opracowania skutecznej i bezpiecznej szczepionki przeciwko malarii, która zawierałaby genetycznie atenuowane całe pasożyty. Taki wniosek wypływa co prawda z badań prowadzonych na myszach jednak zespół Mueller twierdzi, że są one doskonałym modelem eksperymentalnym. Wynika to z faktu, iż UIS3 *P. berghei* gryzoni i UIS3 *P. falciparum* ludzi wykazują w 35% identyczność sekwencji aminokwasowej. Odkrycia te wskazują na nową drogę prac nad szczepionką przeciw malarii [30,31].

Rozwiązanie fundamentalnych pytań dotyczących biologii, struktury genetycznej i mechanizmów unikania odpowiedzi immunologicznej przez *Plasmodium* było ogromnym przełomem w badaniach nad szczepionką. Identyfikacja głównej adhezyny biorącej udział w łożyskowej sekwestracji; produkcja pasożytów, które są żywe i atenuowane poprzez delecję genu; wykrywanie wysokich poziomów odporności indukowanych przez transgeniczne wirusy żółtej febry pozwalają obecnie na rozwój wzajemnie uzupełniających się strategii, które mogłyby ostatecznie prowadzić do produkcji szczepionek nowej generacji [8].

Pierwsza generacja szczepionek przeciw malarii, która trafi na rynek będzie prawdopodobnie użyta do uzupełnienia strategii kontroli wektora i kuracji lekami w celu zmniejszenia zachorowalności i śmiertelności [32].

### Podsumowanie i wnioski

W chwili obecnej najlepiej rokującą szczepionką przeciwko malarii, która zaszła najdalej w badaniach klinicznych jest RTS, S/ASO2A. Szczepionka ta nie jest w pełni skuteczna dlatego też jej efektywność powinna być rozpatrywana z perspektywy spustoszenia, jakie malaria wyrządza na świecie. Zmniejszenie chociaż o 50% liczby zachorowań i zgonów dzięki RTS, S/ASO2A oznaczałoby możliwość zapobiegania śmierci ponad 0,5 miliona osób rocznie. Opracowanie w pełni bezpiecznej, skutecznej i przystępnej cenowo szczepionki przeciwko malarii nadal pozostaje dalekosiężnym planem i wymaga kolejnych lat badań.

### Literatura

[1] WHO & UNICEF 2005. World Malaria Report.  
[2] UNICEF & RBM 2007. Malaria and Children.  
[3] Carter R., Mendis K. N. 2002. Evolutionary and Hi-

storical Aspects of the Burden of Malaria. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 564-594.  
[4] Jaskiewicz E. 2007. Glikoforyny ludzkich erytrocytów jako receptory dla zarodźca sierpowego malarii (*Plasmodium falciparum*). *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 61: 718-724.  
[5] Dubiel O. 2005. Cytoskielet oraz choroby związane z zaburzeniami w jego budowie oraz funkcjonowaniu. <http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/articles/Dubiel04>  
[6] Gołąb J., Stokłosa T., Grzesiowski P., Hryniewicz W., Nowis D. 2007. Odporność przeciwzakaźna. W: *Immunologia*. (Red. J. Gołąb, M. Jakóbsiak, W. Lassek, T. Stokłosa). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa: 321-335.  
[7] Good M. F., Doolan D. L. 1999. Immune effector mechanisms in malaria. *Current Opinion in Immunology* 11: 412-419.  
[8] Sharma S., Pathak S. 2008. Malaria vaccine: a current perspective. *Journal of Vector Borne Diseases* 45: 1-20.  
[9] Mueller A.K., Labaied M., Kappe S.H.I., Matuschewski K. 2005. Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature* 433: 164-167.  
[10] Matuschewski K. 2006. Vaccine development against malaria. *Current Opinion in Immunology* 18: 449-457.  
[11] Coppi A., Pinzon-Oritz C., Hutter C., Sinnis P. 2005. The *Plasmodium* circumsporozoite protein is proteolytically processed during cell invasion. *The Journal of Experimental Medicine* 201: 27-33.  
[12] Girard M.P., Reed Z.H., Friede M., Kieny M.P. 2007. A review of human vaccine research and development: Malaria. *Vaccine* 25: 1567-1580.  
[13] Druilhe P., Barnwell J.W. 2007. Pre-erythrocytic stage malaria vaccines: time for a change in path. *Current Opinion in Microbiology* 10: 371-378.  
[14] Macete E., Aponte J.J., Guinovart C., Sacarlal J., Ofori-Anyinam O., Mandomando I., Espasa M., Bevilacqua C., Leach A., Dubois M.C., Heppner D.G., Tello L., Milman J., Cohen J., Dubovsky F., Tornieporth N., Thompson R., Alonso P. L. 2007. Safety and immunogenicity of the RTS, S/ASO2A candidate malaria vaccine in children aged 1-4 in Mozambique. *Tropical Medicine and International Health* 12: 37-46.  
[15] Alonso P.L., Sacarlal J., Aponte J.J., Leach A., Macete E., Milman J., Mandomando I., Spiessens B., Guinovart C., Espasa M., Bassat Q., Aide P., Ofori-Anyinam O., Navia M.M., Corachan S., Ceuppens M., Dubois M.C., Demoitié M. A., Dubovsky F., Menéndez C., Tornieporth N., Thompson R., Cohel J. 2004. Efficacy of the RTS, S/ASO2A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* 364: 1411-1420.  
[16] Bojang K.A. 2006. RTS, S/ASO2A for malaria.

