

從感染防治的未來需求看 黴菌疫苗發展的現況與挑戰

顏佳瑩 潘建雄

國家衛生研究院 感染症與疫苗研究所

背 景

像病毒和細菌感染一樣，黴菌感染也可能對人類健康造成危害。全球大約有四百萬種不同的黴菌，其中三百種已經確定為人類病原體。即使現在已有抗黴菌藥物可供治療，但根據世界衛生組織的統計，全球每年仍有大約一百五十萬人死於黴菌感染。其中最常見的致病性黴菌有念珠菌 (*Candida*)、麴黴菌 (*Aspergillus*)、白黴菌 (*Mucormycosis*) 和隱球菌 (*Cryptococcus*)。侵襲性念珠菌感染高風險族群通常包括廣效抗生素使用者、免疫低下或器官移植病人、醫院靜脈導管或腹腔手術的患者。侵襲性念珠菌症 (invasive candidiasis) 是院內血流黴菌感染中最常見的一種，而且死亡率可以高達 40% 以上。目前，藥物治療是對抗黴菌疾病的唯一選擇，但是現有的抗黴菌藥物有副作用

與抗藥性的問題，尤其在抗藥性強大的耳念珠菌 (*Candida auris*) 出現後，未來防治黴菌感染會更棘手。所以從長期黴菌感染防治的觀點來看，確實需要研發其他替代療法，如免疫療法。而發展黴菌疫苗是有效降低黴菌感染死亡率的方法之一。

抗黴菌藥物的應用與限制

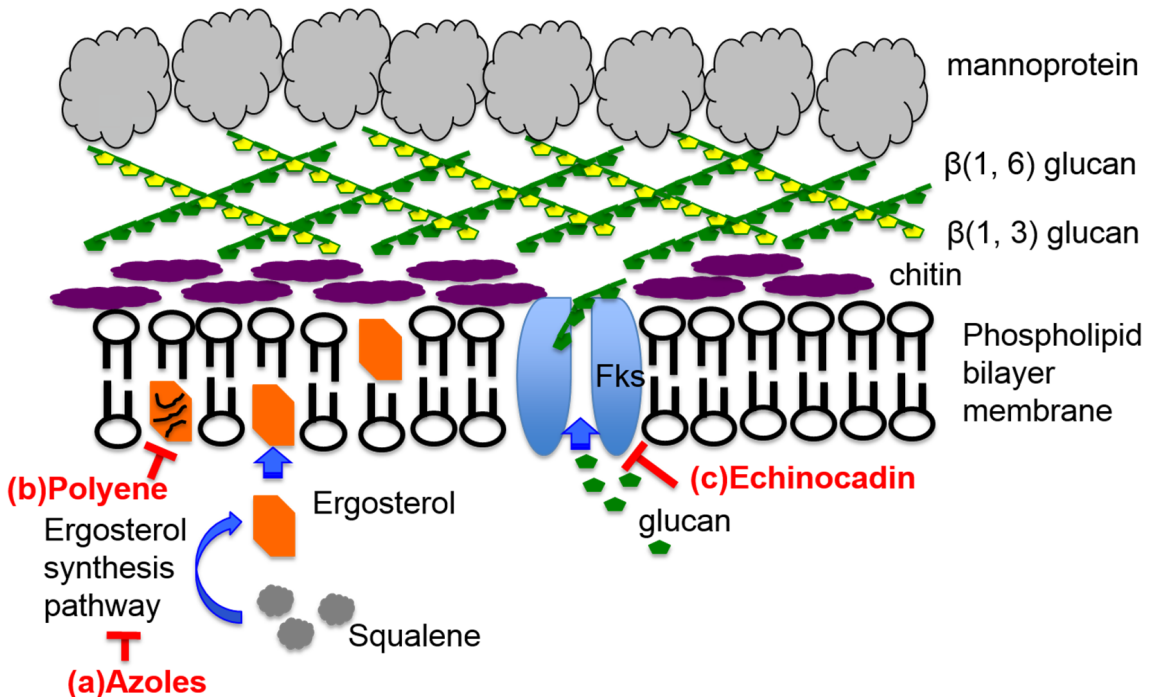
目前處方的三大類抗黴菌藥物是azole類 (fluconazole, itraconazole, posaconazole, voriconazole)，polyene類 (amphotericin B 和其脂質劑型)，echinocandin類 (anidulafungin, caspofungin, micafungin)，其作用原理都是去破壞黴菌的細胞膜或細胞壁的作用而可抑制黴菌生長，其藥物作用機制說明如圖一。這些抗黴菌藥物的作用範圍狹窄，只對某些黴菌物種有效，並且常常引起副作用如

