

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.06.029

嵌合型病毒样颗粒疫苗的研究进展及药学研发思路

凌媛, 李敏[△]

(国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022)

摘要:目的 了解嵌合型病毒样颗粒(cVLP)疫苗在防治疾病等方面的研究进展,并探讨其药学研发思路。方法 介绍常用病毒样颗粒(VLP)载体,总结 cVLP 疫苗在防治肿瘤和慢性疾病方面的应用,并从 cVLP 疫苗的构建与设计、VLP 载体与免疫表位的连接方式、结构确证研究三方面开展 cVLP 疫苗的药学研究。结果与结论 cVLP 作为改良型 VLP,除构建自我组装 VLP 针对同源病毒的疫苗外,将 VLP 作为递呈载体还可呈现除载体外的其他病毒或肿瘤相关抗原表位,实现对多种病毒或肿瘤抗原的共同免疫。且 cVLP 作为一种技术平台,还可在预防病毒及治疗肿瘤和过敏性疾病中发挥重要作用。

关键词:病毒样颗粒;嵌合型病毒样颗粒;疫苗;进展

中图分类号:R978.7

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)06-0096-07

Research Progress and Pharmaceutical Research and Development of Chimeric Virus-Like Particle Vaccine

LING Yuan, LI Min

(Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing, China 100022)

Abstract: Objective To introduce the research progress of chimeric virus-like particle(cVLP) vaccine in the prevention and treatment of diseases, and to investigate the pharmaceutical research and development of cVLP vaccine. **Methods** The commonly used virus-like

第一作者:凌媛,女,硕士研究生,助理研究员,研究方向为药品审评,(电子信箱)lilylingyuan@163.com。

[△]通信作者:李敏,女,博士研究生,研究员,研究方向为药品审评,(电子信箱)lim@cde.org.cn。

酸镁,若需继续保肝治疗,推荐换为多烯磷脂酰胆碱。

患者面部红斑消失,左眼球淤血消退,左下肢皮疹消退,双侧膝关节、踝关节肿痛减轻。在药物治疗下,血压、血钾正常,病情好转,并于 2019 年 6 月 6 日出院。出院带药:甲泼尼龙片 48 mg,口服,1 日 1 次;吗替麦考酚酯分散片 750 mg,口服,1 日 2 次,分早晚服用;硫酸羟氯喹片,口服,1 日 2 次,早晚餐时服用;阿法骨化醇片 0.5 μg,口服,1 日 1 次;碳酸钙 D₃ 片 600 mg,口服,1 日 1 次;瑞巴派特片 0.1 g,口服,1 日 3 次;多烯磷脂酰胆碱胶囊 456 mg,口服,1 日 3 次;安立生坦片 5 mg,口服,1 日 3 次;缬沙坦胶囊 160 mg,口服,1 日 1 次。

接受免疫抑制治疗的患者发生感染的风险高,且后果严重,故对其应积极诊治感染性疾病,尽早明确病原体,针对性进行抗感染治疗,并推荐在病情稳定时接种季节性流感和链球菌疫苗预防感染。对于药物性高血压,随着基础疾病病情的缓解,以及致血压异常药物剂量的减少,患者的血压会逐渐恢复正常,故不建议过于积极予降压药干预。

4 结语

在该患者整个药学监护过程中,临床药师主要参与抗感染方案的制订,严密监测患者炎症指标的变化,血压、电解质水平及肝功能,根据疗效及时调整药物,最终病情好转,但在治疗过程中仍存在不足,免疫抑制治疗

是一把“双刃剑”,SLE 是一种慢性疾病,随着病情的变化需不断评估治疗的利弊,维持患者的生活质量,但目前很难实现。需在提高患者的随诊随访意识的同时建立线下、线上与临床医师、药师保持联系的途径。临床药师自身也应了解药物相关信息,为临床及患者提供个体化的用药建议和用药教育,促进临床安全、合理用药。

参考文献

- [1] 中华医学会风湿病学分会. 系统性红斑狼疮诊断及治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(5): 342-347.
- [2] FANOURIAKIS A, KOSTOPOULOU M, ALUNNO A, et al. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus[J]. Ann Rheum Dis, 2019, 78(6): 736-745.
- [3] ROBERT WH, JESSICA RI, MATTHEW AB. Glucocorticoids and renal Na⁺ transport: implications for hypertension and salt sensitivity[J]. J Physiol, 2014, 592(8): 1731-1744.
- [4] MORRIS DJ, RIDLON JM. Glucocorticoids and gut bacteria: "The GALT Hypothesis" in the metagenomic era[J]. Steroids, 2017, 125: 1-13.
- [5] 国家卫生计生委合理用药专家委员会. 高血压合理用药指南(第 2 版)[J]. 中国医学前沿杂志: 电子版, 2017, 9(7): 28-126.
- [6] SUN YQ, DAI CM, ZHENG Y, et al. Binding effect of fluorescence labeled glycyrrhetic acid with GA receptors in hepatocellular carcinoma cells[J]. Life Sciences, 2017, 188: 186-191.

(收稿日期: 2020-02-27; 修回日期: 2020-08-28)

particle(VLP) vectors were introduced, and the application of cVLP vaccine in the prevention and treatment of tumor and chronic diseases was summarized. The pharmaceutical research of cVLP vaccine was carried out from three aspects: the construction and design of cVLP vaccine, the connection mode between VLP vector and immune epitope, and the structure confirmation. **Results and Conclusion** As a modified VLP, in addition to the construction of a self-assembled VLP vaccine against homologous viruses, cVLP can also present other virus or tumor-associated antigen epitopes in addition to VLP as a presentation vector, so as to realize co-immunization against multi-valent or multiple viral or tumor antigens. As a technology platform, cVLP can also play an important role in the prevention of viruses and the treatment of tumors and allergic diseases.

