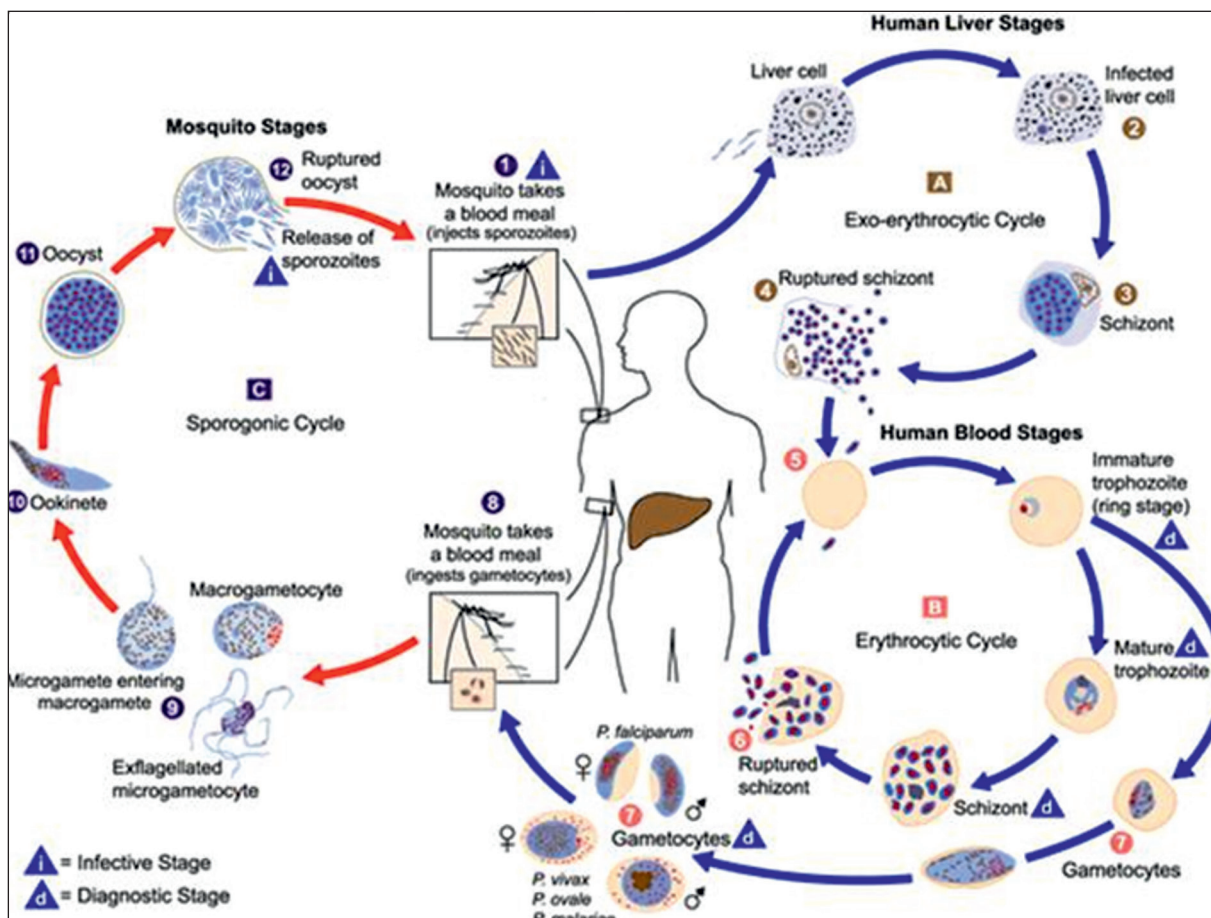


Streszczenie wykładu

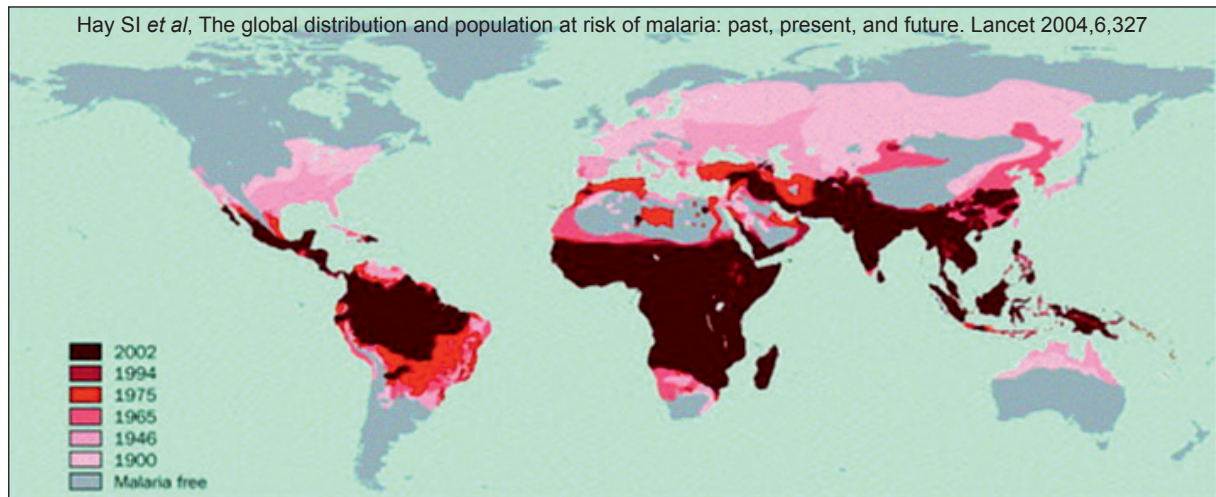
ZAPOBIEGANIE PRZENOSZENIU ZARODŹCÓW MALARII MIĘDZY KOMAREM I CZŁOWIEKIEM – NOWE ROZWIĄZANIA

Malaria, zwana też zimnicą, to najczęstsza na świecie choroba pasożytnicza, na którą co roku zapada ponad 200 milionów osób, a około 1–3 milionów umiera – głównie dzieci poniżej piątego roku życia. Jest ona jedną z najdawniej znanych chorób, której opisy sięgają czasów prehistorycznych – znaleziono je w egipskich papirusach i notatkach Hipokratesa. Nazwa pochodzi od łacińskich słów *mal* – złe i *aria* – powietrze, co związane jest z jej powszechnym występowaniem na niezdrowych, dusznych i bagnistych terenach.

Malarię u człowieka wywołuje zakażenie jednym z czterech gatunków pierwotniaków z rodzaju *Plazmodium*, a mianowicie: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* lub *P. vivax*. Typowymi objawami choroby są napady dreszczy i wysokiej gorączki, a następnie nagły jej spadek (zimnica)



Rys. 1. Cykl życiowy zarodźców malarii (CDC, <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology>).



Rys. 2. Obszary występowania malarii na świecie w latach 1900–2002.

z obfitym poceniem. Towarzyszą temu często bóle głowy, mięśni, znużenie, wymioty i biegunka. Objawy rozpoczynają się po około 10 *P. falciparum* 16 dniach od ukąszenia człowieka przez zakażonego komara i nawracają co dwa, trzy dni, zależnie od gatunku