polyene 的藥物 amphotericin B 常見的副作用就是腎毒性，因此腎功能不全的病人使用上就要更審慎評估 [1]，而 azoles 藥物長期使用下會增加發生肝毒性的機率，且還會有賀爾蒙分泌失調的不良影響 [2]。而 caspofungin 是 echinocandins 類的第一種靜脈注射藥物，也被發現有發燒、頭痛、過敏反應和血管炎的副作用產生 [3]。除了副作用外，抗黴菌藥物的最大問題是抗藥性的產生，抗藥性的菌株常因不恰當使用抗黴菌藥物，例如用量或治療時間不足等，造成的抗藥性增加，或者農漁業使用 azole 類藥物過

度等。開發和使用黴菌疫苗可以幫助減少對藥物的使用，以減緩抗藥性黴菌的形成，被認為是未來預防黴菌感染重症的有力工具。

發展中的黴菌疫苗

在過去數十年間，許多不同的抗黴菌實驗性疫苗已經在動物實驗研究中，但只有少數進行臨床測試。目前的抗黴菌疫苗研發著重於特定的病原菌株，大部分的研究都集中在最常見的致病菌株 - 白色念珠菌 (*Candida albicans*)。白色念珠菌是人體的腸道



圖一 Azoles 和 Polyene 以及 Echinocandins 這三種抗真菌藥物的作用機制。(a) Azoles 經由抑制麥角固醇 (Ergosterol) 在黴菌細胞膜的合成，而可提高細胞滲透性。(b) Polyenes 通過結合麥角固醇，破壞細胞膜並形成孔道。(c) Echinocandins 抑制 1,3-β-d-葡聚糖合成酶 (FKS 1/2)，造成細胞壁的破壞。

共生菌之一，超過 70% 人體內都有白色念珠菌存在，它造成的伺機性感染主要是引起侵襲性念珠菌症及在口腔或生殖道引起黏膜性念珠菌症。而黴菌疫苗主要目標就是增強高風險族群對黴菌抗原的特異性免疫反應，以引發保護性免疫記憶對抗黴菌感染。以白色念珠菌疫苗研究情形來說，目前已有許多研究成果，本文將疫苗分成四大類來做介紹分別是 (1) 減毒活菌疫苗，(2) 重組蛋白疫苗，(3) 糖鏈化合物疫苗，以及 (4) 其他的疫苗研發策略。並且依抗原類型的不同整理出念珠菌疫苗的發展如表一。

一、減毒活菌疫苗

一般來說，減毒活疫苗會引起

輕微的副作用，但持久的保護性免疫記憶。大多數現有的病毒疫苗（如黃熱病、麻疹、水痘）和一些細菌疫苗（如 BCG）基本上都是減毒的。念珠菌減毒疫苗也做了許多研發，簡單來說，念珠菌有酵母形態和菌絲形態，其中菌絲形態的較具有致病性 [4]，圖二表示出菌絲型態念珠菌如何由上皮細胞侵入組織到散佈於血液中最後定殖穿透到內皮層的過程。一些缺乏菌絲形態的相對低毒性的念珠菌株（例如 PCA-2、CNC13、RML2U 和 tet-NRG1）在小鼠接受低毒性念珠菌免疫之後可保護小鼠免受隨後的致命全身性感染 [5]。儘管在基礎研究層面有成功的案例，但目前這些候選疫苗沒有進入臨床試驗階段。可能的原

