

# 病毒载体用于生物防御性疫苗的开发

刘耀文编译

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

**摘要:** 对于生物恐怖袭击和生物武器的日益关注,促进了针对大量有机体、毒素和病毒疫苗的研究和开发。目前,已开发了 DNA 载体、减毒的活病毒和细菌、与佐剂结合的重组蛋白,以及病毒或细菌为载体的疫苗,用于应对生物恐怖袭击和生物武器的潜在威胁。应用病毒,如腺病毒、痘病毒、委内瑞拉马脑炎病毒等作为疫苗载体也有效用于生物恐怖袭击和生物战剂的预防。本文主要介绍不同的病毒载体及其作用。

**关键词:** 疫苗; 病毒载体; 生物防御; 生物恐怖袭击

**中图分类号:** R457.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2006)01-0046-04

## 1 引言

目前,针对可能的生物武器及生物恐怖袭击,开发有效的抗血清、疫苗及药物正倍受关注。美国变态反应及感染性疾病学会(NIAID)将生物有机体及毒素分为 A, B, C 三大类,本文将讨论有关 A, B 两类主要病原体的疫苗。针对不同病原体的疫苗有如下三种:(1)来源于纯化的裸露 DNA。构建和纯化 DNA 疫苗较为容易,但由于接种者抗体反应轻及染色体整合等问题限制了其发展;(2)疫苗由灭活的病毒、细菌或重组蛋白制备。佐剂的发展极大地改善了此类疫苗蛋白的免疫原性,生物技术的进步促进了重组亚单位疫苗的应用;(3)疫苗以减毒活病毒或细菌作为载体,在接种者体内表达疫苗基因。活减毒疫苗的优点在于仅需一次接种即可刺激保护性免疫反应的产生。细菌载体,特别是沙门菌,已用于制备生物防御性疫苗。病毒构建的生物防御疫苗可分为两类:一类由具有复制能力的病毒组成,如嵌合体病毒;另一类由复制缺陷病毒组成,如复制子。本文将重点阐述应用病毒作为载体开发生物防御疫苗。

## 2 痘病毒载体用于开发生物防御疫苗

### 2.1 牛痘病毒载体疫苗

牛痘病毒(VV)属于痘病毒家族,后者是一种复杂的 DNA 病毒大家族,可分为昆虫痘病毒和脊椎动物痘病毒两个亚家族,其中的正痘病毒属包括猴痘、

骆驼痘、VV 等,鸟痘病毒属则包含金丝雀痘和禽痘病毒。多种痘病毒可用来构建疫苗载体,从而增加了应用病毒开发生物防御疫苗的可行性。

**2.1.1 痘病毒为载体的拉萨热疫苗** NIAID 将病毒性出血热(VHF)病毒归为 A 类病原体,由于 VHF 病毒可呈气溶胶形式扩散,具有很高的致病性,在培养细胞中易生长,是制备生物武器和生物恐怖袭击的理想原料。VHF 病毒包括拉萨热病毒(LSV)、埃波拉出血热病毒(EBOV)、马尔堡病毒(MBGV)、首尔(Seoul)病毒(SEOV)和裂谷热病毒(RVSV)等多种。LSV 是拉萨热的病原体,属沙粒病毒家族的成员,1969 年在西非首次发现。拉萨热通过吸入含 LSV 的啮齿类动物排泄物的粉尘而患病。致死率为 15%~20%,预防 LSV 的 VV 载体疫苗已经构建,在 VV 的 NYBH 株上表达 LSV 前体膜糖蛋白(LSGPC)的基因。将 V-LSGPC 疫苗接种于非人的灵长类动物(NHP),研究表明,VV 为载体的 LSV 疫苗可预防人类患严重的拉萨热及死亡,但不能完全防止发热。增加 VV 载体疫苗的免疫原性可有效预防该病。

**2.1.2 痘病毒为载体的埃波拉出血热疫苗** EBOV 于 1976 年首次在非洲人群中发现,导致埃波拉出血热的爆发,造成对中非、西非人群健康的严重威胁。已构建了针对出血热致病菌的疫苗,并评价了其动物的免疫原性和保护效应。接种表达 EBOV GP 基因的疫苗可对豚鼠产生保护效应,而表达其他病毒基因(NP, VP35, VP40 和可溶性 GP)的疫苗对豚鼠无保护作用。将相同的重组 vGP 接种于 NHP, 6~7 d 后动物受 1 000 PFU 的 EBOV 感染而死亡。将其他基因插入 VV, 在 NHP 中评价其效应,可能有助于