Key words: virus-like particle; chimeric virus-like particle; vaccine; progress

嵌合型病毒样颗粒(cVLP)属改良型病毒样颗粒(VLP),可利用VLP的组装能力进行其他非自我组装疫苗的研究,作为一种技术平台,利用某些在形成VLP起关键作用的组分,如以乙型肝炎病毒(HBV)核心抗原(HBcAg)为载体,在其有效部位插入其他病毒的外源抗原表位,形成一种多表位和多抗原的cVLP疫苗。VLP具有独特的免疫学特性,能通过影响抗原递呈细胞发挥佐剂效应,可作为其他佐剂、多肽疫苗和核酸疫苗的整合平台设计多种形式的疫苗,包裹核酸或其他小分子物质,以及作为分子运载工具靶向性递送基因或药物。此外,VLP还可替代天然病毒在免疫学检测中发挥重要作用。通过基因融合表达或化学偶联的方法将外源抗原多肽与VLP偶联,构建cVLP疫苗,可呈现除载体以外的其他病毒或肿瘤相关抗原表位,实现对多种病毒和肿瘤抗原的共同免疫,在预防病毒、治疗肿瘤及过敏性疾病中发挥重要作用,部分研究已进入临床试验阶段^[1]。在此,着重介绍目前常用的VLP载体病毒结构蛋白和噬菌体的应用情况。

1 常用VLP载体

1.1 HBcAg VLP载体

HBcAg VLP是构建cVLP的常用载体。HBcAg能形成VLP的结构,同时自身具有免疫原性、免疫佐剂等特性,是理想的疫苗载体,因此HBcAg VLP可用来呈现其他外源抗原,构建VLP疫苗,用于抗病毒、细菌、疟原虫、肿瘤等疾病的动物试验有良好的免疫效果^[2]。Sominskaya等、Apovia公司和巴斯德以HBcAg VLP为载体,分别构建了含HBV(前S1蛋白)、丙型肝炎病毒(HCV,高度保守的N端核心表位)抗原、恶性疟原虫环孢子蛋白中心重复序列和流感病毒M2基质蛋白胞外功能区(M2e)的cVLP,动物试验结果证明,cVLP安全、有效^[1]。

预防性乙肝疫苗的普遍接种,大幅降低了肝炎相关疾病的发病率,但仍亟待开发治疗性乙肝疫苗。HBV所致肝癌的发病率约占原发性肝癌的50%。有研究报道,利用HBV X蛋白(HBX)能使肿瘤调节蛋白,在肝癌细胞中呈高表达状态^[3-4]。利用HBcAg作为免疫载体蛋白,可将其他外源基因插入HBc基因中,如上面提到的HBX细胞毒性T细胞表位,或人类白细胞抗原(HLA)-DR结合表位(PADRE)等其他通用型T细胞表位,通过构

建这种嵌合基因,利用HBcAg自我组装能力进一步表达形成VLP,接种药物的小鼠,在挑战肿瘤30 d试验中可抑制肿瘤生长,同时诱导较强的T细胞反应^[3]。

有研究表明,机体对外源肽段免疫应答的强弱很大程度与肽段插入载体的位点有关,如HBcAg位置(N端、C端或刺突部位)的影响。外源肽段的首选插入位点为HBcAg的78~83位氨基酸位点主要免疫显性区域(MIR),最多可容纳120个氨基酸残基,可增强插入肽段的免疫原性;去除该区域某些特定的氨基酸残基后,可能会降低HBcAg自身的免疫原性^[5-6]。N端截短4个以内的氨基酸,可连接最多50个氨基酸残基,外源肽段很少表达在HBcAg颗粒表面;如果在N端加入PreC接头,可促使外源肽段在颗粒表面表达^[7]。C端常在144,149,156位氨基酸位点插入,最多可连接100个氨基酸残基,可完全或部分表达在颗粒表面^[12]。尽管在N端和C端连接的外源肽段的免疫原性不如插入刺突部位强,但HBcAg自身依然保持很强的免疫原性,因此插入外源肽段的位点需根据不同目的而进行设计。如可在N端或C端连接HBV的表位肽,构建抗HBV的疫苗。通常在HBcAg插入多个连续的B细胞和T细胞表位,能增强机体产生特异性的体液免疫和细胞免疫应答。

1.2 噬菌体载体

目前,国内外已制备出多种噬菌体VLP,常用的噬菌体载体是以噬菌体Q β 和AP205为呈递载体递送各种外源抗原,主要用于非感染性疾病,如过敏、阿尔茨海默病(AD)、自身免疫性疾病、2型糖尿病、肿瘤、高血压、尼古丁依赖症等,动物及人体临床试验结果显示这种cVLP具有一定的免疫性效果。瑞士Cytos公司以Q β 噬菌体VLP为载体研制了系列治疗性疫苗,包括AD疫苗(CAD106)、尼古丁疫苗(NIC002)、过敏性哮喘疫苗(CYT003-Q β G10)等,其中研制的针对血管紧张素II的降压疫苗(CYT00e-AngQ β)已完成IIa期临床试验^[8-9]。经鼻内免疫小鼠以噬菌体Q β 为载体的cVLP,能有效诱导小鼠的黏膜免疫和系统性免疫应答;用其呈递流感病毒M2蛋白的胞外区域,经鼻内免疫后,能诱导小鼠产生较强的M2特异性抗体反应和抗病毒作用^[10]。