表一 依抗原類型分類的念珠菌疫苗發展

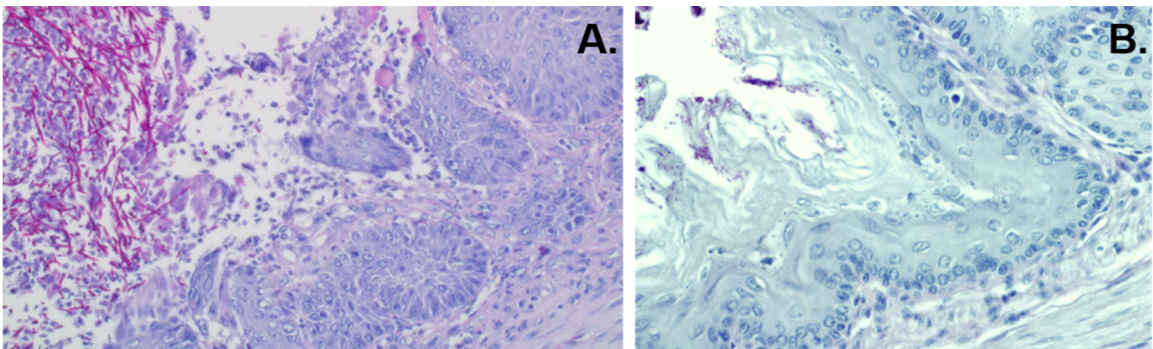
抗原的類型	描述	臨床試驗階段	非念珠菌交叉保護的微生物	文獻出處
減毒活菌	PCA-2		<i>S. aureus</i>	[17]
	cph1D/efg1D			[18]
重組蛋白	Als1p-N	Phase I b/2a	<i>S. aureus</i>	[19]
	NDV-3 (Als3p-N)			[9]
	PEV7 (Sap2p)	Phase I		[13]
	C-terminus of Hsp90 (Mycograb)			[20]
	N-terminus of Hyr1 (rHyr1p-N)		<i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> and <i>C. tropicalis</i>	[21]
糖鏈化合物	Lam-CRM197			[22]
	Lam-CRM197 coupled with MF59			[22]
死菌	<i>S. cerevisiae</i> yeast (HKY)		<i>A. fumigatus</i> , <i>C. grubii</i> , and <i>C. posadasii</i>	[23]
胜肽	Fba or peptide Met6 protein			[24]
	mvPC with RS09			[16]

因包括這些菌株的特徵很複雜，而減毒疫苗株在人體的活性及穩定性無法完全控制，且不建议使用活的疫苗菌株接種免疫功能低下的患者。然而，免疫功能低下的患者正是需要疫苗保護的人群，因此應用會受到限制。

