

文章编号: 1000-7423(2012)-05-0393-04

【综述】

疟疾偶联疫苗

钱锋, 徐沪济

【提要】 很多疟疾抗原在人体中是弱免疫原, 化学偶联是一种提升弱免疫原免疫原性的方法, 其价值已在疟疾疫苗的研究工作中得到证明。本文介绍了蛋白质偶联的一些常用化学连接剂和载体蛋白, 并综述了疟疾偶联疫苗的研究进展。

【关键词】 疟疾; 化学偶联; 疫苗

中图分类号: R531.3 文献标识码: A

Malaria Conjugate Vaccine

QIAN Feng, XU Hu-ji

(Department of Rheumatology and Immunology, Changzheng Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

【Abstract】 Many malarial antigens are poor immunogens in human. Chemical conjugation is one of the ways to enhance the immunogenicity of those poor immunogens. Its value has been demonstrated in malaria vaccine research. This article introduces the chemical linkers and the carrier proteins, which are often used for protein conjugation, and summarizes the research progress in malarial conjugate vaccine development.

【Key words】 Malaria; Chemical conjugation; Vaccine

Supported by the National Basic Research Program of China (No. 2007CB513105), the National Natural Science Foundation of China (No. 81072498) and the Initiative Foundation for Returned Overseas Chinese Scholars from the Ministry of Education of China

一个完全抗原应同时具有两种特性, 即免疫原性和免疫反应性, 而有些物质仅具有免疫反应性但不具有免疫原性, 这些物质被称为半抗原或不完全抗原, 很多半抗原与载体蛋白结合后可成为完全抗原。化学偶联是通过化学方法将两个分子在体外连接成一个分子的技术, 在疫苗研究领域, 这一技术最早被应用于病毒和细菌的多肽和多糖, 通过与载体蛋白的偶联使作为半抗原的多肽和多糖成为全抗原, 尤其是多糖偶联疫苗, 如伤寒沙门氏菌、B 型流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌和肺炎链球菌的多糖偶联疫苗^[1-4], 有的已完成临床试验, 有的已批准上市。化学偶联也可应用于一些弱免疫原性的抗原蛋白, 通过特定的偶联提升这些抗原蛋白的免疫原性。

很多疟疾候选疫苗的抗原在人体中的免疫原性不强, 因此, 如何提高疟疾抗原在人体中的免疫原性对于提高这些疟疾候选疫苗的有效性具有重要意义, 构建偶联疟疾疫苗包括抗原的自身偶联或抗原与载体蛋

白的偶联是提高疟疾抗原免疫原性的一种途径。本文就蛋白质偶联的一些常用化学连接剂和载体蛋白进行介绍, 并对疟疾偶联疫苗的一些研究进展进行综述。

1 蛋白偶联的化学方法

1.1 蛋白偶联常用化学连接剂及其反应 蛋白分子上的一些基团可用于偶联反应, 常用的有伯胺基和羧基。蛋白的伯胺基包括蛋白 N 末端的氨基和赖氨酸残基的 ϵ 氨基; 蛋白的羧基包括蛋白 C 末端的羧基、天冬氨酸残基的 α 羧基和谷氨酸残基的 β 羧基。对于糖蛋白可利用其糖成分上的顺式乙二醇 (cis-glycol), 用高碘酸钠氧化形成醛基来进行蛋白偶联。可用于化学偶联的连接剂有很多, 其中 Sulfo-EMCS、Sulfo-SIAB、SBAP、SATA、BS3、Traut 试剂 (Traut's reagent) 和 NAHT 是常用的针对伯胺基的化学连接剂, 前 6 个连接剂是美国 Thermo Scientific 公司的产品 (www.thermo.com), 最后 1 个连接剂 NAHT (DL-N-acetylhomocysteine thiolactone) 是美国 Sigma Aldrich 公司的产品; EMCH 和 ADH (adipic acid dihydrazide) 是常用的针对羧基和醛基的化学连接剂, 分别是 Thermo Scientific 公司和 Sigma Aldrich 公司的产品。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (No. 2007-CB513105); 国家自然科学基金 (No. 81072498); 教育部留学回国人员科研启动基金

