

DOI:10.13350/j.cjpb.221024

• 综述 •

疟疾传播阻断疫苗的研究进展*

王姗姗¹, 赵龙玉², 全芯², 薛庆节², 谭文彬², 李士根², 杜峰^{2**}

(1. 济宁医学院精准医学研究院, 山东济宁 272067; 2. 济宁医学院基础医学院病原生物学教研室)

【摘要】 疟疾是经按蚊叮咬或输入带疟原虫者的血液而感染疟原虫所引起的虫媒传染病。蚊虫易被疟原虫感染并传播病原体是消除疟疾面临的一个巨大挑战。疟疾传播阻断疫苗旨在阻断疟原虫在蚊体内的生活史过程, 免除蚊的感染, 从而阻止疟疾传播。与其他防控策略联合使用, 有望促进流行区疟疾的消除乃至根除。本文综述了疟疾传播阻断疫苗的研究进展, 并对传播阻断免疫进行概述, 以期对疟疾传播阻断疫苗的研制提供理论参考。

【关键词】 疟疾; 传播阻断疫苗; 配子体; 免疫; 综述

【中图分类号】 R531.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)10-1229-08

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Oct.; 17(10):1229-1236.]

Progress of research on malaria transmission blocking vaccines

WANG Shan-shan¹, ZHAO Long-yu², QUAN Xin², XUE Qing-jie², TAN Wen-bin², LI Shi-gen², DU Feng² (1. Department of Pathology, Institute of Precise on Medicine, Jining Medical University, Jining, Shandong 272067, China; 2. Department of Pathogenic Biology, Jining Medical University)

【Abstract】 Malaria is the deadliest insect-borne disease caused by *Plasmodium* parasites, which are spread to people through the bites of infected female *Anopheles* mosquitoes. The efficient spread of malaria from infected humans to mosquitoes is a major challenge for malaria elimination initiatives. Malaria transmission blocking vaccines (TBVs) target *Plasmodium* stages that transmit between human and mosquitos in order to interrupt the parasite's life cycle and reduce spread. Combined with other prevention and control strategies, TBVs could contribute to malaria elimination from affected communities and malaria eradication worldwide. This article reviews the recent developments in TBVs and the transmission-blocking immunity in order to provide a theoretical reference to the development of TBVs.

【Key words】 malaria; transmission blocking vaccines (TBVs); gametocyte; immunity; review

***疟疾是威胁人类生命的重要传染性疾病, 病原体疟原虫通过雌性按蚊传播。与艾滋病、结核病并称为世界三大主要公共健康威胁。可致人类感染的疟原虫共有 5 种, 其中恶性疟原虫和间日疟原虫危害最大。恶性疟原虫具致命性, 在非洲较为流行; 间日疟原虫是撒哈拉以南非洲之外大多数国家的主要流行虫种。疟疾可防可治, 但据 WHO《2021 年世界疟疾报告》, 2020 年全球疟疾的新发病例约为 2.41 亿例, 死亡人数约为 62.7 万人^[1], 且随着疟原虫耐药和蚊虫抗药问题的加剧, 疟疾的防控任务艰巨。加之当下全球新冠肺炎的大流行, 使疟疾的防控变得更加复杂。我国自 2017 年以来, 无本土原发感染疟疾病例, 现已获得 WHO 消除疟疾认证, 可每年均有输入性病例的存在, 在新型冠状病毒肺炎流行的 2020 年, 非必要不出行的情形下, 全国 31 省(直辖市、自治区, 不含台湾、香港和澳门地区)仍有输入性病例 1 085 例^[2]。而随着到国外务工、经营、旅游、求学及我国援非活动增多, 使我国的疟疾防控任务仍十分艰巨。疟原虫借蚊虫高效的传播是疟疾防控的巨大挑战。传播阻断疫苗(transmission blocking vaccines, TBVs)针对蚊体内配子发生、雌雄性配子受精、合子形成及动合子穿透蚊中肠上皮细胞等有性期发育(图 1), 产生阻止蚊体内疟原虫配子生殖的免疫反应。TBVs 虽然不能阻止受试者被感染, 但能阻断疟疾的传播, 亦可防止感染者将疾病带到非流行区或带回本土造成流行。TBVs 的研制将对全球疟疾的防控和我国疟疾消除

后的巩固及下一步的根除具有重要意义。

疟原虫的生活史需经历人体和雌性按蚊体内的两个发育阶段。在人体内, 先后在肝细胞和红细胞内寄生, 进行无性裂体生殖, 并有小部分寄生于红细胞内的疟原虫分化为雌雄配子体。恶性疟原虫配子体的形成时间约需 10~12 d, 经历 I-V 期的形态变化, 未成熟的 I-IV 期配子体一般在骨髓、脾脏等内部器官中发育^[3], 至成熟的 V 期配子体被释放于外周血。间日疟原虫配子体的发育明显快于恶性疟原虫, 发育至成熟仅约需 48 h, 亦可能存在骨髓期的器官内发育^[4]。成熟的配子体与红内期的无性阶段疟原虫一样, 寄生在宿主的红细胞内, 恶性疟原虫成熟配子体形似新月, 间日疟原虫成熟配子体呈圆形, 当其随吸血进入蚊中肠后, 在温度下降、pH 升高及黄嘌呤酸等因素的刺激下^[5], 雌配子体发育为雌配子, 雄配子体出丝发育

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 82101867); 济宁医学院贺林院士新医学临床转化工作站科研基金项目(No. JYHL2018MS18); 济宁医学院青年教师科研扶持基金项目(No. JYFC2018KJ030)。

** **【通讯作者】** 杜峰, E-mail: hurryman@126.com

【作者简介】 王姗姗(1984-), 女, 山东泰安人, 博士, 讲师, 主要研究方向为精准治疗靶点的筛选及应用。

E-mail: shuijing9020@aliyun.com

为雄配子,雌雄配子受精后形成合子,再转化为动合子,穿过按蚊中肠壁上皮细胞或其间隙,在中肠壁弹性纤维膜下形成卵囊,最终经孢子生殖产生数以万计的对人体具有感染性的子孢子(图1)。针对蚊中肠内疟原虫表面蛋白的抗体可以阻断这种传播周期,由此产生了疟疾 TBVs 的开发,并已有了一些疫苗进入了临床试验阶段。本研究回顾主要的疟疾 TBV 候选抗原及其目前的研究进展,归纳新型疟疾 TBV 候选抗原的研究思路,简述疟疾 TBV 相关的免疫。以期为疟疾 TBVs 的研究提供参考。

