

· 研究进展 ·

活病毒直接转化为预防、治疗双功能疫苗研究进展

周雪莹 马闻箫 周德敏*

(北京大学药学院天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100191)

[摘要] 疫苗是目前预防病毒感染最有效的方法之一。以流感疫苗为例,目前临床使用的流感疫苗种类包括减毒、灭活、亚单位、载体疫苗等。本研究团队以流感病毒为模型,成功研发了预防和治疗双功能的“复制缺陷型活病毒疫苗”制备技术。该方法彻底突破了现有的疫苗研制手段,利用基因密码子拓展技术,通过将病毒基因组中的一个或多个三联遗传密码子突变为终止密码子的方式,使病毒在宿主体内的正常繁殖复制的机制失效,同时又保留了病毒完整的结构和感染力,使其成为能够高效刺激机体产生免疫应答,甚至是具有治疗前景的抗病毒药物。

[关键词] 活病毒疫苗;通用型疫苗;基因密码子拓展技术;流感疫苗

疫苗接种是预防病毒感染最有效的方法之一^[1]。自1796年Edward Jenner发明牛痘疫苗起,222年来,在人类预防和治疗传染病的过程中,疫苗已经成为预防高致死性病原体侵害的有力武器^[2]。疫苗分为预防性疫苗和治疗性疫苗两类^[3],通常所说的疫苗多指预防性疫苗,其概念是指通过模拟病毒的自然感染而引起人体产生保护性免疫应答^[4]。治疗性疫苗的出现则远远晚于预防性疫苗。1902年,英国科学家Wright首次提出将金黄色葡萄球菌制成灭活疫苗,可以用于复发性疾病的治疗,并由此提出了治疗性疫苗的理论^[5]。治疗性疫苗是指将大量抗原及能够提高免疫功能的组分结合在一起,利用其抗原性大、免疫原性强的特点,对免疫系统产生更强的刺激作用,从而更有效地引起免疫应答。

1 研究背景

截至目前,已上市70多种疫苗,包括炭疽、鼠疫、白喉、百日咳、肺炎链球菌、破伤风、结核病、脑膜炎球菌等十一类细菌性疾病和天花、狂犬病、脊灰、甲肝、乙肝、戊肝、黄热病、乙脑、麻疹、水痘、带状疱疹、轮状病毒、人乳头瘤病毒和流感等十六类病毒性疾病^[6]。然而,现在的疫苗研发思路和生产方法还存在一些瓶颈和问题。

以流感疫苗为例,目前已经上市的疫苗种类主要包括减毒、灭活、亚单位、载体疫苗等^[7],其中减毒、灭活、亚单位疫苗应用比较广泛、技术相对成熟。一方面从生产工艺上分析,上述三种疫苗的生产过程第一步是获得大量、稳定、高活性的毒株^[8]。迄今为止在疫苗产业中应用最广泛、技术最成熟的病毒体外扩增方法仍然是使用鸡胚尿囊液扩增^[9],这一工艺方法的优势在于获得的毒株浓度高、活力好,同时自动化程度高,但是使用这种方法生产的流感疫苗生长缓慢、费时费力^[10-12],且其中的杂蛋白不能被完全除去^[13,14],因而会导致一部分对鸡蛋过敏的患者产生严重的过敏反应。另一方面,无论是灭活、减毒还是亚单位疫苗,其所用毒株的免疫原性往往难以完全保留,从而难以达到理想的免疫诱导效果。

本研究团队新研发的“将活病毒转化为疫苗”的技术(PTC疫苗技术),对于上述的两大疫苗研发思路和生产方法所遇到的瓶颈均有一定程度的改善和提高。第一,作为一种基于细胞生产技术的疫苗,PTC疫苗的杂质更少,而且成分明确,易于质控,致敏性低,更符合新时代药品质量控制的理论。第二,由于本技术保留了流感病毒主要抗原(HA, NA, 等)的全部一、二、三级结构,且对于流感病毒的非主