pasożyta. Zakażenie *P. falciparum* przebiega szybko, może doprowadzić do wyjątkowo ciężkich, czasami śmiertelnych powikłań; najwięcej zgonów powoduje w Afryce. Natomiast zakażenie *P. vivax* ma przebieg łagodniejszy, z okresowymi nawrotami powtarzającymi się nawet co kilka lat (relapses), obecnie najczęściej rozpoznawane jest w Azji.

Zarodźce malarii przenoszone są przez samice (nosiciele) z ponad 60 gatunków komarów z rodzaju *Anopheles*. Inwazyjna postać zarodźca, sporozoit, rozpoczyna cykl życiowy w śliniankach komara. Gdy komar ukłuje żywiciela pożywiając się jego krwią, sporozoitów wraz ze śliną komara przenoszone są do jego krwi (Rys. 1). W ciągu kilku godzin przenikają do wątroby, wnikają do hepatocytów, tam namnażają się i tworzą liczne kryptozoity. Następnie dochodzi do inwazji czerwonych krwinek. W krwinkach nadal namnażają się, rosną i prowadzą do ich rozpadu. Z kolei w postaci merozoitów atakują kolejne krwinki w charakterystycznych odstępach czasu, co objawia się typowymi dla choroby nawrotami gorączki i dreszczy. Część merozoitów przekształca się w żeńskie i męskie gametocyty, które połknięte przez komara wraz z wysaną krwią, przenoszą się do jego układu pokarmowego, tam przekształcają się w gamety i rozmnażają płciowo. Powstałe zygoty przenikają przez ścianę jelita, wędrują do gruczołów ślinowych komara, tworzą sporozoitów, zamykają w ten sposób cykl i są gotowe do kolejnego zakażenia człowieka.