收稿日期:2005-11-11

作者简介:刘耀文,女,硕士,助理研究员,研究方向:药学, Tel:010-66931618, E-mail:liuyaowen618@sohu.com

发现对人类有用的候选疫苗。

**2.1.3 痘病毒为载体的委内瑞拉马脑炎疫苗** 委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)在美洲中、南部的热带国家流行。通过受感染蚊子的叮咬而传播,属囊膜病毒家族中的一种 $\alpha$ 病毒。目前可用于人类的疫苗有TC-83,但超过40%的接种者有不良反应产生。一种活的减毒VEEV疫苗V3526已开发用于替代TC-83,目前正在准备进行临床试验。针对气溶胶的保护效应是将其作为生物防御疫苗的关注重点。将VV中插入一个VEEV结构蛋白基因的上游启动子,使蛋白表达增加3.59倍。疫苗可保护所有小鼠免受皮下感染,但20%小鼠不能避免气溶胶侵袭。对此类疫苗制剂的免疫效应仍需进一步评价。

**2.1.4 痘病毒为载体的汉塔病毒疫苗** 汉塔病毒(Hantaviruses)是布尼病毒科(Bunyaviridae)家族的成员,通过接触含病毒的啮齿类动物的尿液和排泄物而传染给人类,出血热肾病综合征(HFRS)等由汉塔病毒引起,该病毒在全世界都可发现,目前尚无FDA批准的疫苗。由于该病毒气溶胶稳定且易感染,因此,NIAID将之列为A类病原体,表达汉塔病毒NP和GP基因的重组VV(HTNV)已经被作为防御动物体内不同汉塔病毒的疫苗。I期临床试验显示,表达G1,G2和NP蛋白的重组VV(Con株)可刺激对HTNV产生反应的中和抗体。增强VV载体疫苗的免疫原性可使之更有预防效应。

**2.1.5 痘病毒为载体的炭疽疫苗** 炭疽是与食草动物有关的疾病,呼吸道、胃肠道和皮肤炭疽可由于在加工动物制品时吸入或误食了污染肉中的芽孢,或开放性伤口暴露于芽孢中。吸入或胃肠道摄入炭疽而未经治疗者病死率几乎为100%,皮肤接触者为25%。致病性B型炭疽含有两种毒性相关的质粒,质粒pXO1编码荚膜抗原抑制巨噬细胞的功能,另一种质粒pXO2编码炭疽毒性基因和致死性毒素。将B型炭疽作为生物武器构成的威胁促使NIAID将之确定为A类病原体,目前注册用于人类的疫苗有6种原始菌株,每年增强一次,可使30%的接种者产生免疫反应,接种少者免疫反应小,加强接种更有效,对于危险人群应尽早接种。新的重组VV载体炭疽疫苗是将B型炭疽杆菌的保护性(PA)抗原基因克隆入VV的Con株和WR株,WR-PA可持续诱导高滴度的抗体产生。WR-PA接种的小鼠和猪的保护率分别为60%和50%。还需进一步实验以确定是否该疫苗可刺激兔的保护性免疫,以确

定炭疽疫苗的有效性。

**2.1.6 痘病毒为载体的布氏杆菌疫苗** 布氏杆菌病也称为波状热和地中海胃型弛张热,由布氏杆菌的7种胞内细菌之一引起,是世界上最重要的人兽共患疾病之一。NIAID将这7种都列为B类病原菌。其中有4种是人类的致病菌,导致非特异性发热性疾病,不经治疗者病死率为2%~5%。目前,涉及布氏杆菌的疫苗研究主要应用表达流产布氏杆菌(*Brucellosis abortus*)的18 ku的外膜蛋白重组VV,小鼠接种后可产生针对18 ku蛋白的特异性抗体。