收稿日期:2018-05-01;修回日期:2018-08-30

* 通信作者,Email: deminzhou@bjmu.edu.cn

要抗原(PB2, PB1, PA, 等)改变极小,因而在保留了流感病毒全部的抗原活性的同时,得以更好地模拟病毒感染宿主的过程,精准而全面地诱发相关的免疫反应,实现了流感病毒疫苗的高效化、长效化、特效化。第三,这项技术不同于传统流感疫苗生产技术,作为一种平台化的研发生产一体技术,PTC疫苗可以实现更短的研发和生产周期,在新型病毒爆发的过程中,迅速地得到特效疫苗,从而在第一时间服务于患者。第四,作为一种新的研发技术平台,通过进行反向遗传研究,储备各种可能爆发的活病毒的拯救体系,即可实现对各种病毒疫苗的技术储备。

2 研究进展及成果

本研究团队经过多年的努力,以流感病毒为模型,成功研发了预防和治疗双功能的复制缺陷型活病毒疫苗制备技术。该方法彻底突破了现有的减毒、灭活、亚单位疫苗研制手段,利用基因密码子扩展技术,通过将病毒基因组中的一个或多个三联遗传密码子突变为终止密码子的方式,使病毒在宿主体内正常繁殖复制的机制失效,同时又保留了病毒完整的结构和感染力,使其成为能够高效刺激机体产生免疫应答,甚至是具有治疗前景的抗病毒药物。具体研究成果如下:

2.1 稳定细胞系的构建与复制缺陷型活病毒疫苗的生产

复制缺陷型活病毒疫苗的开发技术关键在于基因密码子拓展技术。天然细胞中共存在 64 组三联密码子,其中 61 组密码子负责编码 20 种天然氨基酸,另外 3 组密码子(UAA, UGA, UAG)为终止密码子,不编码氨基酸,也不能被转运 RNA 及其合成酶识别。2001 年,美国 Peter Schultz 教授等人^[15]发

现古细菌可以利用琥珀终止密码子(UAG)编码特殊的氨基酸到必须的蛋白质中以保证自身正常生长,并将古细菌中的 tRNA 合成酶和 tRNA 对单独取出来,经过正负筛选优化,使其可以在正常生物体内利用本来不编码氨基酸的 UAG 密码子,来编码自然界中不存在的、人工合成的非天然氨基酸到蛋白质的特定位置,相当于将 UAG 终止密码子变成了可以编码非天然氨基酸的有义密码子。

基于该技术,本团队将 HEK293T 改造为一种特殊的稳定细胞系,能够稳定表达可识别 UAG 终止密码子的转运 RNA 及其合成酶^[16]。我们将已有的较为成熟的流感病毒反向遗传体系进一步地进行改造,使其具有一至多个终止密码子,并利用该稳定细胞系进行流感病毒的拯救。在该细胞系中,反向遗传体系可成功地利用非天然氨基酸完成相关蛋白质的合成,从而拯救出携带终止密码子的病毒疫苗(图 1b)。并且,实验显示,已拯救出的病毒疫苗在此稳定细胞系中还可实现直接扩增生产(图 1c)。与之相对的,在正常细胞中,由于缺乏非天然氨基酸及其转运 RNA、合成酶,具终止密码子的流感病毒疫苗不具有在接种后复制的能力,从而保障了其安全性(图 1a)。

2.2 复制缺陷型活病毒疫苗的预防性功能评价

安全性及有效性是评价疫苗预防性功能的两项重要指标。本团队将 PTC 疫苗与市售灭活疫苗(IIV)、冷适应减毒疫苗(CAIV)进行对比发现,在流感常用的小鼠评价模型中,接种 PTC 疫苗后,小鼠全部存活,且不会造成体重的降低,其安全性与灭活疫苗(IIV)、冷适应减毒疫苗(CAIV)基本相同(图 2a, 2b);此外,由于保留了完整病毒颗粒结构,PTC 疫苗可以提供良好的保护性免疫效果,其免疫效果