作者单位: 第二军医大学长征医院风湿免疫科, 上海 200003

Sulfo-EMCS、Sulfo-SIAB、SBAP 和 SATA 在一端都带有 NHS 酯 (N-hydroxysuccinimide ester), 在另一端分别带有马来酰亚胺 (maleimide)、碘乙酰、溴乙酰和受酰基化保护的巯基, 是异型双功能连接剂, 这 4 个连接剂通过 NHS 酯与蛋白分子的伯胺基进行亲核反应形成酰胺键, 将马来酰亚胺、碘乙酰、溴乙酰和受酰基化保护的巯基分别加到蛋白分子上, 受酰基化保护的巯基可通过盐酸羟胺去保护而释放自由巯基^[5]。BS3 在其两端均带有 NHS 酯, 是同型双功能连接剂。Traut 试剂和 NAHT 均为环形结构的化合物, 通过与蛋白伯胺基的亲核反应形成酰胺键, 同时开环形成自由巯基^[5]。EMCH 一端带有酰肼 (hydrazide), 另一端带有马来酰亚胺, 是异型双功能连接剂, 酰肼基团中的氨基与醛基可直接反应形成腙键, 但与蛋白羧基的反应需要连接剂 EDC (Thermo Scientific 公司) 作为桥联剂, EDC 首先与羧基反应生成 O-酰基异脲 (O-acylisourea) 中间体, 酰肼基团中的氨基与该中间体反应形成酰胺键^[5]。ADH 两端都带有酰肼, 是同型双功能连接剂。自由巯基与马来酰亚胺、碘乙酰或溴乙酰反应形成硫酯键^[5]。

由于一个蛋白上通常含有多个伯胺基和羧基, 在通过伯胺基和羧基对蛋白进行修饰时, 一般很难得到均一的被修饰蛋白, 所以最终的偶联产物是含有多种偶联比例甚至是交联的偶联产物混合物^[5], 但是如果对蛋白 N 末端的氨基进行定点修饰则可产生 1:1 的偶联产物。醛基与蛋白的伯氨基反应可生成席夫碱 (Schiff's base), 蛋白 N 末端氨基的解离常数 (pKa) 要低于赖氨酸残基 ε 氨基的解离常数, 当将反应 pH 值降到 5 左右, 醛基基本上仅能与 N 末端氨基发生反应, 则外源基团通过醛基可定向连接到蛋白的 N 末端, 再用硼氢化钠将席夫碱中的 C/N 双键还原成稳定的 C/N 单键, 但这一方法会有较多蛋白损耗。

1.2 蛋白偶联常用载体 血清清蛋白、卵清蛋白、钥孔戚血蓝素、破伤风类毒素 (tetanus toxoid, TT)、白喉类毒素 (diphtheria toxoid, DT)、铜绿假单胞菌外毒素 (*Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A, ETA)、去毒铜绿假单胞菌外毒素 (如 exoprotein A, EPA)、去毒白喉毒素 (如 diphtheria cross-reacting material 197, CRM197) 和 B 群脑膜炎奈瑟菌外膜蛋白复合物 (*Neisseria meningitidis* outer-membrane protein complex, OMPC) 等多种蛋白可作为偶联的载体蛋白, 其中 EPA、CRM197 和 OMPC 是目前偶联疫苗常用的载体蛋白^[6-8]。

ETA 与白喉毒素均为单体蛋白, 相对分子质量非常接近, 均可分成 3 个结构域, 其中一个结构域是

ADP-核糖基化 (ADP-ribosylation) 功能域^[9]。EPA 是 ETA 第 577 氨基酸位点上的亮氨酸被缬氨酸所替代, 并缺失第 578 位的谷氨酸, CRM197 是白喉毒素第 52 氨基酸位点上的甘氨酸被谷氨酸所替代, 这些氨基酸的点突变使两种毒素丧失 ADP-核糖基化的催化功能。EPA 和 CRM197 均可通过工程菌表达而获得。B 群脑膜炎奈瑟菌的外膜蛋白有 I、II、III、IV 和 V 等 5 种类型, II 和 III 不会同时存在于同一菌株中。OMPC 可从培养的细菌中纯化而获得^[10]。