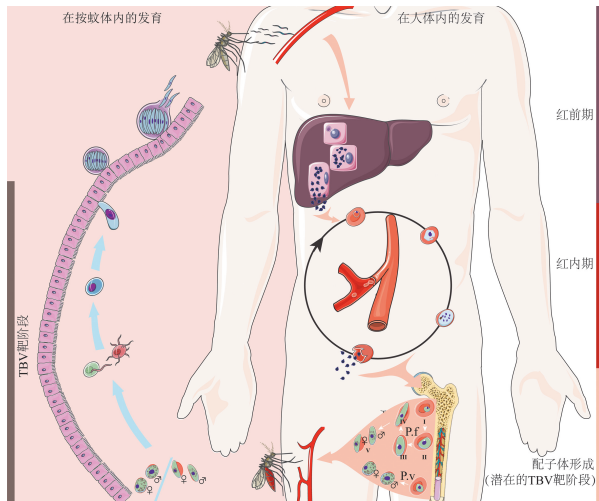


图1 疟原虫生活史及 TBVs 的靶阶段

Fig. 1 Life cycle of the malaria parasite and target stages of TBVs

1 传播阻断疫苗候选抗原

针对蚊体内疟原虫有性生活史阶段,传播阻断疫苗候选抗原可分为两大类。一类是红细胞内配子体表面已表达的抗原。疟原虫雌雄配子细胞在蚊虫吸血后的数分钟内就从红细胞中释出,其细胞膜上存在的所有蛋白暴露于血餐的组分,包括抗体和补体等,它们在蚊中肠中仍具活性^[6]。P48/45 和 P230 具特征的配子体细胞表面蛋白,抗这类抗原的抗体通过中和或凝集作用及补体介导的溶细胞作用等,抑制配子融合受精和合子形成。另一类是配子进入蚊中肠后表达的表面抗原及受精后合子和动合子的表面抗原。蚊中肠环境触发了此期疟原虫相关抗原的表达,包括细胞质中存储的表面蛋白 mRNA 的翻译,如 P25^[7]。与 P230 和 P48/45 不同,这些疟原虫有性阶段特异性蛋白不会暴露于人类宿主的免疫系统,因此,预计不会自然获得抗体,但可以通过疫苗接种诱导。靶向这些有性阶段疟原虫表面抗原的抗体可抑制或阻断蚊内疟原虫生活史周期的完成,从而减少甚至阻断传播^[8]。此外靶向蚊中肠抗原的抗体,如抗按蚊氨基肽酶 N (Anopheline alanyl aminopeptidase N, AnAPN1)、羧肽酶 B (carboxypeptidase B, CPB) 和纤维蛋白原相关蛋白 1 (fibrinogen-related protein 1, FREP1) 的抗体,可显著减少恶性疟原虫和间日疟原虫在蚊中肠的卵囊数^[9-11]。

针对人体内配子体形成全过程,表达在红细胞表面的配子体蛋白可能是另一类传播阻断靶抗原^[12]。红细胞内无性阶段疟原虫向其表面输出蛋白质,但红细胞表面配子体特异性蛋白的研究结论仍不明确,预示着鉴定新型候选疫苗的机会。

1.1 P48/45 P48/45 属于 6-半胱氨酸(6-Cys)蛋白家族,通

过糖磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)锚定于疟原虫配子体及配子细胞表面,与 P230 形成稳定的复合物,在雄配子的受精过程中发挥重要作用。最初使用配子体及配子免疫小鼠获取的传播阻断单克隆抗体识别出 P48/45^[13-14],来自流行区疟疾感染者的血清亦可与 P48/45 蛋白发生血清学反应^[15]。基因敲除 P48/45 的恶性疟原虫和伯氏疟原虫雄配子不能粘附并穿入雌配子,导致卵囊数量的显著减少^[16]。恶性疟原虫 P48/45(Pfs48/45)由 448 个氨基酸组成,分子质量约为 51 ku,其特异性单克隆抗体在标准膜饲实验(standard membrane feeding assay, SMFA)中表现出传播阻断效应,以 MAb45.1 效能最强^[17],与其他候选抗原的单克隆抗体相比,实现完全阻断的所需抗体浓度最低。Pfs48/45 可以引发特异性免疫反应,来自免疫动物的血清可阻断疟原虫蚊体内的发育过程^[8]。从自然感染人体内提取的抗 pfs48/45 的抗体亦具有传播阻断功能^[18],且血清中抗 pfs48/45 抗体滴度与疟疾传播阻断效能呈正相关^[19],表明 P48/45 可以激发人体的特异性体液免疫反应,并可通过再次接种或感染而加强免疫,是传播阻断疫苗研发的潜力抗原^[18]。P48/45 疫苗的研制一直受限在正确空间结构蛋白的表达上,P48/45 含有 3 个结构域,每个结构域都含有保守的半胱氨酸(图 2),不适合的糖基化和不正确的二硫键使表达的蛋白不具有有效的传播阻断抗原表位。而利用单克隆抗体识别出最具传播阻断效应的位于 C 端 10-半胱氨酸结构域(10C)内的抗原表位 I^[20],在一定程度上推进了 P48/45 疫苗的研制。乳酸球菌的表达体系在 Pfs48/45 重组亚单位疫苗的表达上做出了很大的突破,并将 10C 截短为含有 C 端 6 个半胱氨酸的结构域(6C),在不破坏抗原表位 I 的同时增加表达量。研究者是将 Pfs48/45 的 6C 与恶性疟原虫的富含谷氨酸蛋白(glutamate-rich protein, GLURP)的 N 端非重复区(R0)组成融合蛋白(R0. 6C),使 6C 在表达系统内能形成正确的折叠。R0. 6C 易纯化获取,可被 MAb45.1 识别,免疫啮齿动物能引发有效的体液免疫反应,制备达到美国药品生产质量管理规范(cGMP)和临床试验的要求^[21-22]。杆状病毒的表达系统亦是 6C 表达的可选方案,其可表达出大小、电荷、构象、二硫键均正确的无糖基化非融合蛋白^[23]。全长的 Pfs48/45 还可在昆虫细胞(果蝇 S2 细胞)内被正确折叠的高产量表达,免疫小鼠可获得传播阻断抗体^[24]。

间日疟原虫红内期的体外培养仍不成熟,不易获取配子体,在一定程度上限制了间日疟原虫 TBVs 的研究与评估。Pvs48/45 重组蛋白的表达与 Pfs48/45 一样,具有挑战。使用含有 Pvs48/45 全长的 DNA 疫苗可以克服蛋白折叠的问题,诱导的抗体能够减少蚊中肠卵囊数量^[25]。除此之外,使用大肠埃希菌和中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞表达的重组 Pvs48/45 均可在小鼠体内诱导传播阻断型抗体,并以 CHO 细胞表达的重组 Pvs48/45 配伍由矿物油和甘露醇单油酸盐家族表面活性剂组成的油包水佐剂 Montanide ISA-51 表现出最佳的实验结果,抗体滴度高维持时间长^[26]。目前,基于 Pvs48/45 C 末端 6-Cys 结构域的疫苗研究鲜有报道。

1.2 P230 P230 也属于 6-Cys 结构域蛋白家族,通过与 P48/45 的相互作用保留在疟原虫细胞膜表面,对雄性配子体出丝中心的形成至关重要。恶性疟原虫 P230(Pfs230)含有 3135 个氨基酸的蛋白质,分子质量约 363 ku,当配子从红细胞释出时,其