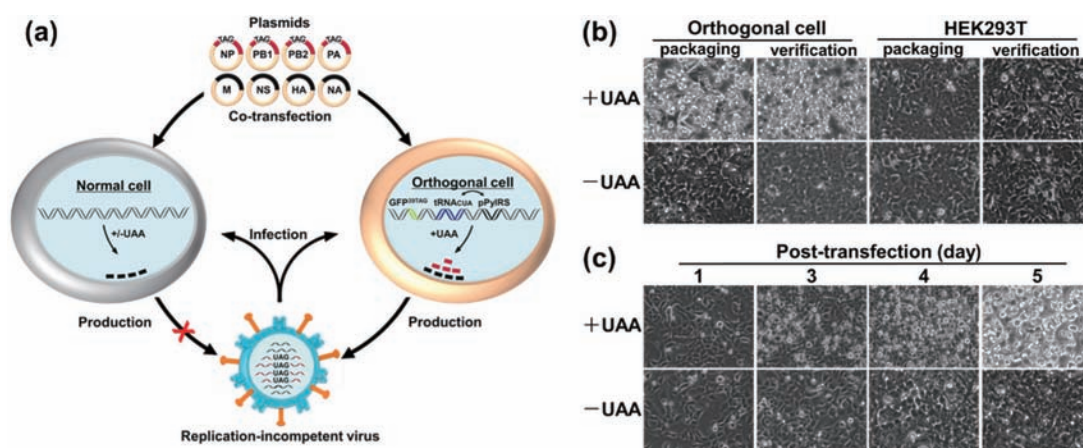


图 1 含终止密码的复制缺陷型活病毒疫苗制备^[16]

(a) 复制缺陷型活病毒疫苗技术示意图;(b) 非天然氨基酸(UAA)依赖的活病毒疫苗制备;(c) 时间依赖的活病毒疫苗扩增

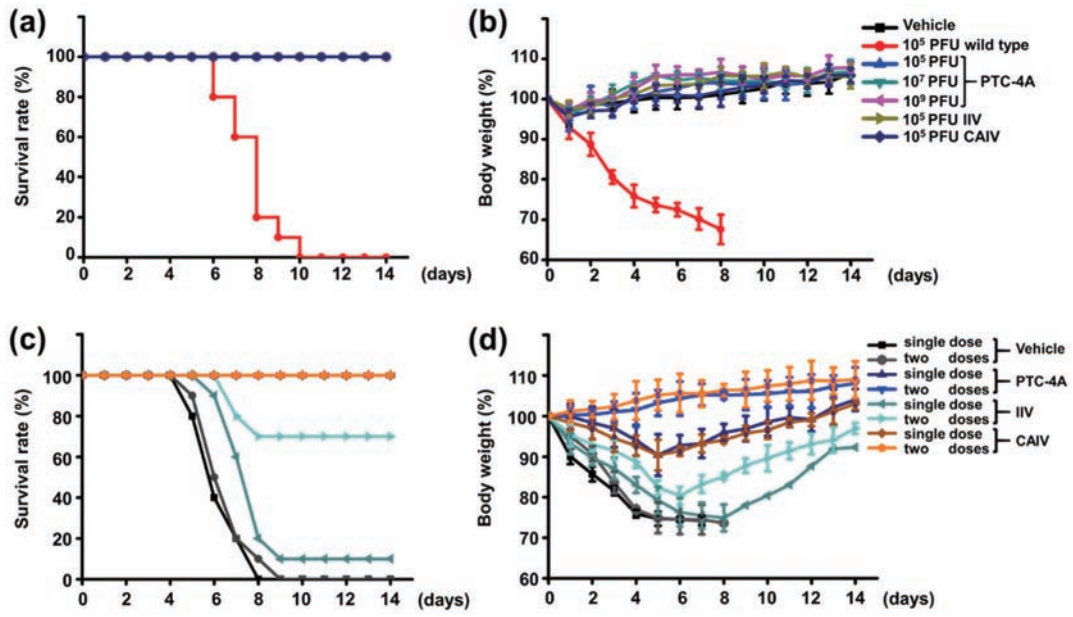


图 2 复制缺陷型活病毒疫苗的安全性及有效性检测^[16]