人类免疫缺陷病毒(HIV)gp41蛋白高度保守的跨膜前域(MPER)可被某些单抗识别,因此可作为HIV疫

苗的中和靶点^[11]。通过化学偶联的方式将 gp41 肽段转栽于噬菌体 AP205 载体上构建 cVLP, 免疫小鼠可产生较高滴度的特异性抗体。根据选择的不同肽段, 免疫小鼠的血清可中和高敏感的 HIV-1 实验室毒株和不太敏感的原代分离株(不是 C 群原代分离株), 还具有抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)作用, 表明其 ADCC 表位可能位于 gp41 的远端区域^[11]。

另一种研究策略是将 HIV CCR5 蛋白偶联到噬菌体 Q β 载体上, 即将猕猴 CCR5(mCCR5)的 2 个肽段, 1 个 N 端(EC1)或细胞外第二表面 loop 区(ECL2), 与噬菌体 Q β 融合表达, 免疫 Q β -EC1 或 Q β -ECL2 后的恒河猴可诱导产生高滴度的抗 CCR5 抗体。接种该疫苗的恒河猴在进行猴免疫缺陷病毒(SIV)攻毒时, 其病毒载量低于对照组^[12]。

1.3 人乳头瘤病毒(HPV)L1 VLP 载体

因 HPV L1 蛋白是具有二十面体衣壳颗粒的结构特征, 其五聚体壳粒的规则排列保留了其构象表位, 具有与天然病毒颗粒相似的构象表位, 目前已上市的 HPV 疫苗及其他在研疫苗基本是选择重组表达 L1 蛋白作为目的基因; 由于其分子生物学及免疫学特性, HPV L1 蛋白还可作为其他感染性疾病及治疗性疫苗的载体。将 HPV16 型 L1 的 C 末端或 N 末端部分截短, 可插入一定长度的外源氨基酸序列, 并不影响病毒样颗粒的形成, 可以用来构建 cVLP 疫苗。

cVLP 既可表达自身载体的病毒衣壳蛋白, 还可表达肿瘤相关抗原的 T 细胞表位, 并自行组装成病毒样颗粒。以 HPV L1 为载体构建的 cVLP 疫苗用于治疗肿瘤等疾病, 首先用于治疗与载体本身密切相关的宫颈癌。GREESTONE 等^[13]研究发现, 通过分子生物学技术将 HPV E7 基因(位于 HPV 基因的早期区, 主要功能涉及 DNA 复制、转录调节及细胞转化, 也是治疗性 HPV 疫苗的研究靶点)与 HPV16 型 L1 或 L2 基因的 C 端结合, 通过昆虫-杆状病毒表达系统表达并提纯后的重组蛋白, 经透射电镜可观察到 VLP 颗粒结构, 动物试验证明其具有抑制肿瘤生长的作用。卞继峰等^[14]通过 pUC 质粒构建了重组 pUC19L1-E7, 又进一步以重组腺病毒 rAd5 质粒构建 HPV16L1-E7, 实现了重组 HPV16 L1-E7 融合蛋白在 293 细胞中的高效表达。I 期临床试验证实, 感染了 HPV16 型病毒并进展至宫颈上皮内瘤变(CIN)2/3 阶段的患者中接近 50% 在接受最后一针的 HPV16 L1-E7 cVLP 疫苗接种后, 病灶可缩小 50%^[15]。另外, 还有采用结合 HPV16 E6 和 E7 的 T 细胞表位的治疗策略^[15]。

除用于宫颈癌的治疗外, 利用 HPV 载体还可表达其他肿瘤相关抗原, 如人黏蛋白 MUC-1(一种恶性腺瘤标志物)。利用 HPV 载体表达的 MUC-1 免疫小鼠,

再用 MUC-1⁺的淋巴瘤细胞系攻毒, 免疫小鼠可获得较强的 T 细胞免疫反应, 同时肿瘤进展也相应减缓^[15]。

利用 HPV16 L1 表达 HIV 的相关疫苗研究中, 曾将 HIV gp160 的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)表位肽(aa120~128, aa814~823)连接于 HPV16 L1 的 C 末端, 构建具有 VLP 结构的 HIV 疫苗, 其作为黏膜免疫疫苗口服, 可有效诱导机体产生 HIV 特异的黏膜免疫反应和 CTL 细胞免疫反应, 从而保护黏膜系统免受 HIV 感染。

HPV 免疫原性具有型别特异性, 因此有必要开发具有广谱交叉保护作用的候选 HPV 疫苗。KANDA 等^[16]采用 HPV16 型 L1 和 L2 的抗原表位构建 HPV cVLP 疫苗, 即将 L2 肽段呈递于 L1 蛋白组装的 VLP 表面, 将构建的 cVLP 疫苗免疫家兔后, 可诱导其产生具有保护作用的针对 L1 和 L2 的中和性抗体, 且中和抗体可针对高危型 HPV18, 31, 52, 58 型假 VLP 产生交叉中和作用^[17]。

另外, 将 HPV45 L2 中和表位插入到 HPV18 L1 的表面环区, 构建 cVLP(18L1-45RG1)。疫苗免疫后的家兔可产生针对 HPV39, 45, 68, 70(属 HPV45 和 HPV18 同一支系)特异性的中和抗体。小鼠被动免疫该家兔血清后, 可耐受 HPV18, 39, 45, 68 型毒株的攻毒^[18]。