前端的 442 个氨基酸区段被切除,截短至 300 ku^[27]。Pfs230 最初与 Pfs48/45 一同被识别出来,自然感染的患者血清亦可与其发生血清学反应。Pfs48/45 基因敲除后,Pfs230 的生成不受影响,但不能定位在配子表面。Pfs230 基因敲除后,雄配子体仍可以出丝,但不能结合未感染的红细胞形成出丝中心,感染蚊虫后卵囊的形成数量明显减少^[28]。Pfs230 包含 14 个 6-Cys 结构域,每个结构域包含 4~6 个半胱氨酸残基(图 2),这些众多的半胱氨酸残基使得表达正确折叠的可溶性全长蛋白质极具困难。Williamson 等表达的含有氨基酸 443-1132 区段的麦芽糖结合蛋白融合抗原可免疫小鼠产生传播阻断型抗体^[29],此区段包含蛋白酶切后的 N 端非 6-Cys 结构域区段和前 3 个 6-Cys 结构域。此后,Pfs230^{443-1132aa} 的相关区段已在毕赤酵母、无细胞麦胚芽表达系统、植物及杆状病毒等表达系统获得成功表达^[30]。重组表达的 N 端首位 6-Cys 结构域抗原 Pfs230D1M(542-736 aa)也能免疫动物诱导传播阻断型抗体,展现出后续疫苗研发的价值^[31]。并且使用具有传播阻断效应的抗体鉴定出 Pfs230 的功能性抗原表位主要位于氨基酸 443-730 区域^[32]。毕氏酵母表达的 Pfs230D1M 与铜绿假单胞菌去毒的外毒素 A(Exoprotein A,EPA)偶联,可制备成生物纳米颗粒,增加靶抗原的免疫原性,并且配伍佐剂铝胶(Alhydrogel)的疫苗制剂已完成了 I 期临床试验(NCT02334462),因其含有补体参与的传播阻断效能,阻断效果优于 Pfs25^[33]。Pfs230D1M-EPA 配伍脂质体佐剂 AS01 的 I 期临床试验刚刚完成,相比配伍佐剂 Alhydrogel,可诱导更高的抗体滴度,维持的时间亦更长(NCT02942277),现已准备在马里开展 2 期临床试验(NCT03917654)。Pfs230D1M-EPA 配伍基于皂苷的佐剂 Matrix-M 的疫苗制剂正在开展 I 期临床试验(NCT05135273),因 Matrix-M 可诱导细胞和体液免疫反应,并能延长免疫反应的持续时间^[34],具有临床转化的前景。Pfs230D1M 与脑膜炎奈瑟菌的外膜蛋白复合物(Outer Membrane Protein Complex, OMPC)偶联后,免疫原性也可被加强,与偶联 EPA 相比,诱导的抗体水平更高,其中较高水平的 IgG2 将更有利于发挥补体的功能^[35]。

间日疟原虫的 Pvs230 是 Pfs230 的同源蛋白质,含有结构域 I~IV(CRDI-IV)的 DNA 疫苗免疫小鼠可以诱导传播阻断型抗体,免疫血清可显著减少蚊中肠卵囊的数量,并且不依赖补体^[36]。Pfs230D1M 的同源区 Pvs230 D1M 已在毕赤酵母中成功表达,并可被间日疟原虫感染者的血清识别^[37],但其免疫动物获取抗体的传播阻断实验和利用它亲和纯化感染者血清抗 Pvs230 抗体进行阻断效果评价的实验尚未开展。

1.3 P47 P47 也属于 6-Cys 结构域蛋白家族,其基因与 P48/45 基因旁系同源,亦是 GPI 锚定蛋白,定位在疟原虫雌配子体、雌配子、合子和动合子表面^[38]。P47 可介导伯氏疟原虫和恶性疟原虫在蚊体内的免疫逃逸^[39]。蚊中肠上皮细胞在动合子入侵时造成其不可逆损伤,激活 JNK(c-Jun N-terminal Kinases)途径调节的两步硝化反应,继而激发蚊血细胞微囊泡释放,活化蚊补体样系统。含硫脂蛋白 1(thioester-containing protein 1,TEP1)是脊椎动物补体 C3 因子的同系物,存在于血淋巴中,为蚊补体样系统的关键因子,与动合子表面结合后触发形成复合体,最终杀死疟原虫^[40]。恶性疟原虫 P47(Pfs47)可干扰动合子入侵时中肠细胞的 JNK 信号,抑制硝化反应和

后续 TEP-1 介导的杀伤作用^[41-42]。P47 对伯氏疟原虫雌配子受精也起重要作用^[43],但恶性疟原虫其基因敲除后并不影响受精^[38],这点功能的不同可能与有限的保守序列有关。Pfs47 具有信号肽、GPI 锚定序列和 3 个 6-Cys 结构域,其中第 2 个结构域是仅含 2 个半胱氨酸的退化结构域(图 2)。大肠埃希菌硫氧还蛋白融合表达系统表达的可溶性 Pfs47 融合蛋白(T-Pfs47)具有免疫原性,但用其获得的多克隆抗体和单克隆抗体均未表现出传播阻断的效能,Pfs47 全长抗原诱导的抗体主要靶向第 1 和 3 结构域,而靶向第 2 结构域中央区段抗原(178-229aa)的抗体表现出显著的阻断传播效能^[44]。Pfs47 具有显著的地理结构差异,这与蚊体内免疫压力下的自然选择和疟原虫适应不同区域相应蚊媒宿主一致^[40],但是最具候选疫苗价值的 52 个氨基酸的抗原区段相对保守,现有 7 个不同的单倍体型,氨基酸序列同源性在 96%-98%^[44]。在间日疟原虫方面,基于 Pvs47 的 DNA 疫苗免疫小鼠后的血清可以识别天然构象蛋白质,免疫血清可以减少蚊中肠卵囊数量,并且 Pvs47 在来自 3 个地区的 27 株间日疟原虫分离株中表现出有限的氨基酸多态性^[25]。P47 对疟疾传播的重要性值得进一步研究,明确它的受体和破坏 JNK 信号的机制,评估其作为阻断疟疾传播目标的可行性。

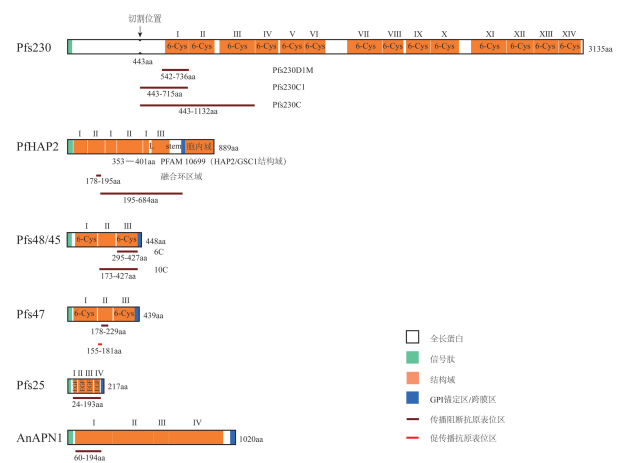


图 2 本文所述 TBV 抗原的结构域示意图
Fig. 2 Schematic domain organization of all TBV antigens described in this article

1.4 P25 P25 属于 P25 蛋白家族,具有 4 个串联的表皮生长因子样结构域,N 端含有信号肽,C 端含有 GPI 锚定序列(图 2),其雌配子体内的转录本主要在合子、动合子阶段翻译,蛋白表达在成熟的动合子时达峰值,并直到卵囊时期^[13]。它可以与蚊中肠上皮细胞层粘连蛋白结合,形成受体/配体复合物,调节疟原虫的发育^[45]。其可能还具有保护疟原虫免受蚊中肠蛋白水解酶和蚊免疫系统伤害的作用,并对动合子穿过蚊中肠上皮及动合子向卵囊的转化具有重要作用^[46]。基因敲除伯氏疟原虫 P25 基因可部分抑制斯氏按蚊的疟疾传播,而 P25 和 P28 双基因敲除几乎可完全阻断传播^[47]。这些实验均表明 P25 对疟原虫的有性阶段发育非常重要,并且它在疟原虫人体发育期不表达,不受人体免疫压力的选择,抗原序列相对保守^[48],使得其在传播阻断疫苗研究上极具吸引力并处于领先地位。自编码恶性疟原虫 P25(Pfs25)的病毒载体疫苗实现成功表达正确折叠蛋白后^[49],使用酵母、植物及藻类等的 Pfs25 和 Pvs25

