

生物防御用 DNA 疫苗

李培进编译

(军事医学科学院卫生勤务与医学情报研究所, 北京 100850)

摘要: DNA 疫苗的优点包括可快速大量制造、能引起广谱免疫反应、可用非侵入性手段给药等。此外,疫苗还可以表达多种抗原、预先设定诱导的恰当免疫反应等特点。这些优点使 DNA 疫苗成为开发生物防御疫苗的良好途径。本文讨论了潜在的生物防御 DNA 疫苗。

关键词: DNA 疫苗; 生物防御; 免疫调节

中图分类号: R457.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2006)01-0050-03

1 前言

需要开发可能被生物恐怖分子或生物战使用的微生物的生物防御疫苗。这些微生物,包括病毒(如天花)、细菌(如炭疽杆菌)和细菌产生的毒素(如肉毒毒素)。以往,一些疫苗由整个细菌或病毒灭活产生,然而,此种疫苗不良反应发生率很高,已不适合现代使用。其他已开发的疫苗有重组蛋白(如乙型肝炎、破伤风)、减毒活菌(如伤寒、结核)或减毒活病毒(如麻疹、流行性腮腺炎、风疹)。重组蛋白对需要 T 辅助细胞(Th)2 型(体液)免疫反应的疾病非常有效,但对产生细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)相对无效。减毒活菌或病毒,一般能刺激恰当的免疫反应,对特异感染有保护作用,但疫苗中微生物有可能恢复其毒性。DNA 疫苗,也称基因性、核酸或多核苷酸疫苗,可递送编码蛋白抗原的基因到宿主细胞中,使体内产生抗体,其后可产生强的细胞和体液免疫反应。此外,DNA 疫苗的优点是设计协同刺激分子或靶向蛋白产生特异细胞成分,调制免疫反应的特异性。可能创造多价 DNA 疫苗,能够刺激产生抗多种病原体的免疫效应。DNA 疫苗较蛋白疫苗的另一优点是贮存容易,能保持效价。贮存方便和不用注射给药又便于大规模使用。本文将讨论开发 DNA 疫苗的进展和生物防御用疫苗的前景。

2 调节免疫途径

用质粒 DNA 免疫接种可引起细胞性和体液性两种免疫反应。一般来说,直接注射质粒 DNA 引起

编码蛋白的体内合成,其转录后修饰类似自然感染发生的情况。DNA 转染抗原提呈细胞(APC)合成的内源性蛋白,拟似病毒或细胞内细菌感染,通过主要组织相容性复合体(MHC)-I 表达异源性抗原在细胞表面的免疫过程,这导致 CTL 产生。由 APC 产生的内源蛋白通过 MHC-II 表达,产生 CTL 和 Th。可以相信用基因枪介入的 DNA 免疫接种和 DNA 注射产生的机制不同。因为 APC 清除凋亡细胞,而存在于凋亡细胞中的 DNA 可能转移到 APC 中,接着在 APC 中表达。影响不同类型细胞的效应分子可能具有产生两种免疫反应的优点。

2.1 由疫苗载体增强免疫性

质粒 DNA 载体骨架的基本要求是:(1)为哺乳动物细胞中表达的真核启动子;(2)启动子下游克隆部位插入异种基因;(3)一个多聚腺苷酸化序列提供稳定的 mRNA 转录;(4)有选择性的标记,通常是细菌抗生素耐药基因;(5)细菌性复制源,通常是大肠杆菌 ColE1 作为复制源,因为它能提供大量拷贝,使纯化时得到高产率。在设计 DNA 疫苗时引入 Kozak 序列十分重要。最常用的启动子,来自人巨细胞病毒(HCMV),是主要介导早期强化启动子(即 CMV 启动子)。小鼠肌注 DNA 疫苗免疫,与不含密码子优化病毒序列的对照质粒比较,Th1 型免疫反应增强。体内肌注 DNA 疫苗的免疫性,由于 CpG 基序的甲基化而明显减弱,但可伍用外源性含 CpG DNA 的疫苗来增强。因此,对特异 DNA 疫苗必须优化 CpG 成分,即增加兴奋性基序数目,减少抑制性基序数目。

2.2 靶向途径

许多研究显示,当表达抗原是分泌状态,而不是局限于细胞膜或细胞内时,可引起较高的抗原特异性 IgG 水平,在小鼠中产生较高的 IgG1/IgG2 比值。

收稿日期:2005-09-02

作者简介:李培进,男,副研究员,硕士生导师,研究方向:医药咨询与卫生勤务,Tel:010-66884447

铜绿假单胞菌外毒素 A 的易位域与模型肿瘤抗原融合,增强 DNA 疫苗的免疫性,可能是加强类别 I 抗原对 CD8⁺ T 细胞的作用。同样,乙型肝炎病毒 (HBV) 抗原融合 IgG Fc 片段作为 APC 直接抗原,可增强 HBV 特异的体液和细胞性免疫反应。为增强类别 II 抗原提呈,用溶酶体相关膜蛋白获得靶向内涵体或溶酶体的抗原。