有研究团队分析了 20 种型别 HPV L1 的进化关系, 并与其中 8 种型别 HPV 衣壳粒五聚体晶体结构保守性进行比较, 发现型别特异性的优势中和表位是由表面的型别特异性氨基酸和 VLP 保守性整体结构共同组成的; 利用基于结构信息的同源替换方法, 在一种经过分子改造的 3 型别 cVLP(HPV58/33/32)上实现了各型别 HPV 抗原性和免疫原性的平衡, 在非人灵长类动物体内诱导出 3 倍剂量的与野生型混合 VLP 相当的交叉免疫保护抗体滴度; 利用晶体结构和冷冻电镜(cryo-EM)结构测定揭示了 cVLP 产生交叉保护的结构基础。采用以上研究策略设计了 4 种 3 型别 cVLP(HPV16/31/35, HPV56/66/53, HPV39/68/70, HPV18/45/59), 通过分子设计的通用性验证, 目前已制备了 7 种 cVLP, 可应对 20 种 HPV 型别的感染^[19]。

1.4 流感病毒 VLP 载体

流感病毒 VLP 是近年研究的热点。流感病毒表位易发生基因漂移和突变, 每年世界卫生组织(WHO)均需预测年度流行毒株, 并向企业发放在鸡胚上的适配流感毒株, 用于生产传统流感疫苗。研究人员为制备具有广谱保护作用的通用型流感疫苗, 可利用 VLP 载体表达来自不同流行毒株的 HA 或 NA 抗原表位, 或联合表达某些免疫刺激分子来增强流感抗原的免疫原性。

重组流感病毒 cVLP 疫苗目前有采用异源病毒载体表达 HA、NA 或 M1 蛋白。在小鼠和雪貂试验中, 免疫 H1N1 VLP 可保护动物产生针对同源流感病毒 H1N1 的抗体, 以及针对异源流感病毒 H5N1 的攻毒^[20]。与鼻喷

免疫途径相比,肌肉注射免疫途径还可诱导动物产生高滴度的免疫球蛋白(IgG和IgA)抗体,Ⅱ期临床试验中也显示具有较好的耐受性^[21]。另外,还有构建针对高致病性禽流感病毒H5N1和H7N9 HA、NA和M1的重组cVLP,小鼠接种H5N1 cVLP疫苗后,在经过同源或异源的H5N8毒株的攻毒后能全部存活;雪貂免疫H7N9 cVLP疫苗并联合佐剂,可获得针对H7N9高滴度的中和抗体,肺组织的病毒载量和病毒脱落均较对照组低^[22]。

除构建同源VLP的研究外,还有利用昆虫表达系统表达含流感病毒蛋白的逆转录病毒Gag的cVLP,其大小和形态与逆转录病毒相似^[23]。其他含流感病毒蛋白cVLP的研究中,有将HA蛋白的胞内区、跨膜区和严重急性呼吸综合征(SARS)S蛋白胞外区连接构建嵌合基因,共表达该嵌合基因和流感病毒M1蛋白,形成SARS-VLPs^[24],还有构建的水痘-带状疱疹病毒(VZV)cVLP、呼吸道合胞病毒(RSV)-cVLP^[25]、猪繁殖与呼吸综合征病毒cVLP^[26]、禽流感病毒和新城疫病毒(NDV)双价cVLP^[27]等。

另外,将HIV多个gp41表位,与流感病毒蛋白偶联形成重组gp41三聚体(rgp41),其包含保守的gp41表位,接种该疫苗的恒河猴可抵御13次异源猴艾滋病毒(SHIV)攻毒,经肌肉或鼻内途径接种该疫苗后的恒河猴均获得了免疫保护,但肌肉注射组仅有50%个体受到保护^[28]。

1.5 其他VLP载体

除以上常用VLP载体外,还有采用猫疱疹病毒(FHV)、植物病毒如烟草花叶病毒(TMV)和马铃薯病毒X(PVX)等作为VLP免疫载体。将HIV gp41高度保守的表位(ELDKWA)采用基因融合的方式插入PVX的N端^[29-31]。免疫该cVLP的小鼠可产生针对HIV-1 MN gp160衍生肽(H66)高滴度的IgG抗体,并能中和HIV-1病毒。此外,该疫苗联合人树突状细胞(DCs)可触发体内外周血单核淋巴细胞的增殖^[29]。

2 cVLP疫苗在防治肿瘤和慢性疾病中的应用

cVLP疫苗除可用于预防HBV、戊型肝炎病毒(HEV)、HPV、HIV等病毒感染导致的疾病外,还可用于治疗淋巴瘤、白血病、黑色素瘤和乳腺癌等肿瘤。肿瘤特异的表面抗原可刺激机体产生特异T细胞和体液免疫反应,利用噬菌体和植物来源的病毒作为肿瘤抗原的递送载体,该类载体在自然界中不感染人,也不会人体中复制。利用TMV的外膜蛋白或噬菌体QB表达肿瘤相关表面碳水化合物抗原(TACA),该抗原本身免疫原性较低,而通过构建的嵌合TMV-TACA则可以产生较高滴度的特异性抗体,同样嵌合QB-TACA也可获得较强的体液免疫反应^[32]。