## 2.2 浣熊痘病毒为载体的鼠疫疫苗

鼠疫耶尔森菌是鼠疫的主要致病菌,属A类病原菌。表达鼠疫耶尔森菌F1荚膜抗原的重组浣熊痘病毒(RCN)是由野生型RCN和编码F1的穿梭载体构建的。鼠疫耶尔森菌气溶胶致病性高,患者咳嗽、恐怖分子的故意释放等可导致许多初发或继发的感染。应用一种 $\alpha$ 病毒复制载体表达鼠疫耶尔森菌F1和V抗原的可溶性蛋白,可使80%的小鼠免受鼠疫耶尔森菌气溶胶的感染。但仍需进一步开发能完全预防该病的疫苗。

## 3 $\alpha$ 病毒作为生物防御的疫苗载体

$\alpha$ 病毒是囊膜病毒家庭成员,已成功地用于构建生物防御疫苗。辛德比病毒(SINV)-复制子、VEEV-复制子、塞姆利基森林病毒(SFV)-复制子已被修饰用于表达外源蛋白,对于开发生物防御疫苗至关重要。包含其他病毒基因的嵌合型 $\alpha$ 病毒已用于疫苗的开发,这些嵌合型病毒与复制载体的不同在于,嵌合型病毒具有复制能力而复制子载体无复制能力,由于其不含有结构蛋白基因,应用有复制能力的嵌合型病毒可降低接种所需剂量,引发出针对单种疫苗的保护性免疫反应。

### 3.1 辛德比病毒载体疫苗

SINV是最小的人类致病性 $\alpha$ 病毒之一,在欧洲、亚洲、美洲和澳大利亚发现,是由蚊子传播的鸟类病毒,SINV-复制子聚集于病毒样颗粒(VLP)中,通过在培养细胞中共转染SINV-复制RNA和编码所有结构基因的辅助RNA,感染VLP的培养细胞中外源基因的高水平表达,刺激动物体内的保护性免疫反应,使SINV-复制子成为有发展前景的疫苗载体。

**3.1.1 辛德比病毒为载体的裂谷热疫苗** 裂谷热病毒(RVSV)是一种静脉病毒(白蛉病毒属),是布尼病毒家族的成员,属A类病原体,致病性高。最初

于1930年在非洲撒哈拉地区分离出来。这种以蚊子为媒介的动物性传染病可传染给人类,是类似于流感的发热性疾病,病死率为0.5%。RVFV也可感染动物,如导致羊、牛等孕期动物流产,动物死亡率为5%~60%,感染动物中病毒滴度高,由于蚊子叮咬而染病,造成病毒复制,继而感染人类。因此,除成为生物武器和有生物恐怖袭击危险之外,该病原体可对国家的工农业产生巨大影响。接种RVFV-SINV嵌合型病毒的小鼠对致死性RVFV感染可产生50%的保护性效应。因此,应用有复制特性的病毒作为疫苗载体具有应用前景。

**3.1.2 辛德比病毒为载体的委内瑞拉马脑炎病毒疫苗** SINV的另一用途是用来开发针对VEEV的疫苗,通过将VEEV的GP基因插入SINV复制子构建而成,这种嵌合型病毒SIN-83具有复制能力,毒性减低且对小鼠有免疫原性。接种后可防止小鼠受到VEEV感染。

**3.1.3 辛德比病毒为载体的汉塔病毒疫苗** SINV复制子表达SEOV的NP基因(pSINrep5-S)或GP基因(pSINrep5-M),SEOV是导致HFRS的汗塔病毒,接种pSINrep5疫苗的仓鼠可产生特异性抗体对复制表达的蛋白产生反应。由于无汉塔病毒感染的动物模型,确定此病毒相关疾病的疫苗仍是问题,测定感染动物血液或组织中的病毒血症可能有助于确定疫苗的效应,但无法真正反映疫苗对于人体的疗效,进行动物模型的研究可能有助于解决这一问题。

### 3.2 以委内瑞拉马脑炎病毒为载体的疫苗

VEEV-复制载体已用于制备针对多种细菌、病毒和毒素的疫苗。近期构建的VEEV和SINV嵌合型病毒和嵌合复制子已经用于疫苗的开发。VEEV-SINV嵌合型抗体具有复制能力,而VEEV-SINV嵌合型复制子缺乏复制能力,两种都高度减毒,对于小鼠没有致病性,应用复制缺陷的VEEV-SINV嵌合复制子可能增加疫苗载体的免疫力和安全性。