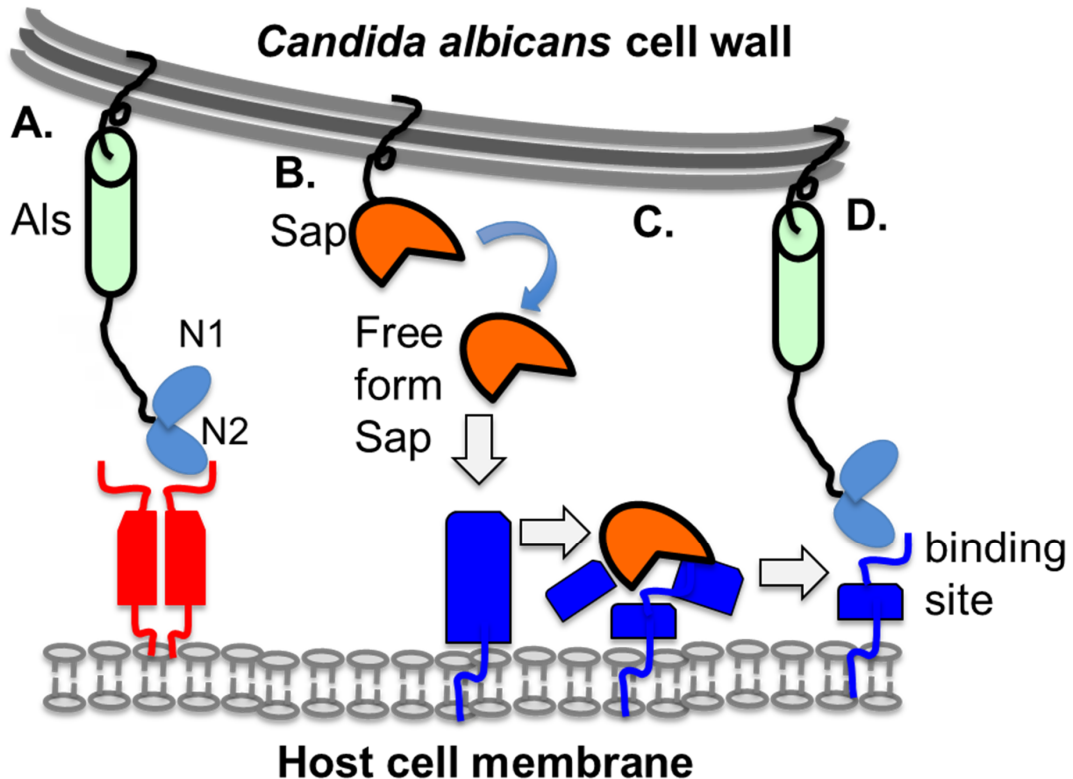
二、重組蛋白

重組蛋白疫苗被認為比活的念珠菌疫苗更安全，因為它們不含任何傳染性。這使得重組蛋白疫苗更適合免疫功能低下的人。通常，這種疫苗策略專注於黴菌表面蛋白質作為抗原，其中 ALS (agglutinin-like sequence) 蛋白和 SAP (secreted aspartyl proteinase) 蛋白在念珠菌黏附及侵入上皮細胞過程中扮演重要角色（圖三）。ALS 蛋白位於菌絲形態的念珠菌表面，目前已有幾種使用 ALS 重組蛋白的疫苗用於對抗侵襲性念珠菌病研究，包括 Als1p 和 Als3p。以 rAls1p-N 為

例，它是只有 Als1p N 端的重組蛋白，從酵母菌表現系統中生產並純化，使用時需加入佐劑。在使用不同劑量的 rAls1p-N 免疫後，再給予致死劑量攻毒後 21 天的存活率有 50-57%，在免疫功能正常和免疫不全的小鼠中都有效 [6]。使用另一種 Als3 蛋白的 N 端片段 (rAls3p-N) 作為疫苗抗原，接種後發現有更強的抗體反應和存活率，比用全長 Als3p 的疫苗更有效 [7]。此外，rAls3p-N 疫苗還有另一個優點，可以同時預防金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 感染，因為 *C. albicans* Als3 的蛋白結構與 *S. aureus* 表面的凝集因子 (clumping factor) 類似 [8]。NDV-3A 疫苗是 rAls3p-N 重組蛋白加上鋁鹽佐劑 (alhydrogel) 配製的，在臨床 I 期試驗中看到了抗體濃度升高 [9]。在臨床二期試驗中，評估此疫苗在女性的復發性黴菌陰道炎 (recurrent