接种野生型病毒或各种病毒疫苗对 BALB/c 小鼠存活率(a)及体重(b)的影响;预接种各种病毒疫苗对 BALB/c 小鼠感染野生型病毒的存活率(c)及体重(d)的保护效果

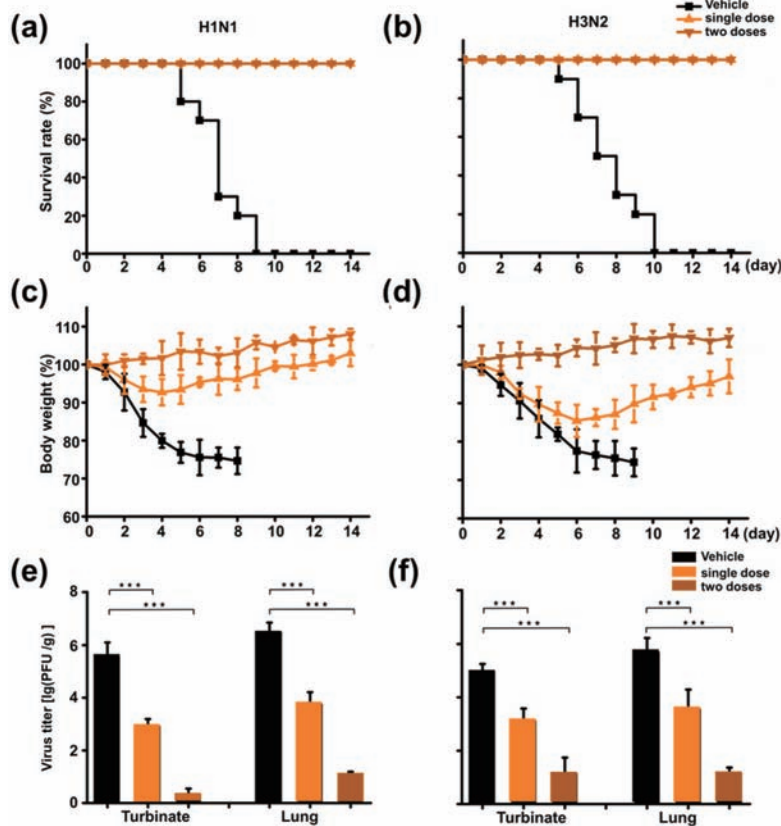


图 3 复制缺陷型活病毒疫苗对不同亚型毒株的抵抗作用^[16]

接种复制缺陷型活病毒疫苗对已感染 pH1N1 或 H3N2 亚型流感病毒的 BALB/c 小鼠存活率(a, b)、体重(c, d)及体内病毒含量(e, f)的影响

显著高于灭活疫苗(IIV),并与冷适应减毒疫苗(CAIV)相当(图2c、2d)。在其他两种流感常用的豚鼠及雪貂评价模型中,我们也得到了基本相同的安全性及有效性评价结果。

进一步研究表明,由于抗原转变和漂移,流感病毒的表面抗原往往频繁发生变化,从而导致部分流感病毒毒株能够逃避疫苗接种后抗原介导的免疫反应^[17-19]。因此,开发广谱的流感病毒疫苗也是未来疫苗发展重要的方向之一^[19]。本团队评价了PTC病毒对其他异源毒株的交叉免疫保护效果。结果显示(图3),PTC病毒疫苗免疫可以阻止异源流感毒株(A/reassortant/NYMC X-179A(pH1N1)和A/Aichi/2/68(H3N2))引起的小鼠死亡和体重下降,也可以显著抑制小鼠体内的病毒滴度。表明PTC病毒具有诱导交叉免疫保护的能力。