重组表达均获成功^[7,50]。但因 P25 较弱的免疫原性和配伍佐剂引起的受试者不良反应限制了其快速的临床转化^[51]。为了克服这些问题,将 EPA 与 P25 偶联,增强免疫原性,并配伍 Al-hydrogel 佐剂进行了 I 期临床试验,结果表明 Pfs25-EPA/Al-hydrogel 肌肉注射具有良好的耐受性和安全性,可以诱导无疟疾接触者和流行区受试者传播阻断型抗体的产生,使用免疫血清的 SMFA 实验观察到显著的传播阻断效能,但直接皮饲试验(direct skin feeding, DSF)未能观察到。尽管偶联了免疫原性增强因子 EPA,仍需要 4 次疫苗接种才可获得 SMFA 实验表现出阻断效能的血清,且抗 Pfs25 的抗体滴度在免疫后迅速降低^[52]。Pfs25 的病毒载体疫苗(Pfs25-IMX313)和植物来源的病毒样颗粒疫苗(Pfs25 VLP-FhCMB)的 I 期临床试验亦存在类似的结果,疫苗可诱导受试者产生免疫反应,但却不具有显著的传播阻断效能^[53-54]。与接种 Pfs25-IMX313 小鼠的免疫反应比较,发现较差的 CD4⁺ T 细胞免疫原性限制了人体对疟原虫传播阻断候选抗原 Pfs25 的体液免疫^[55]。目前,配伍佐剂 AS01 的 Pfs25M-EPA 疫苗已完成 I 期临床试验,鲜有结果分析的文献报道(NCT02942277),配伍佐剂 Matrix-M 的 Pfs25-IMX313 疫苗正进行 I b 期临床试验,将检测疫苗在疟疾流行区坦桑尼亚成人和儿童接种后的安全性、免疫原性、传播阻断效能等评价指标(NCT04271306)。对间日疟原虫 Pvs25 疫苗的研制遇到同样的问题,疫苗抗原免疫原性较弱,诱导的传播阻断抗体水平较低。使用酿酒酵母表达的 Pvs25 配伍佐剂 Al-hydrogel 的 I 期临床试验结果就表现出这样的问题^[56],配伍油包水佐剂 Montanide ISA 51 的 I 期临床试验因配伍相关的严重不良反应而终止^[51]。基于 P25 的疫苗尚需优化,进一步增加免疫原性,明确疫苗接种后的免疫反应,并同时考虑佐剂和疫苗制剂的安全性。

1.5 HAP2 HAP2/GCS1 是保守的雄性特异蛋白,具有单个跨膜结构域、胞外结构域和相对较短的胞内结构域(图 2),在结构上与病毒 II 类融合蛋白同源,对受精过程磷脂双分子层的融合起重要作用^[57-59]。HAP2 作为膜融合剂最初在开花植物拟南芥雄性不育的筛选中鉴定出来^[58];后来在麝香百合花粉内的生殖细胞上也鉴定出此蛋白,并被命名为生殖细胞特异性蛋白 1(generative cell specific 1, GCS1),在精卵融合过程必不可少^[57]。HAP2 高度保守,存在于单细胞原生生物、藻类、高等植物、刺胞动物和节肢动物等广泛的物种中,其分子中保守的疏水性融合环是关键的功能域^[60]。在伯氏疟原虫, HAP2 表达在红细胞内雄配子体和雄配子表面, Hap2 敲除的疟原虫配子可以粘附,但不能进行细胞膜的融合^[61]。根据 HAP2 融合环(PfHAP2: 178-195aa, PbHAP2: 174-191aa)设计并表达的融合蛋白可诱导具有传播阻断效能的抗体,并且抗 PfsHAP2 的免疫小鼠血清可以抑制来自自然感染供体的恶性疟原虫配子体感染蚊子^[59]。HAP2 融合环外的其他抗原表位也可诱导传播阻断型抗体,其中更加保守的 HAP2/GCS1 结构域(PFAM 10699)将是传播阻断疫苗设计的靶位点之一。使用不含融合环区段的重组 PbHAP2 蛋白(335-609aa)可以免疫小鼠产生抗 HAP2 的传播阻断型抗体,在体外有效抑制伯氏疟原虫向动合子转化,且 SMFA 的蚊体内卵囊数量显著减少^[62]。小麦胚芽无细胞表达系统表达的重组 PfHAP2(195-684aa)免疫小鼠后,

获得的抗体进行 SMFA,亦观察到蚊中肠卵囊数量的显著减少^[63]。杆状病毒表达系统表达的含有 PFAM 10699 的间日疟原虫 HAP2 抗原(231-459aa)免疫后可以产生抗 PvHAP2 抗体,能识别血涂片中的雄配子体,直接膜饲实验(direct membrane feeding assay, DMFA)观察到阻断效能,但是在最高的抗体滴度情况下,仍不能实现完全阻断^[64]。而这些对蛋白不同区段表达的抗原研究将筛选出最具优势的候选抗原表位。目前尚无开展 HAP2 疫苗的临床试验报告。但考虑到其在雄配子体细胞和雄配子表面的定位以及在受精过程中的重要作用, HAP2 可作为 TBV 候选抗原开展深入研究。

1.6 AnAPN1 AnAPN1 是蚊中肠表面一种高度保守的表面糖蛋白,属于金属肽酶 M1 家族,参与血餐的消化。不同于其他针对疟原虫表面抗原的传播阻断疫苗候选抗原,它源于蚊子,可对抗多种疟原虫的新型疟疾传播阻断疫苗候选抗原^[10]。AnAPN1 包含 N 端信号肽、4 个结构域及 C 末端的 GPI 锚定序列,预测胞外区含有 1 黏蛋白 O-糖基化区(图 2)。该蛋白 N 末端结构域(60-195aa)具有高度保守的线性 B 细胞表位和 CD4⁺ T 细胞表位,诱导产生的抗体可以阻止恶性疟原虫和间日疟原虫动合子穿过中肠壁并发育成卵囊,从而阻断疟原虫的进一步发育和传播^[10,65]。在 AnAPN1 晶体结构分析的基础上,鉴定出 N 端结构域内的抗原肽 7(98-123aa)和抗原肽 9(173-194aa)两个主要的传播阻断抗原表位^[66]。进一步使用甘氨酸柔性链将 2 个拷贝的含有抗原肽 7 和抗原肽 9 的区段连接起来,构建抗原 UF6b,并与与皂苷 QS21 和 TLR4 激动剂构成的脂质体佐剂 GLA-LSQ 配伍制成临床前疫苗。UF6b / GLA-LSQ 对小鼠具有良好的免疫原性,诱导的抗体具有显著传播阻断效能^[67]。但应注意到,大肠埃希菌表达的全长蛋白或含有 N 端抗原肽的抗原区段都能诱导具有传播阻断效能的抗体,而病毒载体表达的对应区段抗原诱导的抗体却不具显著的传播阻断效能^[7,68]。可能与蛋白的糖基化情况或其他的免疫显性表位遮盖了传播阻断表位有关。AnAPN1 的传播阻断性抗原区段高度保守,抗 AnAPN1 抗体在不同的媒介按蚊体内可以跨株和种的阻断疟原虫发育^[10]。因此,从靶向蚊中肠疟原虫受体蛋白的角度设计传播阻断疫苗,可以解决从疟原虫自身角度研制疫苗的局限性,具有向 TBV 更进一步的研发价值,目前尚未开展关于 AnAPN1 的临床试验。