- Expert Review of Vaccines* 5: 611-615.
- [17] Wipasa J., Elliott S., Xu H., Good M. 2002. Immunity to asexual blood stage malaria and approaches. *Immunology and Cell Biology* 80: 401-414.
- [18] Holder A.A., Guevara J.A., Uthaipibull C., Syed S.E., Ling I.T., Scott-Finnigan T., Blackman M.J. 1999. Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria. *Parassitologia* 41: 409-414.
- [19] Blackman M.J., Heidrich H.G., Donachie S., McBride J.S., Holder A.A. 1990. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion – inhibiting antibodies. *Journal of Experimental Medicine* 172: 379-382.
- [20] Ling I.T., Ogun S.A., Holder A.A. 1995. The combined epidermal growth factor-like modules of *Plasmodium yoelii* Merozoite Surface Protein-1 are required for a protective immune response to the parasite. *Parasite Immunology* 17: 425-433.
- [21] Genton B., Betuela I., Felger I., Al-Yaman F., Anders R.F., Saul A., Rare L., Baisor M., Lorry K., Brown G.V., Pye D., Irving D.O., Smith T.A., Beck H.P., Alpers M. P. 2002. A recombinant blood – stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1–2b trial in Papua New Guinea. *The Journal of Infectious Diseases* 185: 820-827.
- [22] Wykes M., Good M.F. 2007. A case for whole – parasite malaria vaccines. *International Journal for Parasitology* 37: 705-712.
- [23] Flück C., Smith T., Beck H.P., Irion A., Betuela I., Alpers M.P., Anders R., Saul A., Genton B., Felger I. 2004. Strain-specific humoral response to a polymorphic malaria vaccine. *Infection and Immunity* 72: 6300-6305.
- [24] Carter R., Mendis K.N., Miller L.H., Molineaux L., Saul A. 2000. Malaria transmission-blocking vaccines – how can their development be supported? *Nature Medicine* 6: 241-244.
- [25] Miura K., Keister D.B., Muratova O.V., Sattabongkot J., Long C.A., Saul A. 2007. Transmission-blocking activity induced by malaria vaccine candidates Pfs25/Pvs25 is a direct and predictable function of antibody titer. *Malaria Journal* 6: 107.
- [26] Outchkourov N., Vermunt A., Jansen J., Kaan A., Roeffen W., Teelen K., Lasonder E., Braks A., Vegte-Bolmer M., Qiu L.Y., Sauerwein R., Stunnenberg H. G. 2007. Epitope analysis of the malaria surface antigen Pfs48/45 identifies a subdomain that elicits transmission blocking antibodies. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 17148-17156.
- [27] Outchkourov N.S., Roeffen W., Kaan A., Jansen J., Luty A., Schuiffel D., Gemert G.J., Vegte-Bolmer M., Sauerwein R.W., Stunnenberg H. G. 2008. Correctly folded Pfs48/45 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission – blocking immunity in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 4301-4305.
- [28] Malkin E.M., Durbin A.P., Diemert D.J., Sattabongkot J., Wu Y., Miura K., Long C.A., Lambert L., Miles A.P., Wang J., Stowers A., Miller J.H., Saul A. 2005. Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine* 23: 3131-3138.
- [29] Bermudez A., Reyes C., Guzman F., Vanegaz M., Rosas J., Amador R., Rodriguez R., Patarroyo M.A., Patarroyo M. E. 2007. Synthetic vaccine update: Applying lessons learned from recent SPf66 malarial vaccine physicochemical, structural and immunological characterization. *Vaccine* 25: 4487-4501.
- [30] Mueller A.K., Labaied M., Kappe S.H.I., Matuschewski K. 2005. Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature* 433: 164-167.
- [31] Larski Z. 2006. Osiągnięcia w badaniach mechanizmów odporności. *Medycyna Weterynaryjna* 62: 123-126.
- [32] Targett G.A. 2005. Malaria vaccines 1985–2005: a full circle? *Trends in Parasitology* 21: 499-503.

Wpłynęło 20 listopada 2009

Zaakceptowano 18 stycznia 2010