1.3 偶联蛋白的质控 偶联蛋白可用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、蛋白质印迹 (Western blotting)、氨基酸分析、分子排阻-高效液相层析-多角度光散射 (SEC-HPLC-MALS) 和原子力显微镜 (atomic force microscopy) 等进行质控^[11]。当两种被偶联在一起的蛋白的氨基酸组成存在一定差异时, 通过氨基酸分析可确定偶联蛋白的偶联比 (conjugation ratio)^[12], 结合偶联产物的总浓度, 可计算出偶联组份蛋白的浓度。通过 SEC-HPLC-MALS 可得到偶联蛋白的洗脱曲线以及偶联蛋白的相对分子质量范围和相对分子质量峰值^[11]。

2 疟疾偶联疫苗研究进展

2.1 红外期疟疾偶联疫苗 疟疾偶联疫苗最早应用于恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 红外期的环孢子蛋白 (circumsporozoite protein, CSP), 该蛋白的中央区域含有 37 个 NANP 四肽重复序列, 期间散在分布 4 个 NVDP 四肽序列, 实验表明针对 NANP 重复区的抗体具有保护作用, 但是 CSP 是一个低免疫原性的蛋白, 其 NANP 四肽重复区段是一个低免疫原性的区段。将串联的 NANP 合成肽偶联到 TT 上, 与铝佐剂结合肌注健康志愿者, 在一些志愿者中激发出的抗体能识别 NANP 肽、CSP 和子孢子, 并且个别抗体效价高的志愿者能抵抗孢子的攻击^[13-15]。由于普通人群普遍接受过破伤风疫苗的免疫, 已存在的抗 TT 抗体有可能阻碍以 TT 为载体的偶联疫苗的免疫作用, 因此研究者用 TT 预先免疫小鼠, 再用偶联疫苗免疫, 发现在小鼠中抗 NANP 肽的抗体不仅未降低, 反而有所提高^[16]。但是以 TT 为载体的 NANP 肽偶联疫苗所激发出的抗 NANP 抗体水平除少数个体外普遍不高, 甚至在有些个体中未激发出特异性抗体^[13, 15]。在比较了不同蛋白载体的免疫效果, 并发现以 ETA 为载体显著优于以 TT 为载体后^[17], 研究者将重组表达的相对分子质量 (M_r) 约为 20 000 的 CSP 片段偶联到 ETA 上 (偶联修饰可使 ETA 去毒), 与铝佐剂结合肌注健康志愿者, 在过半数的个体中激发出较高水平的抗体, 免疫血清体外

抑制孢子入侵肝细胞的抑制率为 45%~90%，但对若干位志愿者在免疫后用孢子进行攻击试验，仅 1 位明确获得保护^[18]。

2.2 红内期疟疾偶联疫苗 恶性疟原虫红内期的裂殖子顶端膜抗原 1 (apical membrane protein 1, AMA1) 在人体内是一个弱免疫原性的抗原，AMA1 与重组表达的 EPA 偶联后在小鼠体内可显著提升 AMA1 的免疫原性^[11]，但在猴子试验中没有获得与小鼠试验相同的结果 (未发表资料)。恶性疟原虫裂殖子表面蛋白 1 (merozoite surface protein 1, MSP1) 的 MSP1-42 片段在人体中同样是一个弱免疫原性的抗原，恶性疟原虫 FUP 株的 MSP1-42 在其 M_r 33 000 片段上有一个未配对的半胱氨酸，利用该半胱氨酸的自由巯基可将 FUP 株的 MSP1-42 直接偶联到经马来酰亚胺修饰的 EPA 上，但小鼠试验显示这种偶联并不能提升 MSP1-42 的免疫原性^[19]。鼠约氏疟原虫 (*P. yoelii*) 裂殖子表面蛋白 1 的 MSP1-19 片段与福氏佐剂结合在多数 H-2 背景小鼠中可激发出高水平的特异性抗体，但在 H-2^s 小鼠中却无法激发出特异性抗体，当约氏疟原虫 MSP1-19 与 DT 偶联后在 H-2^s 小鼠中激发了高水平的抗体，并能保护免疫小鼠抗约氏疟原虫的攻击，这一结果表明，与 DT 的偶联可克服不同的 H-2 背景对 MSP1-19 免疫的限制^[20]。