1.7 红细胞表面的配子体蛋白 疟原虫配子体期表达的表面蛋白有望成为 TBVs 的抗原,包含定位在配子体细胞表面的 P48/45 和 P230 等及红细胞表面的配子体蛋白。疟原虫侵袭红细胞后寄居在纳虫泡内,分隔于红细胞胞质,配子体细胞表面蛋白在其感染的红细胞被吞噬后得到提呈。这些抗原诱导的免疫反应在人体内可能对疟原虫配子体并无影响,但在蚊中肠可作用于配子,影响蚊体内的疟原虫发育。除了关注如 P48/45 和 P230 的配子体细胞表面蛋白外,还要注意疟原虫配子体发育过程中会释放一些蛋白,它们通过纳虫泡的膜,进入红细胞胞质或细胞膜上,调整红细胞^[69]。配子体的发育主要在宿主骨髓实质血管外间隙,并研究推测配子体是在成红细胞岛中的有核红细胞内发育的,成熟后释放于血液^[3,70],此发育过程可能需要向有性发育的裂殖子或配子体红细胞表面疟原虫蛋白与宿主受体的粘附。通过免疫因子靶向疟原虫有性发育过程的黏附分子,可能具有抑制传播的潜能。但未成熟配子

体感染的红细胞与骨髓内皮细胞在内的多种器官内皮细胞均无显著有效粘附^[71],推测未成熟配子体感染红细胞的刚性或与骨髓间充质细胞粘附是未成熟配子体驻留骨髓的机制之一^[72-73]。目前虽没有鉴定出红细胞表面的配子体特异性蛋白,但从早期配子体蛋白质组分析,预测有 1/10 输出到宿主细胞^[74]。也观察到疟疾的反复感染有助宿主清除成熟配子体^[75-76],并且抗成熟配子体红细胞表面未知抗原的抗体与血液低配子体负荷相关^[77]。使用感染者血清可识别到早期未成熟配子体寄生的红细胞表面疟原虫抗原,它们大多也表达在无性疟原虫寄生的红细胞表面,包括 SURFIN、STEVOR、RIFIN 家族蛋白等,抗配子体血清可以降低包括配子体在内的疟原虫负荷,体外可以介导配子体的免疫清除,因此配子体红细胞表面疟原虫蛋白被提议作为阻断传播疫苗的靶抗原^[12]。这类抗原可诱导机体免疫反应,自然感染能激发免疫记忆,在传播至蚊虫阶段前起到阻断传播的作用。并且作为疫苗的效果评价不需要膜饲实验及生态监测蚊虫疟原虫感染情况,采用简单的显微观测或依赖核酸序列的扩增技术(QT-NASBA),通过标准随机试验就可评估疫苗接种者外周血配子体携带情况^[78]。考虑此类抗原的自身特性,我们应像寻求红内期疫苗抗原一样,寻求配子体期单一拷贝基因编码的红细胞表面保守蛋白,可能是制备有效传播阻断疫苗的理想候选者。

2 疟疾传播阻断免疫

2.1 人体内的传播阻断免疫 依据疟原虫配子体的发育过程,可以分为不成熟配子体和成熟配子体,它们在生物特性、形态及人体内的组织定位都有所不同,针对它们的传播阻断免疫效应亦有所不同,针对未成熟配子体,免疫效应在于阻止早期有性阶段疟原虫或早期配子体感染红细胞的粘附,在进入血液循环前清除发育中的配子体,针对成熟配子体,则在于减少循环血液内配子体数量及抑制或阻断蚊体内的发育。固有免疫和细胞免疫在一定程度上参与其中,有实验表明,吞噬细胞通过 CD36 与恶性疟原虫 PfEMP1 结合,介导 I 期和 II a 期配子体的吞噬^[79]。CD4⁺ T 细胞对配子体抗原也具有明显的反应,基于鼠疟研究发现其参与诱导持久的抗配子体免疫,并且似乎对体内疟原虫各发育阶段均有效^[80]。同时疟疾感染可诱导不同的促炎性细胞因子,其中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)可刺激白细胞生成 NO,对体内疟原虫具有杀伤作用,包括配子体^[81],其免疫效应具有不受疟原虫种和发育阶段限制的显著优点。体液免疫对人体疟原虫有性阶段的影响仍不清楚。推测疟原虫配子体在人体内发育过程中可能在红细胞表面表达蛋白,在自然暴露的个体中引发体液免疫,减少循环血液中的配子体负荷。虽然还没有鉴定出配子体特异性红细胞表面蛋白,但部分无性体红细胞表面的疟原虫蛋白在未成熟配子体早期阶段也有表达,疟原虫感染后可产生这些抗原的抗体,并且抗体水平与疟原虫感染期间无性体和配子体的负荷负相关^[12]。此外,补体也参与配子体的裂解^[7]。

2.2 传播阻断免疫的蚊体内效应 抗体介导的凝集、补体的细胞毒作用和免疫细胞介导的裂解及吞噬等可能是影响蚊中肠内疟原虫有性阶段存活及发育的免疫机制^[82]。人体内疟原虫配子体死亡后将被吞噬清除,其红细胞内配子体表面的蛋白被免疫系统识别,有些抗原共存于人体和蚊体的疟原虫有性细胞表面,抗体在人体内产生,效应在蚊体内显现,影响配子的形

成、受精、合子的存活和动合子的侵袭,抑制甚至阻断蚊虫的感染。灭活配子体或配子的免疫实验^[83]、使用间日疟原虫感染者血清进行的 DMFA^[84]和使用恶性疟原虫感染者血清进行的 SMFA^[15]等均证明了传播阻断免疫在蚊体内起效,并主要由抗体介导,通过凝集、激活补体系统、调理作用等影响疟原虫的有性生殖过程或损伤裂解疟原虫^[82]。除了针对配子体表面蛋白的抗体,针对合子、动合子及蚊中肠黏膜蛋白的抗体亦具有传播阻断的效应^[10,82]。只是合子、动合子期等疟原虫进入蚊中肠后开始表达的蛋白是疟原虫在人体阶段不表达的抗原,无法在自然感染时产生抗体,免疫接种后也不会因感染激发免疫记忆。蚊中肠黏膜蛋白亦存在同样的情况。除抗体外,血液内的其他组分随蚊吸血进入中肠后亦可作用于有性阶段疟原虫。吞噬细胞可能会直接吞噬从红细胞内释出的配子,体外实验表明,细胞外配子可以被吞噬细胞吞噬,并且免疫血清对其有促进作用^[85]。疟疾患者外周血中的促炎性细胞因子和补体成分会升高,进入蚊中肠后抑制疟原虫配子的结合和进一步分化^[6,86]。活性氮对蚊中肠内疟原虫发育也有影响。Ramiro 等^[87]研究表明活性氮影响伯氏疟原虫雄配子的出丝、受精和动合子的发育,去除白细胞或使用一氧化氮合酶抑制剂可以显著减少动合子的凋亡^[88]。但考虑环境的改变,温度亦不是其最佳活性的 37 °C,免疫细胞及分子在蚊中肠内的效应可能具有局限性。