**3.2.1 以VEEV为载体的埃波拉出血热和马尔堡病毒疫苗** EBOV疫苗以VEEV为载体,将其结构基因VP24,VP30,VP35,VP40,GP或NP插入VEEV复制子构建而成。NHP接种疫苗后不能预防EBOV感染。尚需进一步研究,确定应用于人类的疫苗。马尔堡病毒类似EBOV,是一种丝状病毒,属于丘状病毒家族。归入A类病原体,尚未报道用于生物武器,但有气溶胶扩散和作为恐怖武器的可能。最初于1967年确定,在非洲东南部是一种散发性疾病,

疫苗开发策略与EBOV疫苗相似。

**3.2.2 以VEEV为载体的拉萨热和埃波拉出血热疫苗** 研究结果显示,细胞免疫反应对于预防拉萨热是必需的。为评价联合型EBOV和LSV疫苗的效应,将LGP+EGP或LGP/EGP接种豚鼠,结果表达EGP的复制子不能保护豚鼠免受LSV感染,反之,LGP不能保护动物免受EBOV感染,其余研究揭示了由混合型复制子可双重启动复制疫苗的保护性机制,可能有助于明确该方法应用于人类的潜力。

**3.2.3 以VEEV为载体的葡萄球菌肠毒素B疫苗** 多数食物中毒和医院内感染是由金黄色葡萄球菌引起的,产生的外毒素也称肠毒素,由于主要在胃肠道发挥效应,导致胃肠道疼痛、腹泻、呕吐,甚至出现致死性中毒性休克症状,葡萄球菌肠毒素B(SEB)在气溶胶状态相对稳定,仅需较低剂量数小时内即可导致感染者出现临床毒性症状,NIAID将其归入B类病原菌,目前尚无疫苗预防。通过将突变SEB基因克隆入VEE复制载体而构建预防疫苗。研究结果显示,VEE复制子可有效刺激细胞和机体的免疫反应。

**3.2.4 以VEEV为载体的肉毒杆菌神经毒素疫苗** 由于肉毒杆菌神经毒素BoNT毒性最强,NIAID将其归入A类病原体,肉毒梭状芽孢杆菌为厌氧菌,可产生7种BoNT血清型中的一种或多种,吸入或误食时可发生弛缓性麻痹,它是由BoNT内毒素造成的疾病。目前,人类疫苗包含7种血清型中的5种(A~E)。肉毒疫苗最初接种三种血清型,分别在0,2,12周接种,其后在1年增强,结果20%接种者可产生免疫反应,疫苗的制造价格昂贵,生产大量的活性毒素需要保证制造过程的安全性。一种针对BoNT血清型A(BoNT/A)的疫苗已开发,接种小鼠可预防BoNT/A的感染,在接种后6~12个月仍保持免疫力,这一结果证实,VEEV-复制子可诱导动物长期的抗体反应。

**3.2.5 以VEEV为载体的炭疽疫苗** 通过将B型炭疽杆菌的PA基因克隆入VEEV复制载体,构建了三种不同的炭疽疫苗,用83 ku的PA疫苗接种小鼠,可完全防止B型炭疽的感染。将PA基因融合入B型炭疽杆菌分泌序列(b-PA)或组织纤维蛋白溶酶原激活物分泌序列(tPA-PA)构建而成的疫苗也获得相似的结果。

**3.3 以塞姆利基森林病毒为载体的Puumala病毒疫苗**

SFV已用于多种基因治疗或疫苗,应用SFV复

制子(SFV-Npuu)作为有效疫苗颇有前景,其优点在于感染细胞表达外源蛋白可达75h,这一延长表达可增强应用此载体疫苗的免疫原性和疗效。

#### 4 腺病毒载体疫苗治疗埃波拉出血热

腺病毒最初于1954年发现,近来被广泛用于作为基因治疗的载体。将一种质粒和表达EBOV蛋白的腺病毒重组用于初次免疫-加强方法接种,以保护动物免受EBOV感染。相似的增强策略用于NHP接种预防EBOV,可使低剂量EBOV感染的所有动物存活,应用初次免疫-加强策略开发EBOV疫苗可能是人类预防EBOV的有效方法。