2.3 蚊虫期疟疾偶联疫苗 恶性疟原虫表面蛋白 25 (*P. falciparum* surface protein 25, Pfs25) 在按蚊体内恶性疟原虫的晚期合子和动合子阶段表达，相对分子质量约为 M_r 25 000，是恶性疟疾传播阻断疫苗的一个重要抗原，但 Pfs25 免疫原性较弱。当 Pfs25 与其自身偶联 (Pfs25-Pfs25) 或与载体蛋白偶联 (Pfs25-EPA 和 Pfs25-OMPC)，动物试验显示，Pfs25 的这 3 种偶联蛋白都极大提升了 Pfs25 的免疫原性^[11,21,22]，其中 Pfs25-OMPC 在猴子中激发的抗体水平有很长的持久性。Pfs25-Pfs25 (<http://clinicaltrials.gov>, NCT009-77899) 和 Pfs25-EPA (<http://clinicaltrials.gov>, NCT014-34381) 已进入 I 期临床试验。另一个恶性疟疾传播阻断疫苗的重要抗原，恶性疟原虫表面蛋白 28 (*P. falciparum* surface protein 28, Pfs28) 也是一个弱免疫原性的抗原，当 Pfs28 与 EPA 偶联后同样极大提升了其在小鼠中的免疫原性^[23]。

2.4 杂合型疟疾偶联疫苗 以 Pfs25-Pfs25 自身偶联蛋白为载体再与恶性疟原虫 CSP 的 NANP 合成肽偶联，免疫小鼠后在激发抗 Pfs25 抗体的同时也激发了抗 CSP 的抗体^[24]。疟疾传播阻断疫苗是一类较特殊的疫苗，对疫苗免疫接种者无直接的保护作用，但必须在流行区大范围免疫接种才有可能起到传播阻断的作用，因

此 Pfs25 如与一个红内期或红外期抗原偶联，制备双价疟疾疫苗，则有利于 Pfs25 疫苗在流行区人群中的大范围免疫接种，有望成为消除疟疾的一个重要手段。

3 结语

偶联疫苗应用于红外期和蚊虫期的疟原虫抗原对于提升抗原的免疫原性均有明显效果，尤其是 Pfs25 的偶联疫苗取得了很大进展，已推进到 I 期临床试验，但偶联疫苗应用于红内期恶性疟原虫抗原 AMA1 和 MSP1-42，效果却不明显或无效果，目前尚不清楚造成这些差异的免疫机制，因此，阐明偶联疫苗的免疫机制至关重要，只有这样才能更好地在理论上指导疟疾偶联疫苗，以及其他类型的蛋白偶联疫苗的实际工作。蛋白质的化学偶联技术除可用于构建偶联疫苗以提升抗原的免疫原性外，还可用于构建双价疫苗，尤其是当因各种原因而无法获得融合蛋白时，通过蛋白质的化学偶联可达到这样的目的。此外，通过这一技术可对蛋白质和抗体进行特定的修饰和标记，如对某些药物蛋白进行聚乙二醇修饰 (pegylation) 以降低药物蛋白的免疫原性和延长其半衰期。目前在作者的实验室已开展了一些有关疟疾偶联疫苗免疫机制的研究工作，同时在构建一个含有蛋白佐剂成分的新型双价疟疾疫苗。