圖二 具有菌絲型態的念珠菌較具有組織侵略性。以會形成菌絲的白色念珠菌株 SC5314 (A) 及不會形成菌絲的 HLC54 突變株 (B) 感染免疫不全小鼠的腸胃道，其胃的組織切片圖顯示，兩種白色念珠菌皆會附著在胃黏膜上皮層，但只有 SC5314 形成菌絲（紫紅色）並穿透和侵入上皮層，最終播散到血液中。



圖三 在白色念珠菌黏附細胞的過程中，Als 蛋白和 Sap 蛋白扮演著重要的角色。Als 蛋白的 N 端區域位於白念珠菌細胞壁外側，會與宿主細胞外基質中的蛋白質結合（A）。當 Sap 蛋白轉變為游離態的 Saps（Free form Sap），它會作用於宿主細胞表面的蛋白質（B），導致宿主細胞表面的蛋白質被降解，從而暴露出它們的 C 末端（C）。這一過程增強了 Als 蛋白引導的細胞黏附過程（D）。

vulvovaginal candidiasis, RVVC) 的免疫治療是有效力的 [10]。在測試 NDV-3A 對 *C. auris* 的保護效力方面，實驗研究顯示疫苗接種的小鼠中形成的抗 Als3 抗體與 *C. auris* 有交叉反應，可阻止生物膜的形成及恢復巨噬細胞的黴菌清除功能 [11]，因此 NDV-3A 是一個非常有潛力的疫苗候選者，可用於預防 *C. albicans* 和 *C. auris* 感染。另一個進入臨床試驗的重組蛋白抗原是 SAP 蛋白。

SAP 是一群 *C. albicans* 的分泌蛋白，有十種 (Sap1-10)，它們在上皮和內皮細胞黏附、入侵以及代謝中扮演重要角色。其中，Sap2 是表達最多的 SAP 蛋白。對大鼠進行重組蛋白 Sap2 的陰道或鼻腔免疫，不管是否加入佐劑，都可使念珠菌陰道感染被消除 [12]。PEV7 疫苗是把部分 Sap2 蛋白抗原 (77-400 個氨基酸) 嵌入到流感病毒囊泡的雙脂層中，實驗中發現它可以有效地防止陰道念珠菌感

染 [13]。進入臨床試驗的 NDV-3 和 PEV7 疫苗是目前最有潛力成功的念珠菌疫苗。

三、醣鏈合物

接合性疫苗 (conjugate vaccine) 是一種將弱抗原與強抗原結合起來的疫苗技術，這樣可以讓免疫系統對弱抗原產生更強烈的反應。將蛋白質與多醣體結合可以幫助免疫系統更容易地識別念珠菌細胞壁醣基部分，從而讓抗體能夠快速識別病原體。例如 lamunarin-CRM conjugation 是一種將從褐藻 *Laminaria digitata* 中提取的 β -葡聚醣（也是念珠菌細胞壁醣基）與免疫原性很強的白喉毒素 CRM197 這種載體蛋白結合起來的共價接合物。研究證明，這種 Lam-CRM 共價接合物對 *C. albicans* 引起的侵襲性和黏膜性感染具有免疫原性和保護作用 [14]，可以作為預防性疫苗使用。然而，這類疫苗目前仍處於研究階段，尚未進入臨床試驗。

四、其他的疫苗研發策略

目前有許多實驗室正在研究其他的疫苗策略。其中，相較於減毒疫苗，死菌疫苗因為其安全性高、製備成本低，成為對抗念珠菌疫苗的候選選項之一。如皮下接種熱殺死的 *S. cerevisiae* 酵母 (HKY) 提供了對 *C. albicans*、*A. fumigatus* 和 *Coccidioides posadasii* 感染的交叉保護 [15]。此外，多肽疫苗是只