2.3 复制缺陷型活病毒疫苗的治疗性功能评价

除预防性功能外,PTC疫苗还显示出了治疗性功能。结果显示(图4),当野生型病毒感染小鼠的同时接种PTC病毒,虽然小鼠的体重略有降低,但90%的小鼠存活;而野生型病毒感染小鼠的同时接种相同剂量的灭活疫苗,对小鼠无任何保护效果,接种冷适应减毒疫苗有一定的保护效果,与文献报道基本一致^[20]。为了模拟真实情况,我们先用野生型病毒感染小鼠,一天后再接种PTC病毒,结果显示,与没有接种PTC的组相比,小鼠体重下降的幅度较小,并有40%的小鼠最终存活,存活小鼠的体重在后续饲养的过程中又逐渐恢复。

通过检测小鼠肺组织中的野生型病毒含量可知,PTC病毒可以显著抑制野生型病毒在小鼠体内的复制,降低野生型病毒滴度;即使在野生型病毒感染小鼠一天后再接种PTC病毒,PTC病毒仍旧可以发挥显著的抑制作用;灭活疫苗完全没有抑制作

用,减毒疫苗有一定程度的抑制作用。

为了解释上述实验现象发生的原因,我们作了如下猜想:流感病毒为基因分节段的RNA病毒,当不同型的流感病毒同时感染一个宿主细胞时,它们的基因节段会发生重排,产生新的毒株^[21]。同理,当PTC病毒与野生型病毒同时感染一个宿主细胞时,两者的基因节段也会发生重排。我们认为PTC病毒与野生型病毒之间可以发生基因重排,从而将其含有终止密码子的基因节段重排到野生型病毒的子代中,将野生型病毒转化成PTC病毒,使其失去复制能力。为证实上述猜想,我们从小鼠鼠肺中分离得到流感病毒,并通过噬斑实验分离纯化,进行基因测序。结果显示,两者的基因确实发生了重排,且重排子代至少含有一条带有终止密码子的基因节段。

3 总结及展望

回顾疫苗的发展历史,从最初的牛痘苗开始,疫苗一直沿着三个方向发展:增加疫苗的适用症、增强疫苗的功效、降低疫苗的副作用。PTC疫苗技术的出现,为科学家和工程师提供了一个全新的视角来研究疫苗和疫苗产业。

首先,作为一种平台式的技术,通过搭建和完善PTC疫苗技术平台—小量生产—动物评价的流程体系,可以模块化、高效率的对特定病毒进行疫苗研发。不同于通常的减毒、灭活、亚单位疫苗,由于PTC疫苗完整的保留了病毒的全部抗原性和免疫原性,通过对某一病毒的PTC疫苗研究即可揭示该病毒是否能产生足够的免疫反应,是否可以该病毒的预防性疫苗开发。这与传统疫苗研发中进行灭活、减毒、亚单位的尝试来摸索疫苗可行性的过程相比,不仅缩短了研发周期、降低了研发成本,更重要的是提供了一种较为普适、通用的疫苗研发

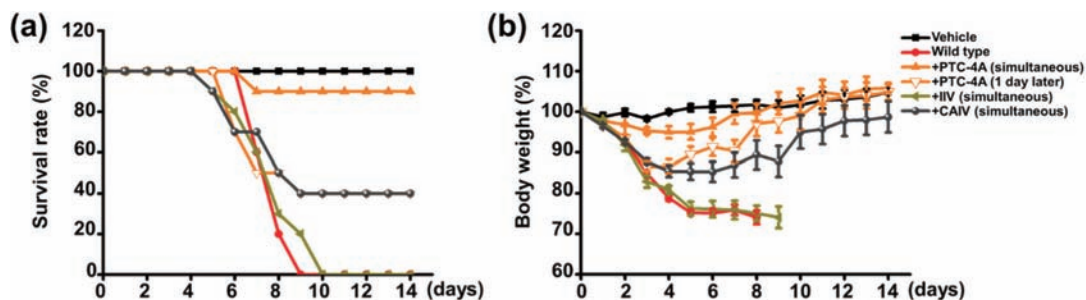


图4 复制缺陷型活病毒疫苗的治疗效果检测^[16]