还有表达全长人表皮生长因子受体-2(HER-2)或其他特异免疫表位的cVLP疫苗用于乳腺癌的治疗,目前已进入临床试验阶段。它是将HER-2外显结构域

肽段插入重组流感病毒体(IRIVs)中^[33-35]。其中P4(378-394),P6(545-560)和P7(610-623)3个免疫肽段可有效激发B细胞免疫反应^[36]。临床试验结果显示,有80%的接种者可获得特异性抗体,70%的患者免疫后产生HER-2特异性的IgG抗体,另外还可观察到细胞免疫反应,如白细胞介素2(IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ 干扰素(IFN- γ)细胞因子分泌增加^[37]。另一种策略是先对包膜流感病毒VLP进行修饰,将HER-2锚定在糖磷脂酰肌醇(GPI)上,由此构建cVLP(GPI-HER-2-VLP)。临床前研究结果显示,小鼠抗D2F2/E2(HER-2阳性)血清IgG抗体增强,动物血清IgG1,IgG2a,IgG2b水平也相应升高,最终达到辅助性T细胞(Th₁和Th₂)反应的平衡。

还有采用小鼠多瘤病毒(MPyV)的主要衣壳蛋白(VP1)和次要衣壳蛋白(VP2)作为VLP载体的应用^[38]。采用基因修饰后的VP2表达HER-2的N端结构域(包含细胞外结构域和跨膜结构域)构建cVLP(VP2Her21-683),在杆状病毒表达体系中可表达Her21-683Py cVLP颗粒。免疫后的小鼠进行HER-2阳性D2F2/E2细胞攻毒,87%的小鼠不会产生肿瘤。

利用植物病毒PVX构建HER-2阳性cVLP疫苗的应用,将PVX与含有HER-2细胞外结构域氨基酸387-394的P4B细胞表位进行化学偶联,可诱导小鼠产生较单独表达可溶性P4更高滴度的HER-2特异性抗体,该抗体可特异识别HER-2阳性乳腺癌细胞^[39]。

此外,还有针对高血压和AD等慢性病进行的主动免疫治疗。将血管紧张素Ⅱ化学偶联至噬菌体QB(AngQB)中,临床前研究结果显示,针对高血压大鼠模型,接种该疫苗可诱导产生针对血管紧张素Ⅱ高滴度的IgG抗体,血压可恢复正常^[40]。还有采用HPV,噬菌体QB,HBc,BPV-1等VLP载体来表达AD的A β 肽。其中用HPV偶联A β 的N端结构域可使机体产生高水平的抗体,其抗体滴度高于HPV偶联A β 的中间结构域或C端结构域,表明A β 的N端结构域具有重要的免疫原性。利用噬菌体QB与A β 1-6进行共轭连接,免疫QB-A β 1-6后的小鼠可产生A β 肽特异性抗体,形成的斑块比对照组少^[41]。Ⅰ期和Ⅱ期临床试验结果显示,47例AD患者在接受4次皮下或肌肉注射CAD106后,可诱导体内产生A β -特异性高滴度抗体^[42]。

3 cVLP疫苗的药学研究

3.1 cVLP疫苗的构建与设计

cVLP的构建主要与中和免疫表位、展示载体的选择、表位与载体的适配性等研究有关。通过中和表位选择有效靶点,利用结构学的预测及分析,与VLP载体构建cVLP,再通过生物学试验方法(中和试验和攻毒保护试验等)筛选出具有中和抗体的cVLP,进一步对cVLP

的免疫效果进行分析。中和免疫表位的选择与表位长度、表位与载体的适配性有关,表位与载体适配性又与表位筛选、表位长度、嵌合位点及载体长度有关;展示载体的研究包括 VLP 载体选择、载体长度与嵌合位点的选择有关;之后再通过结构学预测分析 cVLP 的高级结构。

具体针对重组 VLP 疫苗目的基因片段的选择,其病毒流行株的选择等是否合理,需结合对产品免疫原性、安全性及不同毒株间的交叉保护作用等方面进行综合考虑。另外,目的基因序列的选择需充分考虑对免疫原性、VLP 形成这两方面的影响。针对多种蛋白构建的 cVLP 疫苗的设计,不仅要考虑该疫苗所针对的蛋白,还需考虑对其他载体蛋白可能造成的影响^[43]。将外源抗原插入可自我组装的 VLP 后能否有效表达,并使外源抗原在 VLP 表面有效呈现,需进行表位与载体适配性研究,载体适配性主要是预测表位能否较好地嵌入到载体,以及形成的 cVLP 结构是否稳定,关系到疫苗整体的免疫原性。包膜 VLP 可在自我组装衣壳蛋白的基础上以其天然构象呈递外源抗原,而非包膜 VLP 主要通过基因融合和化学偶联的方式插入外源抗原,外源抗原的大小会影响 VLP 的组装和抗原的正确表达。

结构学预测是通过计算生物学、结构生物学和同源建模等方法分析 cVLP 的高级结构。通过计算机辅助分析 cVLP 的抗体亲和力,JOSHI 等^[44]利用该方法在 HPV VLP 的 EF 表面环成功表达了 HBV preS1 抗原,证实其具有与天然 HBV 亲和强度相似的抗体。还有分子动力学模拟研究检测分子间的相互作用(静电作用和亲、疏水特性)和结合能量的变化,预测 cVLP 结构的耐受性和稳定性^[45]。该方法已对在小鼠多瘤病毒 VLP 上插入流感抗原后的嵌合情况进行了分析,并将构建好的 cVLP 用非对称流分离系统和差示扫描量热法进行验证,结构与预测相符^[46]。