2.3 抗体介导的疟疾传播效应 除了抗体介导的疟疾传播阻断效应,我们尚需关注抗体介导的传播增强现象。无论是恶性疟原虫还是间日疟原虫,来自流行区的不同感染者的血清样本,有些能够抑制蚊虫感染,有些却促进蚊虫感染^[15,89]。食蟹猴疟原虫感染猕猴的纵向评估发现,抗配子体抗体滴度从基线水平稳步增加,其峰值期血清具有传播阻断效应,在感染的早期和峰值后的恢复期,抗体滴度较低时,血清起到促进传播的作用^[90]。在观测 6 名间日疟原虫患者治疗后 100 d 内血清抗配子抗体的含量变化及传播阻断能力的实验中,发现传播阻断效果随抗体浓度的降低而线性下降,半衰期大约 2 个月,并且治疗 80 d 后的一名患者血清具有显著的促疟疾传播的作用^[91]。在对传播阻断性血清稀释的 SMFA 中发现,与稀释后的抗 Pvs48/45 单克隆抗体类似,低浓度的抗体促使不具感染性的低密度配子体感染蚊子^[92]。抗 Pfs48/45 和 Pfs25 的单克隆抗体在低浓度时也可能促进疟原虫感染蚊子^[93]。抗体介导的疟疾传播机制目前尚不清楚,针对雌雄配子表面共同抗原的抗体,可能在低抗体浓度时,不能中和配子或起到调理作用,反而促进了雌雄配子结合受精。此外还有一类抗体只表现出促进传播的效应。最近在恶性疟原虫 Pfs47 的研究中发现针对 Pfs47 第 2 结构域中间区段的单克隆抗体具有传播阻断的效应,而靶向此结构域 N 端抗原肽(155-181aa;图 2)的单克隆抗体显著增加了蚊中肠卵囊数量^[44],可能这一抗体的结合协助了 Pfs47 介导的疟原虫的蚊免疫逃逸。现对育性期疟原虫的免疫认识仍不足,而这一机制的阐明将优化疟疾传播阻断疫苗的设计与开发。

3 结语

目前人类疟疾的防控已偏离 WHO 全球疟疾战略的轨道,要实现 2030 年将全球疟疾发病率和死亡率降低 90% 的目标,需要新的办法、新的工具和更好的执行现有策略。安全、有效、

廉价的疫苗将在抗击疟疾方面发挥关键作用,帮助疟疾防控重回正轨。TBVs可以降低流行区疟原虫的传播、防止疟疾的爆发流行、减弱或免除输入性感染者造成的流行、协助其他干预措施对抗突变株,最终将有助于消灭疟疾。传统TBVs的研究取得进展,P48/45、P230、P47等候选疫苗均摸索到了功能性抗原区段,Pfs25的疫苗率先在疟疾流行区开展临床试验,为未来TBVs的临床试验提供宝贵的参考。随人体内疟原虫配子体发育过程和传播阻断免疫的深入研究及疟原虫侵袭相关蚊源受体的发现为TBVs的研制开辟了新的途径。

【参考文献】

- [1] WHO, World malaria report 2021 [R]. Geneva: World Health Organization, 2021.
- [2] 张丽, 丰俊, 涂宏, 等. 2020年全国疟疾疫情分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2021, 39(2): 195-199.
- [3] Joice R, Nilsson SK, Montgomery J, et al. *Plasmodium falciparum* transmission stages accumulate in the human bone marrow [J]. Sci Transl Med, 2014, 6(244): 244re5.
- [4] Obaldia N, Meibalan E, Sa JM, et al. Bone Marrow Is a Major Parasite Reservoir in *Plasmodium vivax* Infection [J]. mBio, 2018, 9(3): e00625-18.
- [5] Billker O, Lindo V, Panico M, et al. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito [J]. Nature, 1998, 392(6673): 289-292.
- [6] Smith RC, Vega-Rodríguez J, Jacobs-Lorena M. The *Plasmodium* bottleneck: malaria parasite losses in the mosquito vector [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2014, 109(5): 644-661.
- [7] Acquah FK, Adjah J, Williamson KC, et al. Transmission-blocking vaccines: old friends and new prospects [J]. Infect Immun, 2019, 87(6): e00775-18.
- [8] Patel PN, Tolia N. Structural vaccinology of malaria transmission-blocking vaccines [J]. Expert Rev Vaccines, 2021, 20(2): 199-214.
- [9] Lavazec C, Boudin C, Lacroix R, et al. Carboxypeptidases B of *Anopheles gambiae* as targets for a *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine [J]. Infect Immun, 2007, 75(4): 1635-1642.
- [10] Armistead JS, Morlais I, Mathias DK, et al. Antibodies to a single, conserved epitope in *Anopheles* APN1 inhibit universal transmission of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria [J]. Infect Immun, 2014, 82(2): 818-29.
- [11] Zhang G, Niu G, Franca CM, et al. *Anopheles* Midgut FREP1 Mediates *Plasmodium* Invasion [J]. J Biol Chem, 2015, 290(27): 16490-16501.
- [12] Dantzer KW, Ma S, Ngotho P, et al. Naturally acquired immunity against immature *Plasmodium falciparum* gametocytes [J]. Sci Transl Med, 2019, 11(495): eaav3963.
- [13] Vermeulen AN, Ponnudurai T, Beckers PJ, et al. Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito [J]. J Exp Med, 1985, 162(5): 1460-1476.
- [14] Renner J, Graves PM, Carter R, et al. Target antigens of transmission-blocking immunity on gametes of *Plasmodium falciparum* [J]. J Exp Med, 1983, 158(3): 976-981.
- [15] Graves PM, Carter R, Burkot TR, et al. Antibodies to *Plasmodium falciparum* gamete surface antigens in Papua New Guinea sera [J]. Parasite Immunol, 1988, 10(2): 209-218.
- [16] van Dijk MR, Janse CJ, Thompson J, et al. A central role for P48/45 in malaria parasite male gamete fertility [J]. Cell, 2001, 104(1): 153-164.
- [17] Singh SK, Roeffen W, Mistarz UH, et al. Construct design, production, and characterization of *Plasmodium falciparum* 48/45 R0.6C subunit protein produced in *Lactococcus lactis* as candidate vaccine [J]. Microb Cell Fact, 2017, 16(1): 97.
- [18] Stone WJR, Campo JJ, Ouedraogo AL, et al. Unravelling the immune signature of *Plasmodium falciparum* transmission-reducing immunity [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 558.
- [19] Stone WJ, Dantzer KW, Nilsson SK, et al. Naturally acquired immunity to sexual stage *P. falciparum* parasites [J]. Parasitology, 2016, 143(2): 187-198.
- [20] Outchkourov NS, Roeffen W, Kaan A, et al. Correctly folded Pfs48/45 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(11): 4301-4305.
- [21] Singh SK, Roeffen W, Andersen G, et al. A *Plasmodium falciparum* 48/45 single epitope R0.6C subunit protein elicits high levels of transmission blocking antibodies [J]. Vaccine, 2015, 33(16): 1981-1986.
- [22] Singh SK, Plieskatt J, Chourasia BK, et al. A Reproducible and Scalable Process for Manufacturing a Pfs48/45 Based *Plasmodium falciparum* Transmission-Blocking Vaccine [J]. Front Immunol, 2021(11): 606266.
- [23] Lee SM, Hickey JM, Miura K, et al. A C-terminal Pfs48/45 malaria transmission-blocking vaccine candidate produced in the baculovirus expression system [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 395.
- [24] Lennartz F, Brod F, Dabbs R, et al. Structural basis for recognition of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 by a transmission blocking antibody [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 3822.
- [25] Tachibana M, Suwanabun N, Kaneko O, et al. *Plasmodium vivax* gametocyte proteins, Pvs48/45 and Pvs47, induce transmission-reducing antibodies by DNA immunization [J]. Vaccine, 2015, 33(16): 1901-1908.
- [26] Arvalo-Herrera M, Miura K, Solano E, et al. Immunogenicity of full-length *P. vivax* rPvs48/45 protein formulations in BALB/c mice [J]. Vaccine, 2022, 40(1): 133-140.
- [27] Williamson KC. Pfs230: from malaria transmission-blocking vaccine candidate toward function [J]. Parasite Immunol, 2003, 25(7): 351-359.
- [28] Eksi S, Czesny B, van Gemert GJ, et al. Malaria transmission-blocking antigen, Pfs230, mediates human red blood cell binding to exflagellating male parasites and oocyst production [J]. Mol Microbiol, 2006, 61(4): 991-998.
- [29] Williamson KC, Keister DB, Muratova O, et al. Recombinant Pfs230, a *Plasmodium falciparum* gametocyte protein, induces antisera that reduce the infectivity of *Plasmodium falciparum* to mosquitoes [J]. Mol Biochem Parasitol, 1995, 75(1): 33-42.
- [30] Lee SM, Plieskatt J, Krishnan S, et al. Expression and purification optimization of an N-terminal Pfs230 transmission-blocking vaccine candidate [J]. Protein Expr Purif, 2019, 160: 56-65.