接种各种病毒疫苗对已感染野生型病毒的BALB/c小鼠存活率(a)及体重(b)的影响

新理论和新通路。同时,PTC疫苗技术的核心思想在于“将活病毒直接转化为疫苗”,即只要能够构建某个病毒的拯救体系,就能够迅速的获得该病毒的备选PTC疫苗,因此这一技术为很多目前疫苗领域的难题(如呼吸道合胞体病毒等)提供了新的可能性。

另一方面,正是由于PTC疫苗完整、全面的保留了病毒的抗原性和免疫原性,在研究中我们发现,PTC疫苗还具有多价性。病毒作为长期以来医疗卫生领域的难题,由于其易产生突变的特性,就算在科技水平已经比较先进的今天,却依然会有不定期的病毒性疾病流行和爆发。在研究中我们发现,PTC疫苗天然便具有了对不同毒株交叉保护的效果。这一现象的出现很可能是源于PTC疫苗保留了一些在通常疫苗制备过程中容易丢失的,但对于病毒来说保守性较高的抗原。通过这种方式,我们将之前疫苗研发中没有足够重视的“病毒的秘密”加以保留、揭示、应用。

此外,PTC疫苗中应用的非天然氨基酸系统使用的是NAEK(Nε-2-azideoethylloxycarbonyl-L-lysine),其分子结构中的叠氮基团与游离的炔基可以进行温和高效的点击化学反应(Click Reaction)^[22],从而对PTC疫苗进行进一步的定点修饰。通过使用类似的技术,本团队之前完成了干扰素^[23]、生长激素^[24]、慢病毒^[25]、腺相关病毒^[26]的定点修饰。未来,通过将一些有免疫原性的肽段定点修饰到PTC疫苗表面,本课题组将进行一些双功能、多功能疫苗的研发。通过点击化学反应,我们还可以将有活性的小分子药物、荧光分子等连接到疫苗上,实现增强疫苗效果或实时示踪等多种功效。也就是说,基于基因密码子拓展技术和点击化学反应,PTC疫苗技术有着多元化的发展方向和巨大的想象空间。

最后,PTC疫苗不仅是一种传统的预防性疫苗,我们在研究中发现,PTC疫苗还具有治疗性疫苗的活性。这一发现使得目前主要集中于肿瘤治疗的治疗性疫苗研究在病毒治疗领域出现了新的机会。依托于PTC疫苗研发平台和多样化的病毒拯救体系,本课题将进行多种病毒的治疗性疫苗研究,在将治疗性疫苗这一新兴领域拓宽、发展的同时力争做有高科学含金量、高应用价值、高社会贡献的疫苗研究。

参 考 文 献

- [1] 赵文华,杨维中. 疫苗或可成为慢性病防控的重要手段. 中华预防医学杂志, 2015, 49(8): 675—676.
- [2] Lombard M, Pastoret PP, Moulin AM. A brief history of vaccines and vaccination. *Revue Scientifique Et Technique*, 2007, 26(1): 29—48.
- [3] 欧霞,孙茂盛,李鸿钧. 治疗性疫苗的研究进展. 医学综述, 2012, 18(17): 2844—2846.
- [4] Rappuoli R, Aderem A. A 2020 vision for vaccines against HIV, tuberculosis and malaria. *Nature*, 2011, 473(7348): 463—469.
- [5] Wright AE. Notes on the treatment of furunculosis, syco-sis, and acne by the inoculation of a staphylococcus vaccine, and generally on the treatment of localised bacterial invasions by therapeutic inoculations of the corresponding bacterial vaccines. *The Lancet*, 1902, 159(4100): 874—884.
- [6] Plotkin SA, Plotkin SL. The development of vaccines: how the past led to the future. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(12): 889—893.
- [7] Gostin LO, Phelan A, Stoto MA, et al. Virus sharing, genetic sequencing, and global health security. *Science (New York, NY)*, 2014, 345(6202): 1295—1296.
- [8] Johnson A, Chen L-M, Winne E, et al. Identification of influenza A/PR/8/34 donor viruses imparting high hemagglutinin yields to candidate vaccine viruses in eggs. *PloS ONE*, 2015, 10(6): e0128982.
- [9] 戴宗祥,耿兴良,周健,等. PEG-6000 纯化流感病毒鸡胚尿囊液的研究. 国际检验医学杂志, 2014, 35(01): 1—2,5.
- [10] Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine*, 2003, 21(16): 1776—1779.
- [11] Fodor E, Devenish L, Engelhardt OG, et al. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *Journal of Virology*, 1999, 73(11): 9679—9682.
- [12] Horimoto T, Murakami S, Muramoto Y, et al. Enhanced growth of seed viruses for H5N1 influenza vaccines. *Virology*, 2007, 366(1): 23—27.
- [13] O'brien TC, Maloney CJ, Tauraso NM. Quantitation of residual host protein in chicken embryo-derived vaccines by radial immunodiffusion. *Applied Microbiology*, 1971, 21(4): 780—782.
- [14] 权娅茹,崔晓雨,邵铭,等. 流感病毒裂解疫苗中鸡胚来源物质残留量分析. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(08): 883—885.