Intensywna kampania walki z malarią rozpoczęta w latach 50. XX wieku przez Światową Organizację Zdrowia (WHO), polegająca na powszechnym użyciu insektycydów i nowo opracowanych leków, takich jak chlorochina i jej pochodne, doprowadziła do drastycznego spadku zachorowań, głównie w rejonach stref umiarkowanych. W Polsce malaria występowała endemicznie w XIX wieku. W 1921 roku stwierdzono ponad 52 tysiące zachorowań wywołanych głównie przez *P. vivax*, co zapoczątkowało akcję zwalczania malarii w Polsce. Od 1956 roku notowano tylko sporadyczne zachorowania, a w 1968 roku WHO uznało Polskę za kraj wolny od tej choroby.

Jednakże mimo sukcesu zwalczania malarii w krajach europejskich i północno-amerykańskich, choroba ta wciąż powszechnie występuje w ponad stu krajach strefy tropikalnej i subtropikalnej (Rys. 2), a częstość zakażeń w latach 1970–1997 na obszarach Sahary wzrosła o około

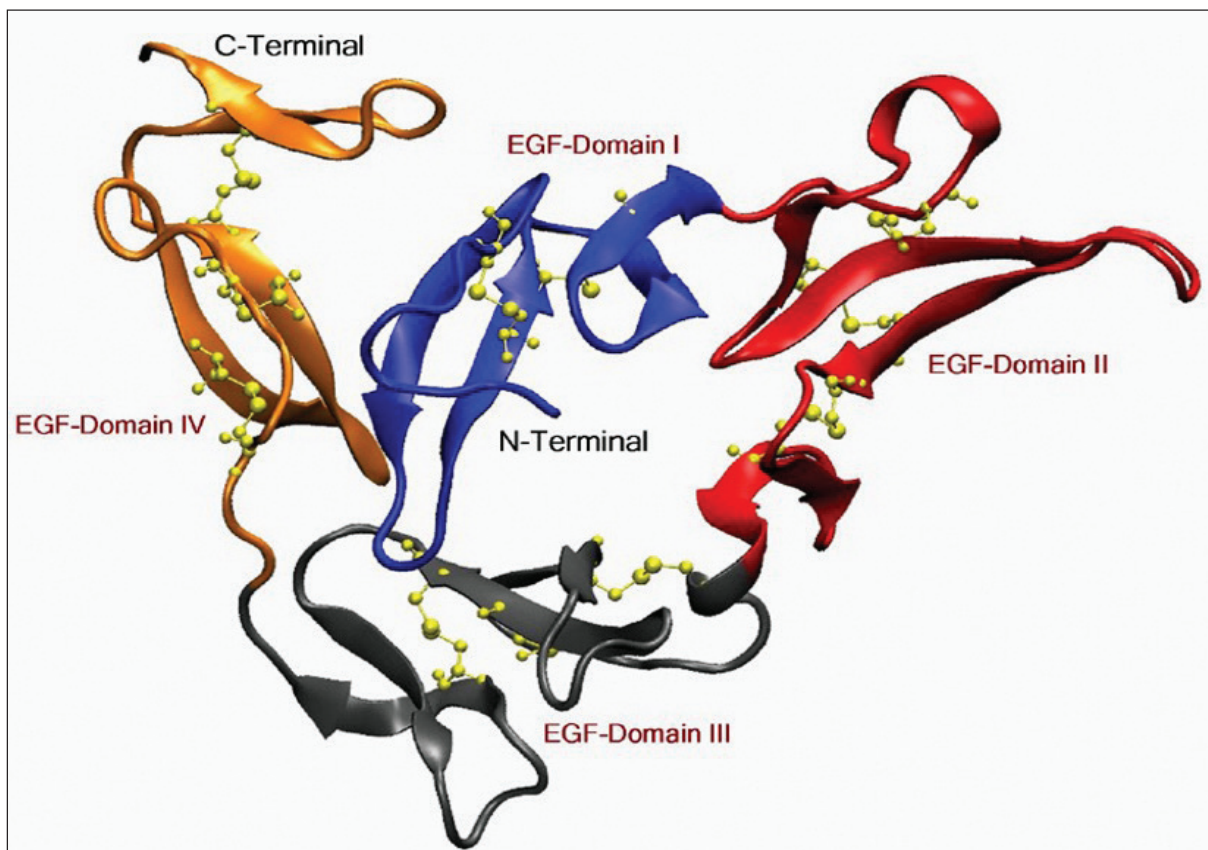
40%. Przyczyną tego stanu jest nie tylko niski poziom rozwoju ekonomicznego w tych regionach, lecz także pojawienie się komarów opornych na środki owadobójcze, jak i zarodźców opornych na stosowane leki. W związku z tym wiele organizacji na całym świecie próbuje zdobyć fundusze potrzebne do walki z malarią. Jednym z programów realizowanych w USA jest tzw. President's Malaria Initiative (PMI) zainicjowany przez prezydenta Busha w 2005 roku, której celem było przeznaczenie ponad biliona dolarów na zredukowanie śmiertelności na malarię o połowę w 19 krajach Afryki. W 2009 roku prezydent Obama przyłączył PMI do U.S. Global Health Initiative, przeznaczając w ramach tego programu ponad 50 bilionów dolarów na kolejne sześć lat na walkę z chorobami zakaźnymi, takimi jak AIDS, malaria i gruźlica.