- [31] MacDonald NJ, Nguyen V, Shimp R, et al. Structural and Immunological Characterization of Recombinant 6-Cysteine Domains of the *Plasmodium falciparum* Sexual Stage Protein Pfs230[J]. J Biol Chem, 2016, 291(38):19913-19922.
- [32] Miura K, Takashima E, Pham TP, et al. Elucidating functional epitopes within the N-terminal region of malaria transmission blocking vaccine antigen Pfs230[J]. NPJ Vaccines, 2022, 7(1):4.
- [33] Healy SA, Anderson C, Swihart BJ, et al. Pfs230 yields higher malaria transmission-blocking vaccine activity than Pfs25 in humans but not mice[J]. J Clin Invest, 2021, 131(7):e146221.
- [34] Magnusson SE, Reimer JM, Karlsson KH, et al. Immune enhancing properties of the novel Matrix-M adjuvant leads to potentiated immune responses to an influenza vaccine in mice[J]. Vaccine, 2013, 31(13):1725-1733.
- [35] Scaria PV, Rowe CG, Chen BB, et al. Outer membrane protein complex as a carrier for malaria transmission blocking antigen Pfs230[J]. NPJ Vaccines, 2019(4):24.
- [36] Tachibana M, Sato C, Otsuki H, et al. *Plasmodium vivax* gametocyte protein Pvs230 is a transmission-blocking vaccine candidate[J]. Vaccine, 2012, 30(10):1807-1812.
- [37] Tentokam BCN, Amaratunga C, Alani NAH, et al. Naturally acquired antibody response to malaria transmission blocking vaccine candidate Pvs230 domain 1[J]. Front Immunol, 2019, 10:2295.
- [38] van Schaijk BC, van Dijk MR, van de Vegte-Bolmer M, et al. Pfs47, paralog of the male fertility factor Pfs48/45, is a female specific surface protein in *Plasmodium falciparum*[J]. Mol Biochem Parasitol, 2006, 149(2):216-222.
- [39] Ramphul UN, Garver LS, Molina-Cruz A, et al. *Plasmodium falciparum* evades mosquito immunity by disrupting JNK-mediated apoptosis of invaded midgut cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(5):1273-1280.
- [40] Molina-Cruz A, Canepa GE, Barillas-Mury C. *Plasmodium* P47: a key gene for malaria transmission by mosquito vectors[J]. Curr Opin Microbiol, 2017(40):168-174.
- [41] Molina-Cruz A, Canepa GE, Kamath N, et al. *Plasmodium* evasion of mosquito immunity and global malaria transmission: The lock-and-key theory[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(49):15178-15183.
- [42] Yenkeidiok-Douti L, Canepa GE, Barletta ABF, et al. In vivo Characterization of *Plasmodium berghei* P47 (Pbs47) as a Malaria Transmission-Blocking Vaccine Target[J]. Front Microbiol, 2020(11):1496.
- [43] Ukegbu CV, Giorgalli M, Yassine H, et al. *Plasmodium berghei* P47 is essential for ookinete protection from the *Anopheles gambiae* complement-like response[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):6026.
- [44] Canepa GE, Molina-Cruz A, Yenkeidiok-Douti L, et al. Antibody targeting of a specific region of Pfs47 blocks *Plasmodium falciparum* malaria transmission[J]. NPJ Vaccines, 2018, 3:26.
- [45] Sharma B. Structure and mechanism of a transmission blocking vaccine candidate protein Pfs25 from *P. falciparum*: a molecular modeling and docking study[J]. In Silico Biol, 2008, 8(3-4):193-206.
- [46] Saxena AK, Wu Y, Garbocki DN. *Plasmodium* p25 and p28 surface proteins: potential transmission-blocking vaccines[J]. Eukaryot Cell, 2007, 6(8):1260-1265.
- [47] Tomas AM, Margos G, Dimopoulos G, et al. P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions[J]. EMBO J, 2001, 20(15):3975-3983.
- [48] Sookpongthai P, Utayopas K, Sitthiyotha T, et al. Global diversity of the gene encoding the Pfs25 protein-a *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine candidate[J]. Parasit Vectors, 2021, 14(1):571.
- [49] Kaslow DC, Isaacs SN, Quakyi IA, et al. Induction of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies by recombinant vaccinia virus[J]. Science, 1991, 252(5010):1310-1313.
- [50] Tachibana M, Takashima E, Morita M, et al. *Plasmodium vivax* transmission-blocking vaccines: Progress, challenges and innovation[J]. Parasitol Int, 2022(87):102525.
- [51] Wu Y, Ellis RD, Shaffer D, et al. Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51[J]. PLoS One, 2008, 3(7):e2636.
- [52] Sagara I, Healy SA, Assadou MH, et al. Safety and immunogenicity of Pfs25H-EPA/Alhydrogel, a transmission-blocking vaccine against *Plasmodium falciparum*: a randomised, double-blind, comparator-controlled, dose-escalation study in healthy Malian adults[J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(9):969-982.
- [53] Chichester JA, Green BJ, Jones RM, et al. Safety and immunogenicity of a plant-produced Pfs25 virus-like particle as a transmission blocking vaccine against malaria: A Phase 1 dose-escalation study in healthy adults[J]. Vaccine, 2018, 36(39):5865-5871.
- [54] de Graaf H, Payne RO, Taylor I, et al. Safety and Immunogenicity of ChAd63/MVA Pfs25-IMX313 in a Phase I First-in-Human Trial[J]. Front Immunol, 2021(12):694759.
- [55] Zanic M, Marini A, Nielsen CM, et al. Poor CD4(+) T Cell Immunogenicity Limits Humoral Immunity to *P. falciparum* Transmission-Blocking Candidate Pfs25 in Humans[J]. Front Immunol, 2021(12):732667.
- [56] 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.
- [57] Mori T, Kuroiwa H, Higashiyama T, et al. GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization[J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(1):64-71.
- [58] von Besser K, Frank AC, Johnson MA, et al. Arabidopsis HAP2 (GCS1) is a sperm-specific gene required for pollen tube guidance and fertilization[J]. Development, 2006, 133(23):4761-4769.
- [59] Angrisano F, Sala KA, Da DF, et al. Targeting the Conserved Fusion Loop of HAP2 Inhibits the Transmission of *Plasmodium berghei* and *falciparum* [J]. Cell Rep, 2017, 21(10):2868-2878.
- [60] F dry J, Liu Y, P hau-Arnaudet G, et al. The Ancient Gamete Fusogen HAP2 Is a Eukaryotic Class II Fusion Protein[J]. Cell, 2017, 168(5):904-915.
- [61] Liu Y, Tewari R, Ning J, et al. The conserved plant sterility gene HAP2 functions after attachment of fusogenic membranes in *Chlamydomonas* and *Plasmodium* gametes [J]. Genes Dev, 2008, 22(8):1051-1068.