帶有抗原蛋白中重要的抗原表位 (epitope)，能引起保護性免疫反應。Tarang 等人篩選了整個念珠菌蛋白質組 (6030 種蛋白質)，並分析潛在的 HLA I 類 / HLA II 類 T 細胞抗原表位和 B 細胞抗原表位，選定了 18 個最有免疫優勢的抗原表位，加上合成的佐劑 (RS09) 形成多肽疫苗 (mvPC)，可增強免疫原性 [16]。雖然尚未有動物或臨床實驗證明此候選疫苗對抗念珠菌病的功效，但是所選的抗原表位與當前使用的 22 種白色念珠菌菌株的序列相似，從而提供更廣的保護能力，因此仍然值得期待。另外，由於現今疫苗技術進步，包括核酸疫苗和微奈米疫苗技術也被應用於黴菌疫苗的研究和開發中。微奈米疫苗技術是將抗原與微米 - 奈米大小的顆粒結合，利用樹狀細胞和巨噬細胞可吞噬微奈米大小顆粒的特性，讓這些細胞吞入抗原後可以進行抗原呈現和活化免疫反應。例如，磷脂酰膽鹼 (phosphatidylcholine) 和膽固醇 (cholesterol) 所合成的脂質體 (liposomes) 等奈米粒子被用來攜帶白色念珠菌中所提取的甘露聚醣 (mannans) [17]，被證實是一種有效的疫苗。此外，也有研究使用不同的微米粒子作為黴菌疫苗的載體，例如聚乙烯醇、聚甲醛、明膠微球和聚乳酸微球等，這些載體能夠提高疫苗的穩定性和生物利用度，從而提高其免疫原性和保護效果。除了抗原和疫苗載體外，佐劑的作用是可進一步激活 T

細胞或 B 細胞，從而增強免疫反應，因此開發奈米或微米態的佐劑可以增強免疫原的抗原性而增強疫苗的免疫反應。此外，現在最熱門的核酸疫苗技術，也可能進一步增強黴菌疫苗的保護效果。

總體來說，目前有多種黴菌疫苗的研發策略，包括活菌疫苗、死菌疫苗、多肽疫苗、重組蛋白疫苗和基因工程疫苗等，並且微奈米技術也被應用於黴菌疫苗的研究和開發中。未來，隨著疫苗技術的不斷發展和完善，相信將會有更多的黴菌疫苗被開發出來，為人類對抗黴菌感染提供更多有效的治療選項。

黴菌疫苗開發的挑戰

由於黴菌感染會侵入並發生在免疫功能低下的個體中，開發一種同樣對健康和免疫功能較弱個體有效的疫苗是非常具有挑戰性的。迄今為止，如何在免疫低下的個體產生足夠的疫苗保護力仍是非常困難的事，這有賴未來疫苗技術的進步。另一個問題是，有些黴菌，如腸道中的白色念珠菌不只是伺機感染的病原菌，它同時也是人類的共生菌，與其他腸道共生菌一起與宿主維持互惠關係，而且在調控腸道細菌平衡扮演重要角色。在這種情況下，在人體接種黴菌疫苗是否會引發體內腸菌相的不平衡而造成不利的影響需要更多的研究來釐清。