2.3 协同刺激分子

刺激分子和细胞因子的共表达也可调节或增强免疫反应。例如,表达粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 的质粒 DNA 可以加强渗透,包括树状细胞进入小鼠肌肉内。此外,同时注射表达 GM-CSF 的质粒与表达环孢子蛋白 (CSP) 的质粒,可增强对 CSP 的免疫反应。

3 给药途径

DNA 疫苗通常加蒸馏水或生理盐水,偶尔加蔗糖进行注射。有时加促进剂,如布比卡因 (bupivacaine) 促进 DNA 的摄取。一般在小鼠肌注引起反应需要 10~100 μg DNA,而肌注通常不足以保证疫苗的成功。正在研究递送 DNA 的载体和混合方式接种疫苗,以增强下一代 DNA 疫苗。

3.1 载体

载体介入的递药可将 DNA 直接带入靶细胞而避免降解。例如,基因枪递药系统,由气动加速 DNA 外包金粒子直接进入皮肤表皮。此种 DNA 直接注射到宿主细胞胞浆内经常产生高于肌注 DNA 接种的抗原特异刺激的免疫性。基因枪介入的 DNA 接种远较注射接种效率高,剂量为肌注的 1%~1%,只需 0.1~1.0 μg DNA 即可使小鼠产生免疫性。基因枪接种可引起 IgG1 和混合的 IgG1/IgG2 反应。由共递编码白细胞介素 (IL)-2, IL-7 或 IL-12 或 CpG 基序基因,可使基因枪介入的免疫接种引起的 Th2 型免疫反应转换到 Th1 型反应。使用作为异源质粒 DNA 载体的减毒细菌被 APC 吞噬时,细菌溶解,释放 DNA,提供抗原。基因枪用的 DNA 疫苗可递送到皮肤,而微囊或细菌载体 DNA 疫苗可递送到鼻内或口腔粘膜表面。这些非侵入性途径,提供自我给药的可能性,因而较容易实现大规模接种。

3.2 免疫接种方案

使用简单载体的抗原为基础,更复杂的载体来加强,通常获得最佳效果。在一项研究中,当给予 DNA 疫苗继之以给予重组疫苗病毒时,异源的初次

免疫-加强疫苗在疟疾感染模型上产生充分的保护,而对加强剂相同,反复 DNA 疫苗给药则无效。此初次免疫-加强途径对人有很大潜力,例如,志愿受试者给予疟疾 DNA 疫苗,分别表皮或肌注,接着皮内给予重组病毒疫苗,产生的免疫反应高于单独疫苗免疫 5~10 倍,特别能防护孢子体的攻击。此外,使用这种初次免疫-加强方案,由 Th2 型转换到 Th1 型,可提供更平衡的免疫反应。

4 生物防御用 DNA 疫苗

抗病毒、细菌和细菌毒素的生物防御用疫苗需要迅速制造。找出这些毒物的基因组或序列,确定编码候选亚单位的基因,将这些基因克隆到 DNA 疫苗的载体中,就可迅速大量生产 DNA 疫苗。因为人在暴露前不大可能进行免疫接种,因而迅速生产大量生物防御用疫苗的能力就十分重要。DNA 疫苗采用遗传学方法制造,引起恰当免疫反应,包括粘膜免疫,对防生物武器、微生物气溶胶攻击很关键。

4.1 病毒

A 类病毒,如痘病毒(如天花)和纤丝病毒(如埃波拉和马尔堡病毒),B 类病毒,如 α 病毒(如委内瑞拉马脑炎病毒),均已制备和部分评价了它们的 DNA 疫苗。其他病毒为 C 类,属于潜在性生物战武器,威胁程度较小,包括汉塔病毒 (Hantaviruses)、蜱传脑炎病毒、黄热病毒和高致病病毒(如尼帕病毒)。

痘病毒有两种感染形式,成熟的细胞内病毒体 (IMV) 和包封的细胞外病毒体 (EEV)。已确定了与这些形式有关的蛋白,在小鼠上实验了其免疫性和保护效率。A33R 和 B5R 蛋白 (EEV 中) 的 IHD-J DNA 疫苗,肌注后均能保护小鼠一个致死剂量的攻击。同样,表达 A33R 和 B5R 蛋白 (EEV) 及 L1R 和 A27L 蛋白 (IMV) 的联合 DNA 疫苗对小鼠痘病毒攻击模型,用基因枪给药后,产生完全的保护。在防护纤丝病毒感染中中性抗体的诱导也可能是重要的。已制备抗埃波拉和马尔堡病毒的 DNA 疫苗,均基于跨膜糖蛋白 (GP),因其可引起中性抗体。表达马尔堡病毒的 GP 蛋白的 DNA,由基因枪递送,对烈性病毒一个致死量攻击的猕猴,可保护 50%。同样,表达埃波拉病毒 GP 蛋白的 DNA 疫苗,可防护埃波拉病毒对小鼠的攻击。另外,表达埃波拉核壳体蛋白 (NP) 的 DNA 免疫接种,对埃波拉攻击的鼠模型也有效。抗各种病毒的联合疫苗必须证明对同一病毒不同株也有效,例如,虽然马尔堡 GP DNA 疫苗由基因