- [62] Blagborough AM, Sinden RE. *Plasmodium berghei* HAP2 induces strong malaria transmission-blocking immunity *in vivo* and *in vitro*[J]. Vaccine, 2009, 27(38):5187-5194.
- [63] Miura K, Takashima E, Deng B, et al. Functional comparison of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine candidates by the standard membrane-feeding assay[J]. Infect Immun, 2013, 81(12):4377-4382.
- [64] Qiu Y, Zhao Y, Liu F, et al. Evaluation of *Plasmodium vivax* HAP2 as a transmission-blocking vaccine candidate[J]. Vaccine, 2020, 38(13):2841-2848.
- [65] Dinglasan RR, Kalume DE, Kanzok SM, et al. Disruption of *Plasmodium falciparum* development by antibodies against a conserved mosquito midgut antigen[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(33):13461-13466.
- [66] Atkinson SC, Armistead JS, Mathias DK, et al. The *Anopheles*-midgut APN1 structure reveals a new malaria transmission-blocking vaccine epitope[J]. Nat Struct Mol Biol, 2015, 22(7):532-539.
- [67] Bender NG, Khare P, Martinez J, et al. Immunofocusing humoral immunity potentiates the functional efficacy of the AnAPN1 malaria transmission-blocking vaccine antigen[J]. NPJ Vaccines, 2021, 6(1):49.
- [68] Kapulu MC, Da DF, Miura K, et al. Comparative assessment of transmission-blocking vaccine candidates against *Plasmodium falciparum*[J]. Sci Rep, 2015(5):11193.
- [69] Neveu G, Lavazec C. Erythrocyte Membrane Makeover by *Plasmodium falciparum* Gametocytes[J]. Front Microbiol, 2019(10):2652.
- [70] Neveu G, Richard C, Dupuy F, et al. *Plasmodium falciparum* sexual parasites develop in human erythroblasts and affect erythropoiesis[J]. Blood, 2020, 136(12):1381-1393.
- [71] Silvestrini F, Tibrcio M, Bertuccini L, et al. Differential adhesive properties of sequestered asexual and sexual stages of *Plasmodium falciparum* on human endothelial cells are tissue independent[J]. PLoS One, 2012, 7(2):e31567.
- [72] Messina V, Valtieri M, Rubio M, et al. Gametocytes of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* interact with and stimulate bone marrow mesenchymal cells to secrete angiogenic factors[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018(8):50.
- [73] Tibrcio M, Niang M, Deplaine G, et al. A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of *Plasmodium falciparum* transmission stages [J]. Blood, 2012, 119(24):e172-80.
- [74] Silvestrini F, Lasonder E, Olivieri A, et al. Protein export marks the early phase of gametocytogenesis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* [J]. Mol Cell Proteomics, 2010, 9(7):1437-1448.
- [75] Bousema JT, Gouagna LC, Drakeley CJ, et al. *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage in asymptomatic children in western Kenya[J]. Malar J, 2004(3):18.
- [76] Baird JK, Jones TR, Purnomo, et al. Evidence for specific suppression of gametocytemia by *Plasmodium falciparum* in residents of hyperendemic Irian Jaya[J]. Am J Trop Med Hyg, 1991, 44(2):183-190.
- [77] Dinko B, King E, Targett GA, et al. Antibody responses to surface antigens of *Plasmodium falciparum* gametocyte-infected erythrocytes and their relation to gametocytaemia[J]. Parasite Immunol, 2016, 38(6):352-364.
- [78] Chan JA, Fowkes FJ, Beeson JG. Surface antigens of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates[J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(19):3633-3657.
- [79] Smith TG, Serghides L, Patel SN, et al. CD36-mediated nonopsonic phagocytosis of erythrocytes infected with stage I and IIA gametocytes of *Plasmodium falciparum* [J]. Infect Immun, 2003, 71(1):393-400.
- [80] Goodier MR, Targett GA. Targett, Polyclonal T-cell responses to *Plasmodium falciparum* gametocytes in malaria nonexposed donors[J]. Parasite Immunol, 1997, 19(9):419-425.
- [81] Naotunne TS, Karunaweera ND, Mendis KN, et al. Cytokine-mediated inactivation of malarial gametocytes is dependent on the presence of white blood cells and involves reactive nitrogen intermediates[J]. Immunology, 1993, 78(4):555-562.
- [82] de Jong RM, Tebeje SK, Meerstein-Kessel L, et al. Immunity against sexual stage *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites[J]. Immunol Rev, 2020, 293(1):190-215.
- [83] Carter R, Chen DH. Malaria transmission blocked by immunisation with gametes of the malaria parasite[J]. Nature, 1976, 263(5572):57-60.
- [84] Mendis KN, Munesinghe YD, de Silva YN, et al. Malaria transmission-blocking immunity induced by natural infections of *Plasmodium vivax* in humans[J]. Infect Immun, 1987, 55(2):369-372.
- [85] Healer J, Graszyński A, Riley E. Phagocytosis does not play a major role in naturally acquired transmission-blocking immunity to *Plasmodium falciparum* malaria[J]. Infect Immun, 1999, 67(5):2334-2339.
- [86] Satapathy S, Taylor-Robinson AW. Bridging the Knowledge Gap in Transmission-Blocking Immunity to Malaria; Deciphering Molecular Mechanisms in Mosquitoes[J]. Adv Infect Dis, 2016(6):33-41.
- [87] Ramiro RS, Alpedrinha J, Carter L, et al. Sex and death: the effects of innate immune factors on the sexual reproduction of malaria parasites[J]. PLoS Pathog, 2011, 7(3):e1001309.
- [88] Ali M, Al-Olayan EM, Lewis S, et al. Naturally occurring triggers that induce apoptosis-like programmed cell death in *Plasmodium berghei* ookinetes[J]. PLoS One, 2010, 5(9):e12634.
- [89] Carter R, Mendis KN. Immune responses against sexual stages of *Plasmodium vivax* during human malarial infections in Sri Lanka[J]. Parasitologia, 1991, 33(1):67-70.
- [90] Naotunne TD, Rathnayake KD, Jayasinghe A, et al. *Plasmodium cynomolgi*: serum-mediated blocking and enhancement of infectivity to mosquitoes during infections in the natural host, *Macaca sinica* [J]. Exp Parasitol, 1990, 71(3):305-313.
- [91] Ranawaka MB, Munesinghe YD, de Silva DM, et al. Boosting of transmission-blocking immunity during natural *Plasmodium vivax* infections in humans depends upon frequent reinfection [J]. Infect Immun, 1988, 56(7):1820-1824.
- [92] Arvalo-Herrera M, Solarte Y, Rocha L, et al. Characterization of *Plasmodium vivax* transmission-blocking activity in low to moderate malaria transmission settings of the Colombian Pacific coast[J]. Am J Trop Med Hyg, 2011, 84(2 Suppl):71-77.
- [93] Ponnudurai T, van Gemert GJ, Bensink T, et al. Transmission blockade of *Plasmodium falciparum*: its variability with gametocyte numbers and concentration of antibody[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1987, 81(3):491-493.