參考文獻

- Gallis HA, Drew RH, Pickard WW: Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis* 1990;12:308-29.
- Benitez LL, Carver PL: Adverse Effects Associated with Long-Term Administration of Azole Antifungal Agents. *Drugs* 2019;79:833-53.
- Kounis NG: Caspofungin-induced fatal complete heart block: Another manifestation of Kounis syndrome. *J Pharmacol Pharmacother* 2013;4:161-2.
- Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, et al: Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 1997;90:939-49.
- Saville SP, Lazzell AL, Chaturvedi AK, et al: Efficacy of a genetically engineered *Candida albicans* tet-NRG1 strain as an experimental live attenuated vaccine against hematogenously disseminated candidiasis. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:430-2.
- Ibrahim AS, Spellberg BJ, Avanesian V, et al: The anti-*Candida* vaccine based on the recombinant N-terminal domain of Als1p is broadly active against disseminated candidiasis. *Infect Immun* 2006;74:3039-41.
- Spellberg BJ, Ibrahim AS, Avanesian V, et al: Efficacy of the anti-*Candida* rAls3p-N or rAls1p-N vaccines against disseminated and mucosal candidiasis. *J Infect Dis* 2006;194:256-60.
- Spellberg B, Ibrahim AS, Yeaman MR, et al: The antifungal vaccine derived from the recombinant N terminus of Als3p protects mice against the bacterium *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2008;76:4574-80.
- Schmidt CS, White CJ, Ibrahim AS, et al: NDV-3, a recombinant alum-adsjuvanted vaccine for *Candida* and *Staphylococcus aureus*, is safe and immunogenic in healthy adults. *Vaccine* 2012;30:7594-600.
- Edwards JE, Jr., Schwartz MM, Schmidt CS, et al: A Fungal Immunotherapeutic Vaccine (NDV-3A) for Treatment of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis-A Phase 2 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clin Infect Dis* 2018;66:1928-36.
- Singh S, Uppuluri P, Mamouei Z, et al: The NDV-3A vaccine protects mice from multidrug resistant *Candida auris* infection. *PLoS Pathog* 2019;15:e1007460.

12. De Bernardis F, Boccanera M, Adriani D, et al: Intravaginal and intranasal immunizations are equally effective in inducing vaginal antibodies and conferring protection against vaginal candidiasis. *Infect Immun* 2002;70:2725-9.
13. De Bernardis F, Amacker M, Arancia S, et al: A virosomal vaccine against candidal vaginitis: immunogenicity, efficacy and safety profile in animal models. *Vaccine* 2012;30:4490-8.
14. Torosantucci A, Bromuro C, Chiani P, et al: A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp Med* 2005;202:597-606.
15. Stevens DA, Clemons KV, Liu M: Developing a vaccine against aspergillosis. *Med Mycol* 2011;49:170-6.
16. Tarang S, Keshewani V, LaTendresse B, et al: In silico design of a multivalent vaccine against candida albicans. *Sci Rep* 2020;10:1066.
17. Han Y, Cutler JE: Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect Immun* 1995;63:2714-9.
18. Bistoni F, Vecchiarelli A, Cenci E, et al: Evidence for macrophage-mediated protection against lethal *Candida albicans* infection. *Infect Immun* 1986;51:668-74.
19. Yang YL, Wang CW, Chen CT, et al: Non-lethal *Candida albicans* cph1/cph1 efg1/efg1 mutant partially protects mice from systemic infections by lethal wild-type cells. *Mycol Res* 2009;113:388-90.
20. Matthews R, Burnie J: Cloning of a DNA sequence encoding a major fragment of the 47 kilodalton stress protein homologue of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 1989;51:25-30.
21. Luo G, Ibrahim AS, French SW, et al: Active and passive immunization with rHyr1p-N protects mice against hematogenously disseminated candidiasis. *PLoS One* 2011;6:e25909.
22. Wang XJ, Sui X, Yan L, et al: Vaccines in the treatment of invasive candidiasis. *Virulence* 2015;6:309-15.
23. Capilla J, Clemons KV, Liu M, et al: *Saccharomyces cerevisiae* as a vaccine against coccidioidomycosis. *Vaccine* 2009;27:3662-8.
24. Xin H, Glee P, Adams A, et al: Design of a mimotope-peptide based double epitope vaccine against disseminated candidiasis. *Vaccine* 2019;37:2430-8.
25. Estela RB, Rosa Isela AS, Karina CP: Molecular mechanisms of resistance to antifungals in *Candida albicans*. *Infect Dis* 2021. doi: 10.5772/intechopen.96346.
26. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, et al: *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* 2011;10:112-22.
27. Salgado PS, Yan R, Taylor JD, et al: Structural basis for the broad specificity to host-cell ligands by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:15775-9.