Najlepszą metodą walki z zakażeniami jest zapobieganie im. W przypadku malarii obejmuje ono zarówno osuszanie bagien, zakładanie moskitier na okna, opryskiwanie pomieszczeń środkami owadobójczymi, ułatwienie dostępu do testów diagnostycznych i profilaktykę farmakologiczną, ale także badania nad wynalezieniem skutecznej szczepionki.

Badania nad szczepionką przeciw malarii rozpoczęto w latach 60. i 70. ubiegłego wieku, kiedy to naukowcy wykazali, że szczepienie zarodźcami osłabionymi przez naświetlanie ich promieniami rentgenowskimi, skutecznie chroni przed zakażeniem. Jednocześnie ochronę przed nim można było uzyskać poprzez ekspozycję ochotników na ukąszenie napromieniowanymi komarami. W tym przypadku pokazano, że sporozycyty dostają się do ich wątroby, ale nie są w stanie atakować czerwonych krwinek i wywoływać objawów choroby. Niestety produkcja takich osłabionych szczepów na większą skalę i ich komercjalizacja jako szczepionki, nie była do tej pory możliwa, choć pomysł ten nie został całkowicie zarzucony.

Obecne badania na szczepionką przeciw malarii wspomagane są przez ogólnoswiatowy program: PATH Malaria Vaccine Initiative, rozpoczęty w 1999 roku przez fundację Billa Gatesa, któremu przyświeca wizja: świat wolny od malarii. Wiele projektów poświęconych jest zdefiniowaniu pojedynczych antygenów powierzchniowych różnych faz rozwoju zarodźców poprzez: (1) indukcję przeciwciał skierowanych na antygeny powierzchniowe sporozycytów, które będą chronić przed inwazją hepatocytów przez zarodźca; (2) przeciwciał zapobiegających rozwojowi zarodźca w wątrobie; (3) przeciwciał blokujących inwazję erytrocytów; (4) przeciwciał blokujących transmisję zarodźca przez komara. Obecnie ponad 20 projektów na szczepionki przeciwmalaryczne poddanych jest testom klinicznym w ramach Fazy I i II badań, ale tylko jeden z nich jest w Fazie III. Ten ostatni to rekombinowany antygen RTS,S/AS01, ekspresjonowany w *Saccharomyces cerevisiae*, produkowany przez firmę GlaxoSmithKline, który – jak ogłoszono w 2013 roku – w ciągu półtorarocznej próby klinicznej, zmniejszył o około 50% ryzyko zachorowań na malarię dzieci pomiędzy 5. a 17. miesiącem życia i o około 30% u niemowlaków zaszczepionych pomiędzy 6. a 12. tygodniem życia. Preparat ten to hybryda zawierająca fragmenty białka powierzchniowego sporozycytów *P. falciparum*, połączona z antygenem powierzchniowym wirusa zapalenia wątroby, podawana z liposomowym adjuwantem AS01. Choć efektywność tej szczepionki nie jest zadowalająca, jak dotąd nie znaleziono lepszego rozwiązania.