cVLP 疫苗的设计也给 RSV 疫苗带来了新的研究思路。RSV 是有包膜单股负链 RNA 病毒,根据 G 蛋白抗原特异性分为 A、B 两个亚型。1966 年,RSV 甲醛灭活疫苗(FI-RSV)免疫 2~7 月龄婴儿,RSV 疫苗引起再次感染,被称为 RSV 疫苗增强性疾病(ERD),目前尚无准确模拟人 ERD 全部特征的动物模型,RSV 疫苗研究难点在于需保持免疫病理与免疫保护间的平衡,cVLP 疫苗可在有效靶点的研究基础上,通过表位选择,尽量规避引起免疫病理的区域位点。有研究通过 RSV 特有的结构 DS-cav1 找到 RSV 有效的中和性抗原表位,通过结构学测算设计构建多种 cVLP,之后再利用 F 蛋白帕利珠单抗酶联免疫吸附(ELISA)法,高表达量及中和试验等筛选出能诱导高滴度中和抗体的 cVLP 株,动物试验具有较好的攻毒保护效力,且 cVLP 免疫血清能产生相对均衡的 IgG2a/IgG1 反应,提示能诱导

相对均衡的 Th₁/Th₂ 细胞免疫反应,cVLP 诱导的细胞免疫以 IFN- γ 分泌为主。

3.2 VLP 载体与免疫表位的连接方式

抗原表位或其他免疫刺激分子可通过化学或生物偶联的方式,以及基因工程技术引入到载体特定区域或病毒外壳蛋白的表面。

化学或生物偶联方式是通过化学修饰方式插入载体,这种化学修饰方式主要是针对 20 种天然氨基酸中的 5 种,即赖氨酸(氨基官能团)、谷氨酸和天冬氨酸(羧基官能团)、半胱氨酸(巯基官能团)和酪氨酸(羟基官能团)。如赖氨酸残基中含量较高的亲核官能团可与异硫氰酸酯或 N-羟基丁二酰亚胺(NHS)发生酯化反应。胺也可通过共价键连接到羧基上酰胺(肽)键,由羧酸选择性偶联,偶联剂有碳二亚胺(EDC)。谷氨酸和天冬氨酸残留物含有羧基,可使用 EDC 修饰,与胺反应形成稳定的酰胺键。半胱氨酸残基中含有巯基,可与卤乙酰或马来酰亚胺反应。酪氨酸残基含有酚羟基,可由重氮偶联进行修饰,这种修饰策略比上面列出的 4 种反应更复杂^[47]。

基因工程技术是将外源抗原插入到病毒衣壳蛋白表面,形成和病毒衣壳蛋白的基因融合形成 cVLP,主要有直接融合、linker 融合及蛋白 overcoat 3 种研究策略。直接融合是将外源抗原直接插入至衣壳蛋白的 N 端或 C 端^[48-49],将外源抗原提呈至衣壳蛋白表面 loop 区^[50]。虽然呈递的抗原常是选择能被 B 细胞识别的天然抗原表面 loop 区的表位,但内部抗原在一些条件下更适合呈递^[51]。linker 融合是利用氨基酸短肽(如多个甘氨酸残基)使外源抗原与衣壳蛋白相连接。每个衣壳蛋白单体一般具有碱性多肽域,如赖氨酸的-NH₂,这些碱性多肽域朝向颗粒的外表面,短肽等小分子只要带有合适的氨基酸基团,如-SH,可通过双功能 linker 结合并展示于 VLP 表面,刺激机体产生抗体。蛋白 overcoat 策略是利用手足口病毒(FMDV)2A 序列将外源抗原和衣壳蛋白序列相连接,在表达翻译过程中可引起不一致的核糖体跳跃,实现天然衣壳蛋白和融合蛋白的共同表达,这种策略在当插入序列较大时可使融合蛋白表达在每一个衣壳蛋白的颗粒表面^[52]。

3.3 结构确证研究

相比传统疫苗,对重组 cVLP 疫苗进行全面结构确证及质量特性研究是保证产品质量的重要方面,可参考基因工程重组产品的相关原则,对 VLP 疫苗结构及质量特性的研究通常包括分子量(质谱法、电泳法,并与理论值比较)、纯度、肽图分析、肽指纹图谱分析、N 端/C 端测序、等电点、圆二色谱、三维构象、中和表位研究、生物学活性等方面的检测。由于 cVLP 疫苗具备病毒样颗粒的高级结构,其结构确证也存在与常规重组产品较大的不同,需结合影响疫苗免疫原性的质量特性,重视对 VLP 的粒径

大小及结构完整性的研究。通过电镜及动态光散射等方法分析 VLP 颗粒的大小、分布及形态,最终保证组装的 VLP 颗粒的完整性和粒径的均一性。

另外,在采用不同表达系统时,需通过结构确证研究对表达抗原翻译后修饰进一步解析,如 N-端乙酰化、脱酰胺基、二硫键、糖化(glycation)、降解等,均需进行相应的确证研究。

4 结语

高效的中和免疫表位和展示载体的选择是 cVLP 疫苗设计成功的关键,单个表位的潜能可能有限,最理想的设计应是多表位的有机结合;表位与载体的适配性(包括长度范围、嵌合位点等)也决定了形成 cVLP 的结构及免疫效果。在一些病理机制尚不清楚的难研性疫苗研究中,cVLP 疫苗能提供一个新的研究思路,但其成功还需结合载体、佐剂及组合免疫等综合考虑。值得注意的是,并非所有病毒均可开发构建成为可自行组装的 VLP,作为 cVLP 疫苗研发的递呈载体。另外,从病毒结构的本身及选择目的基因出发到结构蛋白的稳定性等,均会影响可组装为 VLP 结构且具有良好免疫原性的 VLP 疫苗载体的研发,这些均需充分研究和论证。