- [15] Wang L, Brock A, Herberich B, et al. Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science* (New York, NY), 2001, 292(5516): 498—500.
- [16] Si L, Xu H, Zhou X, et al. Generation of influenza A viruses as live but replication-incompetent virus vaccines. *Science* (New York, NY), 2016, 354(6316): 1170—1173.
- [17] Tong S, Li Y, Rivailler P, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(11): 4269—4274.
- [18] Jang YH, Seong BL. Principles underlying rational design of live attenuated influenza vaccines. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 2012, 1(1): 35—49.
- [19] Plotkin SA. Vaccines: past, present and future. *Nature Medicine*, 2005, 11(4s): S5—11.
- [20] Kiseleva I, Dubrovina I, Bazhenova E, et al. Possible outcomes of reassortment in vivo between wild type and live attenuated influenza vaccine strains. *Vaccine*, 2012, 30(51): 7395—7399.
- [21] Vijaykrishna D, Poon L, Zhu H, et al. Reassortment of pandemic H1N1/2009 influenza A virus in swine. *Science* (New York, NY), 2010, 328(5985): 1529.
- [22] Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie (International Edition in English)*, 2001, 40(11): 2004—2021.
- [23] Zhang B, Xu H, Chen J, et al. Development of next generation of therapeutic IFN- α 2b via genetic code expansion. *Acta Biomaterialia*, 2015, 19(1): 100—111.
- [24] Wu L, Chen J, Wu Y, et al. Precise and combinatorial PEGylation generates a low-immunogenic and stable form of human growth hormone. *Journal of Controlled Release*, 2017, 249: 84—93.
- [25] Zheng Y, Yu F, Wu Y, et al. Broadening the versatility of lentiviral vectors as a tool in nucleic acid research via genetic code expansion. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(11): e73.
- [26] Zhang C, Yao T, Zheng Y, et al. Development of next generation adeno-associated viral vectors capable of selective tropism and efficient gene delivery. *Biomaterials*, 2016, 80: 134—145.

Recent advances in directly converting live virus into preventive and therapeutic vaccine

Zhou Xueying Ma Wenxiao Zhou Demin

(*State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191*)

Abstract Vaccines are one of the most efficient ways for preventing virus infection. Currently, the strategies of influenza vaccines in clinical use includes live attenuated vaccines, inactivated vaccines, subunit vaccines, vector-based vaccines, etc. Using influenza A viruses as a research model, our group has developed a platform for production of replication-incompetent live virus vaccines proven to be effective in both preventive and therapeutic utilizations. Such technology, which considered to be a major breakthrough among existing research and production strategies of vaccines, takes advantage of genetic code expansion, and changes one or more triplet codons inside the virus genome into stop codons. With viral replication suppressed, antigenic and infectious activity reserved, our vaccine could be a potentially preventive and therapeutic solution for multiple virus infections.

Key words live virus vaccines; universal vaccine; genetic code expansion; influenza vaccines