参 考 文 献

- [1] Thiem VD, Lin FY, Canh do G, et al. The Vi conjugate typhoid vaccine is safe, elicits protective levels of IgG anti-Vi, and is compatible with routine infant vaccines[J]. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(5): 730-735.
- [2] Toraño G, Toledo ME, Baly A, et al. Phase I clinical evaluation of a synthetic oligosaccharide-protein conjugate vaccine against *Haemophilus influenzae* type b in human adult volunteers [J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13(9): 1052-1056.
- [3] Bröker M, Dull PM, Rappuoli R, et al. Chemistry of a new investigational quadrivalent meningococcal conjugate vaccine that is immunogenic at all ages [J]. Vaccine, 2009, 27(41): 5574-5580.
- [4] Poolman J, Frasnich C, Nurkka A, et al. Impact of the conjugation method on the immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19F polysaccharide in conjugate vaccines [J]. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(2): 327-336.
- [5] Qian F. Conjugation of *Plasmodium falciparum* Pfs25 to *Pseudomonas aeruginosa* exoprotein A with different chemical linkers [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2011, 29(4): 254-257. (in Chinese) (钱锋. 不同的化学连接剂偶联恶性疟原虫 Pfs25 抗原和绿脓杆菌重组去毒外毒素 rEPA[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29(4): 254-257.)
- [6] Fass R, van de Walle M, Shiloach A, et al. Use of high density cultures of *Escherichia coli* for high level production of recombinant *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1991, 36(1): 65-69.
- [7] Giannini G, Rappuoli R, Ratti G. The amino-acid sequence of two non-toxic mutants of diphtheria toxin: CRM45 and CRM197 [J]. Nucleic Acids Res, 1984, 12(10): 4063-4069.
- [8] Tsai CM, Frasnich CE, Mocca LF. Five structural classes of major outer membrane proteins in *Neisseria meningitidis* [J]. J Bacteri-

(下转第 400 页)

- rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control[J]. PLoS Pathog, 2011, 7(9): 10022-10036.
- [21] Sinai AP. Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane[J]. Subcell Biochem, 2008, 47(1): 556-4.
- [22] Martin AM, Liu T, Lynn BC, et al. The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border[J]. J Eukaryot Microbiol, 2007, 54(1): 25-28.
- [23] Thiago AT, Wanderley S, Renato AD. Phosphatidylserine exposure by *Toxoplasma gondii* is fundamental to balance the immune response granting survival of the parasite and of the host [J]. PLoS One, 2011, 6(11): 1-9.
- [24] Luder CG, Algner M, Lang C, et al. Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages[J]. Int J Parasitol, 2003, 33(8): 833-844.
- [25] Guillermo LV, DaMatta RA. Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii* infection of chicken macrophage cell lines[J]. Poult Sci, 2004, 83(5): 776-782.
- [26] Kim SK, Boothroyd JC. Stage-specific expression of surface antigens by *Toxoplasma gondii* as a mechanism to facilitate parasite persistence[J]. J Immunol, 2005, 174(12): 8038-8048.
- [27] Jung C, Lee CY, Grigg ME. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins[J]. Int J Parasitol, 2004, 34(3): 285-296.
- [28] Gilbert SC, Plebanski M, Gupta S, et al. Association of malaria parasite population structure, HLA, and immunological antagonism [J]. Science, 1998, 279(5354): 1173-1177.
- [29] Sibley LD, Ajioka J W. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps[J]. Annu Rev Microbiol, 2008, 62(3): 29-51.
- [30] Howard JC, Hunn JP, Steinfeldt T. The IRG protein-based resistance mechanism in mice and its relation to virulence in *Toxoplasma gondii*[J]. Curr Opin Microbiol, 2011, 14(4): 414-421.
- [31] Steinfeldt T, Konen-Waisman S, Tong L, et al. Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii* [J]. PLoS Biol, 2010, 8(12): e1000576.
- [32] Zhao Y, Ferguson DJ, Wilson DC, et al. Virulent *Toxoplasma gondii* evades immunity-related GTPase-mediated parasite vacuole disruption within primed macrophages[J]. J Immunol, 2009, 182(6): 3775-3781.
- [33] Fentress SJ, Behnke MS, Dunay IR, et al. Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence[J]. Cell Host Microbe, 2010, 8(6): 484-495.
- [34] Ahmed AK, Mun HS, Aosai F, et al. Roles of *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70 in host defense against *T. gondii* infection[J]. Microbiol Immunol, 2004, 48(11): 911-915.
- [35] Bolitho P, Voskoboinik I, Trapani JA, et al. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin [J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19(3): 339-347.
- [36] Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts; granzyme pathways of programmed cell death[J]. Annu Rev Immunol, 2008, 26(3): 389-420.
- [37] Yamada T, Tomita T, Weiss LM, et al. *Toxoplasma gondii* inhibits granzyme B-mediated apoptosis by the inhibition of granzyme B function in host cells[J]. Int J Parasitol, 2011, 41(6): 595-607.
- [38] Morampudi V, Braun MY, D'Souza S. Modulation of early beta-defensin-2 production as a mechanism developed by type I *Toxoplasma gondii* to evade human intestinal immunity [J]. Infect Immun, 2011, 79(5): 2043-2050.