参考文献

- [1] KUSHNIR N, STREATHFIELD SJ, YUSIBOV V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development[J]. Vaccine, 2012, 31(1): 58-83.
- [2] PUMPENS P, GRENS E. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes[J]. Intervirology, 2001, 44(2/3): 98-114.
- [3] DING FX, WANG F, LU YM, et al. Multiepitope peptide-loaded virus-like particles as a vaccine against hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2009, 49(5): 1492-1502.
- [4] SU F, SCHNEIDER RJ. Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor alpha[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(16): 8744-8749.
- [5] BORISOVA G, BORSCHUKOVA WANST O, MEZULE G, et al. Spatial structure and insertion capacity of immunodominant region of hepatitis B core antigen[J]. Intervirology, 1996, 39(1/2): 16-22.
- [6] SCHEDEL F, WEIMER T, WILL H, et al. Recombinant HBV core particles carrying immunodominant B-cell epitopes of the HBV preS2-region[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990: 193-198.
- [7] ULRICH R, NASSAL M, MEISD H, et al. Core particles of hepatitis B virus as carrier for foreign epitopes[J]. Adv Virus Res, 1998, 50: 141-182.
- [8] CHEN Q, LAI H. Plant-derived virus-like particles as vaccines[J]. Hum Vaccin Immunother, 2013, 9(1): 26-49.
- [9] MATEU MG. Structure and physics of viruses: an integrated textbook[M]. New York: Springer, 2013: 655-667.
- [10] BESSA J, SCHMITZ N, HINTON HJ, et al. Efficient induction of mucosal and systemic immune responses by virus-like particles administered intranasally: implications for vaccine design[J]. Eur J Immunol, 2008, 38(1): 114-126.
- [11] PASTORI C, TUDOR D, DIOMEDE L, et al. Virus like particle based strategy to elicit HIV-protective antibodies to the alpha-helic regions of gp41[J]. Virology, 2012, 431(1/2): 1-11.
- [12] VAN ROMPAY KK, HUNTER Z, JAYASHANKAR K, et al. A vaccine against CCR5 protects a subset of macaques upon intravaginal challenge with simian immunodeficiency virus SIVmac251[J]. J Virol, 2014, 88(4): 2011-2024.
- [13] GREESTONE HL, NIELAND JD, DE VISSER KE, et al. Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(4): 1800-1805.
- [14] 卞继峰, 于修平, 齐眉, 等. HPV16 L1-E7 重组腺病毒 rAd5 HPV16 L1-E7 的构建及克隆表达[J]. 山东医科大学学报, 2000, 38(2): 113-116.
- [15] KAUFMANN AM, NIELAND JD, JOCHMUS I, et al. Vaccination trial with HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles in women suffering from high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/3)[J]. Int J Cancer, 2007, 121(12): 2794-2800.
- [16] KANDA T, KONDO K. Development of an HPV vaccine for a broad spectrum of high-risk types[J]. Hum Vaccine, 2008, 5(1): 43-45.
- [17] KONDO K, OCHI H, MATSUMOTO T, et al. Modification of human papillomavirus-like particle vaccine by insertion of the cross-reactive L2-epitopes[J]. J Med Virol, 2008, 80(5): 841-846.
- [18] HUBER B, SCHELLENBACHER C, JINDRA C, et al. A chimeric 18L1-45RG1 virus-like particle vaccine cross-protects against oncogenic alpha-7 human papillomavirus types[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0120152.
- [19] LI ZH, SONG H, HE MZ, et al. Rational design of a triple-type human papillomavirus vaccine by compromising viral-type specificity[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 5360.
- [20] PERRONE LA, AHMAD A, VEGUILLA V, et al. Intranasal vaccination with 1918 influenza virus-like particles protects mice and ferrets from lethal 1918 and H5N1 influenza virus challenge[J]. J Virol, 2009, 83(11): 5726-5734.
- [21] LOPEZ-MACIAS C, FERAT-OSORIO E, TENORIO-CALVO A, et al. Safety and immunogenicity of a virus-like particle pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine in a blinded, randomized, placebo-controlled trial of adults in Mexico[J]. Vaccine, 2011, 29(44): 7826-7834.
- [22] LIU YV, MASSARE MJ, PEARCE MB, et al. Recombinant virus-like particles elicit protective immunity against avian influenza A (H7N9) virus infection in ferrets[J]. Vaccine, 2015, 33(18): 2152-2158.
- [23] HAYNES JR, DOKKEN L, WILEY JA, et al. Influenza-pseudo-typed Gag virus-like particle vaccines provide broad protection against highly pathogenic avian influenza challenge[J]. Vaccine, 2009, 27(4): 530-541.
- [24] LIU W, MASSARE MJ, BARNARD DL, et al. Chimeric severe