枪递送给豚鼠,对 Musoke 与 Ravn 株均有保护反应,而未公布的资料表明,对异源性攻击的交叉保护是不完全的。提示在联合疫苗中引入各种分离病毒应包括两种或更多的基因。

4.2 细菌

对于鼠疫耶尔森菌,表达已知主要保护性抗原,即 V 抗原和 F1 抗原的 DNA 疫苗已有制造。用基因枪递送表达基序 F1 抗原的 DNA 疫苗可以保护烈性鼠疫耶尔森菌 4 000 倍半数致死量(LD₅₀)剂量。表达炭疽杆菌保护抗原(PA)或致病因子(LF)的 DNA 疫苗载体已有生产。PA 是炭疽杆菌分泌的 3 种毒素的主要成分之一,也包括 LF 和水肿因子(EF),是目前人用抗炭疽疫苗的主要成分。表达 PA 的 DNA 疫苗,由肌注给予或由基因枪递送小鼠可保护炭疽毒素的攻击。同样,用基因枪给予小鼠表达 LF 的 DNA 疫苗也可防护小鼠的炭疽毒素的攻击。这些 DNA 疫苗主要刺激 Th2 型免疫反应,小鼠显示主要是 IgG1。最近,抗炭疽杆菌芽孢的 PA DNA 疫苗的保护性免疫作用在兔身上证实,显示有希望开发人用 DNA 类炭疽疫苗。近来一些研究中,评价了 10 种表达分枝杆菌蛋白融于真核细胞靶向序列 N 端的抗结核菌 DNA 疫苗。这些 DNA 疫苗中融入血纤维蛋白溶酶原激活因子序列或与泛素结合,小鼠肌注免疫接种,与卡介苗(BCG)免疫小鼠比较,能引起细胞性免疫反应。另一用于刺激细胞性免疫反应的成功途径是协同刺激分子的表达,例如,同时表达 IL-12 和 IL-18 的 DNA 疫苗,已评价了其中的抗肉毒杆菌神经毒素(BoNT)的 DNA 疫苗。抗 BoNT F 型

DNA 疫苗最有效,在小鼠 2 次肌注 100 μg DNA 后,对最小致死量(MLD)的 BoNT F 型杆菌提供 90% 的保护。

5 结语

DNA 疫苗存在限制其发展的技术障碍,主要问题是人肌注无活性。为改善 DNA 疫苗的效价,使用了基因枪技术,初次免疫-加强方案。另外,虽然 DNA 疫苗在许多动物实验中耐受良好,但令人关注的还是人的安全性。其中之一,是 DNA 疫苗可能整合到人的染色体中,虽然目前的测定还未发现有整合证据。另一个问题是可能发生自身免疫,因为在一次研究中发现 DNA 疫苗免疫接种后产生抗 DNA 抗体。在 DNA 疫苗接种前这些问题需要充分说明,以解决人常规使用的可接受性。DNA 疫苗能引起细胞性免疫反应,但引起体液性免疫反应的能力相对较差。此提示,目前疫苗应向细胞性免疫对病原体预防是重要的品种开发。开发表达保护多种生物战剂表型的 DNA 多价疫苗,是生物防御中最吸引人的目标。

DNA 疫苗的优点在于可迅速生产,广泛使用,用非侵入性递药,产生广谱免疫反应。这些特点对开发生物防御疫苗特别有价值。用遗传学生产 DNA 疫苗,意味着容易进一步加入保护性抗原,疫苗可预先设定诱导恰当的免疫反应。临床试验表明,DNA 疫苗对人可能是安全的和有免疫原性的,药厂已开发了规模生产方法,对未来防御生物攻击,DNA 疫苗用处很大。

关注药物安全性

遗传技术公司提供曲妥珠单抗心脏毒性详细资料

心脏毒性资料主要来自 B-31 临床试验。入选病例 2 085 例,试验在多柔比星/环磷酰胺化疗后用紫杉醇,再加曲妥珠单抗的益处,同时考察药物的心脏毒性及治疗中的系列心脏监测是否可预测或早期发现心脏毒性。心脏状况的测定包括基线心功能测定或超声心动图;化疗完成后紫杉醇(加或不加曲妥珠单抗)治疗 6, 9, 19 个月,分别随访检查超声心动图。分析表明,30.5% 病人由于无症状性左心室射血分数(LVEF)降低,至少推迟一个剂量。18.6% 病人由于无症状性 LVEF 降低(14.3%),症状性心功能不全或其他心脏毒性(4.3%),在完成 1 年治疗前停用了曲妥珠单抗。3 年 III, IV 级充血性心力衰竭和死亡累计发生率,曲妥珠单抗组累计 4.1%,对照组 0.8%,危险比 5.9。对照组有 1 例因心脏病死亡,而用药组无死亡病例。公司认为,患者年龄和化疗后 LVEF 值,能帮助确定产生症状性心功能不全危险性的病人。

(黄世杰)