(收稿日期: 2012-02-28 编辑: 衣凤芸, 杨频)

(上接第 395 页)

- ol, 1981, 146(1): 69-78.
- [9] Pastan I, FitzGerald D. *Pseudomonas* exotoxin; chimeric toxins [J]. J Biol Chem, 1989, 264 (26): 15157-15160.
- [10] Fu J, Bailey FJ, King JJ, et al. Recent advances in the large scale fermentation of *Neisseria meningitidis* group B for the production of an outer membrane protein complex [J]. Nat Biotechnol, 1995, 13(2): 170-174.
- [11] Qian F, Wu Y, Muratova O, et al. Conjugating recombinant proteins to *Pseudomonas aeruginosa* exoprotein A: a strategy for enhancing immunogenicity of malaria vaccine candidates [J]. Vaccine, 2007, 25(20): 3923-3933.
- [12] Shuler KR, Dunham RG, Kanda P. A simplified method for determination of peptide-protein molar ratios using amino acid analysis [J]. J Immunol Methods, 1992, 156(2): 137-149.
- [13] Herrington DA, Clyde DF, Lososky G, et al. Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites [J]. Nature, 1987, 328(6127): 257-259.
- [14] Etlinger HM, Felix AM, Gillessen D, et al. Assessment in humans of a synthetic peptide-based vaccine against the sporozoite stage of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum* [J]. J Immunol, 1988, 140(2): 626-633.
- [15] Herrington DA, Clyde DF, Davis JR, et al. Human studies with synthetic peptide sporozoite vaccine (NANP) 3-TT and immunization with irradiated sporozoites [J]. Bull WHO, 1990, 68(Suppl): 33-37.
- [16] Lise LD, Mazier D, Jolivet M, et al. Enhanced epitopic response to a synthetic human malarial peptide by preimmunization with tetanus toxoid carrier [J]. Infect Immun, 1987, 55(11): 2658-2661.
- [17] Que JU, Cryz Jr SJ, Ballou R, et al. Effect of carrier selection on immunogenicity of protein conjugate vaccines against *Plasmodium falciparum* circumsporozoites [J]. Infect Immun, 1988, 56(10): 2645-2649.
- [18] Fries LF, Gordon DM, Schneider I, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of a *Plasmodium falciparum* vaccine comprising a circumsporozoite protein repeat region peptide conjugated to *Pseudomonas aeruginosa* toxin A [J]. Infect Immun, 1992, 60(5): 1834-1839.
- [19] Qian F, Reiter K, Zhang Y, et al. Immunogenicity of self-associated aggregates and chemically cross-linked conjugates of the 42 kDa *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 [J]. PLoS One, 2012, 7(6): e36996.
- [20] Stanisic DI, Martin LB, Liu XQ, et al. Analysis of immunological nonresponsiveness to the 19-kilodalton fragment of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium yoelii*: rescue by chemical conjugation to diphtheria toxoid (DT) and enhancement of immunogenicity by prior DT vaccination[J]. Infect Immun, 2003, 71(10): 5700-5713.
- [21] Wu Y, Przysiecki C, Flanagan E, et al. Sustained high-titer antibody responses induced by conjugating a malarial vaccine candidate to outer-membrane protein complex [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(48): 18243-18248.
- [22] Kubler-Kiel J, Majadly F, Wu Y, et al. Long-lasting and transmission-blocking activity of antibodies to *Plasmodium falciparum* elicited in mice by protein conjugates of Pfs25 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(1): 293-298.
- [23] Qian F, Aebig JA, Reiter K, et al. Enhanced antibody responses to *Plasmodium falciparum* Pfs28 induced in mice by conjugation to exoprotein A of *Pseudomonas aeruginosa* with an improved procedure [J]. Microbes Infect, 2009, 11(3): 408-412.
- [24] Kubler-Kiel J, Majadly F, Biesova Z, et al. A bicomponent *Plasmodium falciparum* investigational vaccine composed of protein-peptide conjugates [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(3): 1172-1177.

(收稿日期: 2011-12-15 编辑: 衣凤芸, 杨频)