- acute respiratory syndrome coronavirus(SARS-CoV) S glycoprotein and influenza matrix 1 efficiently form virus-like particles(VLP)that protect mice against challenge with SARSCoV[J]. Vaccine,2011,29(38):6606-6613.
- [25] QUART FS, KIM Y, LEE S, et al. Viruslike particle vaccine induces protection against respiratory syneytial virus infection in mice[J]. J Infect Dis,2011,204(7):987-995.
- [26] XUE C, WANG W, LIU Q, et al. Chimeric influenza-virus-like particles containing the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 protein and the influenza virus HA and M1 proteins[J]. Arch Virol,2014,159(11):3043-3051.
- [27] SHEN H, XUE C, LYU L, et al. Assembly and immunological properties of a bivalent virus-like particle(VLP) for avian influenza and Newcastle disease[J]. Virus Res,2013,178(2):430-436.
- [28] BOMSEL M, TUDOR D, DRILLET AS, et al. Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges[J]. Immunity,2011,34(2):269-280.
- [29] MARUSIC C, RIZZA P, LATTANZI L, et al. Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type1[J]. J Virol,2001,75(18):8434-8439.
- [30] LU Y, XIAO Y, DING J, et al. Immunogenicity of neutralizing epitopes on multiple-epitope vaccines against HIV-1[J]. Int Arch Allergy Immunol,2000,121(1):80-84.
- [31] ARNOLD GF, VELASCO PK, HOLMES AK, et al. Broad neutralization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) elicited from human rhinoviruses that display the HIV-1 gp41 ELDKWA epitope[J]. J Virol,2009,83(10):5087-5100.
- [32] YIN Z, COMELLAS-ARAGONES M, CHOWDHURY S, et al. Boosting immunity to small tumor-associated carbohydrates with bacteriophage q β capsids[J]. ACS Chem Biol, 2013, 8(6): 1253-1262.
- [33] ZURBRIGGEN R. Immunostimulating reconstituted influenza virosomes[J]. Vaccine,2003,21(9/10):921-924.
- [34] BOVIER PA. Epaxal: a virosomal vaccine to prevent hepatitis A infection[J]. Expert Rev Vaccines,2008,7(8):1141-1150.
- [35] THOMPSON FM, PORTER DW, OKITSU SL, et al. Evidence of blood stage efficacy with a virosomal malaria vaccine in a phase IIa clinical trial[J]. PLoS One,2008,3(1):e1493.
- [36] WAGNER S, JASINSKA J, BREITENEDER H, et al. Delayed tumor onset and reduced tumor growth progression after immunization with a Her-2/neu multi-peptide vaccine and IL-12 in c-neu transgenic mice[J]. Breast Cancer Res Treat, 2007, 106(1):29-38.
- [37] WIEDERMANN U, WILTSCHKE C, JASINSKA J, et al. A virosomal formulated Her-2/neu multi-peptide vaccine induces Her-2/neu-specific immune responses in patients with metastatic breast cancer: a phase I study[J]. Breast Cancer Res Treat,2010,119(3):673-683.
- [38] CHEN XS, STEHLE T, HARRISON SC. Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry[J]. EMBO J,1998,17(12):3233-3240.
- [39] SHUKLA S, WEN AM, Commandeur U, et al. Presentation of HER2 epitopes using a filamentous plant virus-based vaccination platform[J]. Journal of Materials Chemistry B,2014,2(37):6249-6258.
- [40] AMBÜHL PM, TISSOT AC, FULURIJA A, et al. A vaccine for hypertension based on virus-like particles: preclinical efficacy and phase I safety and immunogenicity[J]. J Hypertens,2007,25(1):63-72.
- [41] WIESSNER C, WIEDERHOLD KH, TISSOT AC, et al. The second-generation active A β immunotherapy CAD106 reduces amyloid accumulation in APP transgenic mice while minimizing potential side effects[J]. J Neurosci,2011,31(25):9323-9331.
- [42] FARLOW MR, ANDREASEN N, RIVIERE ME, et al. Long-term treatment with active Abeta immunotherapy with CAD106 in mild Alzheimer's disease[J]. Alzheimer's Res Ther,2015,7(1):23.
- [43] CHEN HS, CONWAY MJ, CHRISTENSEN ND, et al. Papillomavirus capsid proteins mutually impact structure[J]. Virology, 2011,412(2):378-383.
- [44] JOSHI H, LEWIS K, SINGHARROY A, et al. Epitope engineering and molecular metrics of immunogenicity: a computational approach to VLP-based vaccine design[J]. Vaccine, 2013, 31(42):4841-4847.
- [45] LI Y, LIU X, DONG X, et al. Biomimetic design of affinity peptide ligand for capsomere of virus-like particle[J]. Langmuir, 2014,30(28):8500-8508.
- [46] ZHANG L, TANG R, BAI S, et al. Energetic changes caused by antigenic module insertion in a virus-like particle revealed by experiment and molecular dynamics simulations[J]. PLoS One, 2014,9(9):e107313.
- [47] POKORSKI JK, STEINMETZ NF. The art of engineering viral nanoparticles[J]. Mol Pharm,2011,8(1):29-43.
- [48] SHUKLA S, DICKMEIS C, NAGARAJAN AS, et al. Molecular farming of fluorescent virus-based nanoparticles for optical imaging in plants, human cells and mouse models[J]. Biomaterials Science,2014,2(5):784-797.
- [49] TISSOT AC, RENHOFA R, SCHMITZ N, et al. Versatile virus-like particle carrier for epitope based vaccines[J]. PLoS One, 2010,5(3):e9809.
- [50] PHELPS JP, DANG N, RASOCHOVA L. Inactivation and purification of cowpea mosaic virus-like particles displaying peptide antigens from *Bacillus anthracis*[J]. J Virol Methods, 2007, 141(2):146-153.
- [51] PATTERSON DP, RYNDA-APPLE A, HARMSSEN AL, et al. Biomimetic antigenic nanoparticles elicit controlled protective immune response to influenza[J]. ACS Nano, 2013, 7(4): 3036-3044.
- [52] Donnelly ML, Luke G, Mehrotra A, et al. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'[J]. J Gen Virol,2001,82(Pt 5):1013-1025.

(收稿日期:2020-07-22)