Nasze badania prowadzone w National Institute of Child Health and Human Development we współpracy z National Institute of Allergy and Infectious Disease poświęcone były wynalezieniu szczepionki, która hamowałaby rozwój pasożytów w organizmie komara. Niektórzy nazywają taką szczepionkę altruistyczną, gdyż nie chroni ona bezpośrednio zaszczepionej osoby przed zakażeniem, ale indukuje odporność blokującą przenoszenie zarodźca z komara na kolejnego człowieka. Jednym z rozważanych kandydatów na taką szczepionkę jest antygen białka powierzchniowego Pfs25 (*P. falciparum* surface protein).

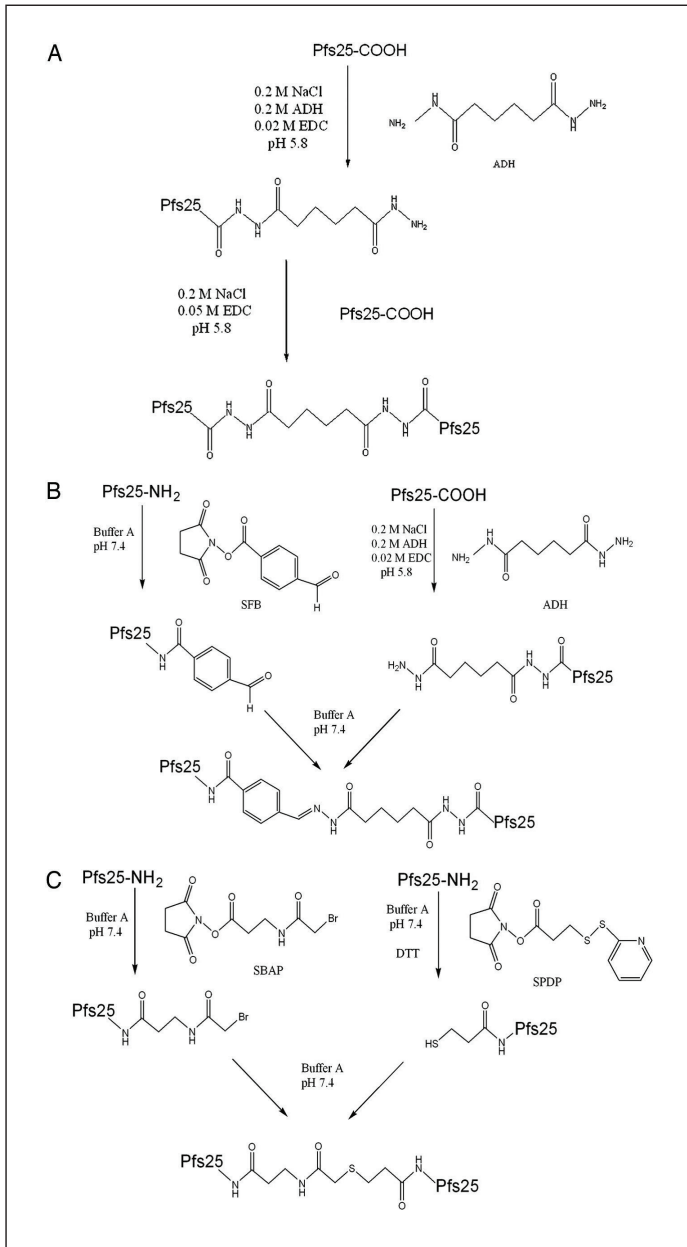


Rys. 3. Model antygeny Pfs25 zawierającego cztery domeny podobne do epidermalnego czynnika wzrostu EGF (Sharma, *In Silico Biol.* 2008, 8,193).

Białko Pfs25 ekspresjonowane jest w fazie rozwoju płciowego pierwotniaka i obecne na powierzchni zygot, ookinet i we wczesnej fazie rozwoju oocyst. Pokrywa ono niemalże całą powierzchnię ookinet i jest niezbędne do ich przeżycia w jelicie komara. Zbudowane jest z czterech domen przypominających epidermalny czynnik wzrostu EGF, uczestniczących w interakcjach z komórkami gospodarza. Antygen ten charakteryzuje się dużą konserwatywnością, gdyż nie jest wykrywalny w fazie rozwoju bezpłciowego w ciele człowieka i nie podlega selekcji immunologicznej. Użycie go jako składnika szczepionki ma na celu wytworzenie przeciwciał, które pobrane przez komara w czasie ukłucia, zapobiegają rozwojowi oocyst w jego ciele poprzez blokowanie możliwości poruszania się w jelicie.