#### 5 其他可能用于生物防御疫苗开发的载体

一种脊髓灰质炎病毒载体疫苗可引发针对初次接种OVA和脊髓灰质炎病毒免疫小鼠的特异性抗体反应,以曼哥(Mengo)病毒为载体的淋巴细胞性脉

络丛脑膜炎病毒(LCMV)疫苗也可完全防止小鼠受LCMV感染。小鼠肝炎病毒是一种冠状病毒家族成员,用于构建有复制能力的载体,狂犬病毒(RV)和疱疹性口炎病毒(VSV)可构成减毒载体以刺激针对人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的免疫反应。副粘液病毒构建的疫苗载体也用来诱导针对猴-HIV和呼吸道合胞病毒的保护性免疫。

#### 6 结语

目前,已构建了大量病毒载体,用于开发针对生物武器和生物恐怖袭击的疫苗。病毒载体也可用于制造动物疫苗,保护有重要经济影响的动物。病毒载体的优势在于疫苗制备迅速而不需纯化蛋白或佐剂的辅助,持续开发靶向特异免疫效应细胞的疫苗载体可产生具有更强免疫原性和保护效应的疫苗。将病毒载体疫苗与其他类型疫苗相结合,如DNA疫苗、有佐剂的重组蛋白疫苗等,将增强免疫效应。

---

## 会议集锦

---

### 抗肿瘤之战即将结束?

美国肿瘤研究协会主办的2005年全球肿瘤研究大会报道了关于肿瘤病因学、诊断、预防和治疗的最先进展。大会的主要议题包括伊马替尼(imatinib, Gleevec)之后新的小分子抗癌药物的发现,基因组学和蛋白组学作为新的治疗方法的进展,肿瘤诊断、预防中临床分子标志的确定,以及饮食在诱发癌症中的作用等。

近年来,肿瘤的细胞和分子生物学研究发展迅速,为新诊断和治疗试剂的发现提供了巨大的可能性,但如何将基础研究成果转变成具有预防、诊断、治疗价值的产品是目前肿瘤研究中面临的挑战。一些小分子抗癌药物的出现给肿瘤的治疗提供了新的契机。伊马替尼作为单一制剂对慢性粒细胞白血病(CML)和其他癌症疗效显著,但产生明显的耐药性且不能持久对抗晚期癌症。另一种新的抗癌药物AMN-107, CML晚期和早期病人的反应率分别为>70%和>90%。2004年FDA批准血管内皮细胞生长因子(VEGF)抗体贝伐珠单抗(bevacizumab, Avastin),是第一个抗血管生成药物。磷酸肌醇3-激酶(PI3K)和端粒酶都是非常具有前景的设计抗癌药物的分子靶标。目前,可利用小干扰RNA(siRNA)技术阻断特异基因的表达抑制肿瘤生长,然而这种技术还不成熟。初步研究表明,siRNA可以抑制分散性肿瘤的生长。在动物实验中,阻断促肉瘤生长基因EWS-FIL1的siRNA包被在含糖的聚合物中,形成纳米颗粒,然后与转铁蛋白相连,进入肿瘤细胞,可以显著抑制小鼠Ewing肉瘤的生长,有望进入临床试验。在临床上,利用分子标志进行肿瘤的早期诊断仍值得深入研究,最有前景的方法是从唾液和血浆中寻找分子标志。有报道表明,从32例病人的唾液中分离的遗传性分子标志物成功预示了90%口腔鳞癌的发生。未来的研究将扩大样本量,同时应用于其他肿瘤的检测,如卵巢癌和胰腺癌。

肿瘤的早期检测和化学预防手段的进展,特别是在直肠癌中的作用被广泛关注。研究发现,低剂量非甾体类抗炎药塞来昔布、降胆固醇他汀类药物和阿司匹林的联合使用能显著降低浸润和非浸润性腺癌的发病率,在动物实验中能够抑制95%的肿瘤生长。因此,低剂量的联合使用化学预防制剂是一种很有前景的化学预防手段。抗炎药舒林酸能抑制由于缺乏肿瘤抑制基因和不合理膳食导致的肿瘤。尽管将动物实验结果应用于预防人的结肠癌还为时过早,但这些结果将阐明在肠癌的发展中基因和普通营养,以及药物之间的相互关系。

(黄灵芝)