Pierwszym krokiem do użycia Pfs25 jako szczepionki było otrzymanie w laboratorium prowadzonym przez doktora Louisa Millera (NIAID) rekombinowanego białka ekspresowanego w drożdżach *Pichnia pastoris* w dużej ilości i w biologicznej aktywnej formie. Pfs25 jednak, będący małą cząsteczką, ok. 21 kDa, podany sam lub w zawieszynie z adjuwantem okazał się słabym immunogenem zarówno u zwierząt, jak i u ludzi.

Jednakże jego budowa, cztery powtarzające się domeny EGF, przypominała nam budowę polisacharydów zbudowanych z powtarzających się podjednostek. W związku z tym zaproponowaliśmy strategię, której używaliśmy do przygotowania glikokoniugowanych szczepionek, a mianowicie skoniugowania Pfs25 z innym białkiem, jak i do siebie samego, w celu zwiększenia jego masy i immunogenności. Testowaliśmy różne metody koniugacji w celu uzyskania maksymalnej wydajności i powtarzalności. Kilka przykładów pokazanych jest na Rys. 4. W każdym przypadku eksperymentu przeprowadzanego na myszach uzyskaliśmy ponad tysiąc razy wyższy



Rys. 4. Koniugacja Pfs25 poprzez wiązania amidowe (A), hydrazonowe (B) i tioeterowe (C).

Efektom badań nad nowym typem szczepionek przeciwmalarycznych blokujących transmisję było ogłoszenie w grudniu 2011 rok współpracy trzech największych liderów w dziedzinie prewencji malarii: PATH Malaria Vaccine Initiative, National Institute of Allergy and Infectious Disease and Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health Center for Immunization Research dotyczącej przeprowadzenia pierwszej próby klinicznej nowej szczepionki koniugatowej blokującej transmisję, mającej na celu określenie jej bezpieczeństwa i immunogenności u zdrowych ochotników.

poziom przeciwciał niż podając nieskoniugowany preparat, nie używając adjuwantu i szczepiąc podskórnie 3 razy, co dwa tygodnie, dawką 2,5µg Pfs25/mysz.

Najlepszą metodą według nas okazało się łączenie Pfs25 do siebie wiązaniem amidowym. Taki koniugat był prosty do przygotowania i zawierał mieszaninę połączonych ze sobą 2–10 cząsteczek (50–250 kDa), które można było scharakteryzować za pomocą elektroforezy SDS-PAGE i spektrometrii MALDI-TOF. Koniugaty o wyższej masie cząsteczkowej, przygotowane przy użyciu np. wiązań tioeterowych, były trudniejsze do scharakteryzowania i mniej immunogenne. Koniugowanie Pfs25 do innego białka przyniosło podobne rezultaty, ale ich przygotowanie i ocena (np. określenie proporcji nośnika do antygeny) okazały się bardziej skomplikowane. Jednym z najbardziej zaskakujących wyników był fakt, że poziomy przeciwciał zamiast spadać z czasem, co jest cechą obecnie testowanych szczepionek przeciwmalarycznych, rosły aż do siedmiu miesięcy po ostatnim szczepieniu. Taki wynik rokuje wysoką skuteczność szczepionki. W teście blokowania rozwoju oocyst (transmission-blocking activity) surowice myszy wykazały 100% skuteczności.



EMBARGOED FOR RELEASE UNTIL 1700 HOURS GMT // 12:00 NOON EASTERN TIME
ON TUESDAY, DECEMBER 6, 2011

Advancing the development of a malaria transmission-blocking vaccine

*PATH Malaria Vaccine Initiative announces collaboration with the
National Institute of Allergy and Infectious Diseases and the
Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health*

“This is the first clinical trial supported by MVI to use a transmission-blocking approach,” said Ashley Birkett, PhD, director of research and development at MVI. “This is the first step in what is typically a long process of evaluation. Nonetheless, we are excited by the potential of TBVs to significantly limit the spread of malaria infection. Eradication of malaria may be decades away, but we believe a successful TBV—used alongside safe and effective drugs, insecticides, bednets, and possibly a malaria vaccine that protects the individual against infection and disease – would be essential to achieving that goal.”