

艾滋病疫苗的研究进展

Progresses of HIV/AIDS Vaccine Research

张晓燕/ZHANG Xiao-yan, 徐建青/XU Jian-qing, 邵一鸣/SHAO Yi-ming

中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心,北京 100050

National Center for AIDS/STD Control and Prevention, China CDC, Beijing 100050, China

[摘要] 2005年初,在全球六大州19个国家共有35个艾滋病疫苗候选进入了人体早期临床实验。选用的抗原一般均着眼于诱导细胞免疫和体液免疫双重效果。从疫苗的存在形式上看,可供选择的HIV候选疫苗包括以下几种:传统疫苗(灭活疫苗和减毒活疫苗)、合成肽和蛋白亚单位疫苗、DNA疫苗以及活载体疫苗。目前新型疫苗研究策略包括抗原改造加强免疫原性、免疫佐剂协同以提高疫苗免疫反应强度;新型免疫策略包括初免/加强免疫策略和粘膜免疫策略。由于粘膜感染是艾滋病病毒感染的主要途径之一,因而,探索经粘膜免疫是未来疫苗发展的重要方向。中国艾滋病疫苗研究领域的现状是挑战与机遇并存,需要相关领域专家共同努力,以促进我国艾滋病疫苗研究的发展。

[关键词] 艾滋病疫苗,抗原改造,初免/加强免疫,粘膜免疫

[中图分类号] R512.91 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-7857(2005)-08-0075-05

Abstract : There are about 35 HIV vaccine candidates around the world entered into early phase of clinical trial at the beginning of 2005. The selected antigens usually could induce both cellular and humoral immune response. Currently the HIV vaccine candidates include traditional vaccine (killed or attenuated vaccine), peptide, protein subunit, DNA vaccine and live vectorial vaccine. The immunization strategies were developed to increase the immunogenicity through antigen priming/boosting, and mucosa immunization. There are both modification, immune adjuvant co-inoculation, numerous opportunities and challenges in the field of Chinese HIV vaccine research, therefore, we should work closely and effectively to facilitate HIV vaccine development.

Key Words: HIV vaccine, antigen modification, prime/boost, mucosa immunization

CLC Number : R512.91 **Document Code:** A **Article ID:** 1000-7857(2005)-08-0075-05

1 艾滋病疫苗的历史背景

艾滋病发现20多年来,世界各国政府及非政府组织投入大量资金和人力物力用于宣传教育、行为干预及药物治疗等领域。虽然在上述领域取得了一定成绩,但艾滋病的蔓延速度并没有减慢,反而不断加快。全球每天艾滋病病毒(HIV)感染人数由20世纪80年代的几百人到90年代的几千人,又到21世纪初的15 000人。2004年全球累积HIV感染者人数已达7 000万人,并造成3 000多万人的死亡。艾滋病在我国的流行状况也非常严峻,累计感染人数已超过100万,其中16万人已经死亡,HIV携带者和病人约84万人。更为严重的是,我国发展的速度是全球最快的国家之一,无论是按过去10年、5年还是3年的平均增长率计算,到2010年累积HIV感染人数均有可能突破1 000万。

艾滋病防治是一项长期而艰巨的任务,正在启动的全球艾滋病免费治疗是一项数百万到上千万人的终身治疗计划,必

将占用发展中国家有限的防治经费中的大部分资源。疫苗控制传染病具有最好的成本效益,对资源有限的发展中国家来说,将艾滋病疫苗作为一项可持续发展的重要策略尤为重要。正是基于这些考虑,中国政府在《中国预防与控制艾滋病中长期规划(1998-2010)》中,将研制出针对我国艾滋病病毒流行株的疫苗并完成临床试验作为国家的一项防治目标。

艾滋病疫苗的研究经历了逐渐改进与完善的过程。从最初的疫苗形式以单一的蛋白亚单位疫苗(Gp120或Gp160)为主,以诱导抗体预防病毒感染为主要目标,忽视细胞免疫的作用,或强调细胞免疫反应作用的同时忽视了体液免疫的作用;到更加注重体液和细胞免疫反应的均衡,发展DNA疫苗、活载体疫苗、多价蛋白疫苗全面发展,各类疫苗联合免疫(Prime/Boost策略)成为艾滋病疫苗的主流方向。伴随着超感染(同一个体先后感染不同的HIV毒株),以及其它病毒逃逸细胞免疫现象的发

现^[1-3],有效抗艾滋病疫苗的概念被进一步更新。疫苗的作用机制主要在于活化保守的细胞免疫或中和抗体。该阶段的疫苗仍在研发阶段,当前尚未进入临床试验。

回顾艾滋病疫苗研究的历史,我们看到艾滋病疫苗面临着严重的挑战:HIV攻击免疫系统以及高度遗传变异的特点,对疫苗设计构成严重困难;缺乏动物模型使HIV疫苗的评价依赖于临床试验;科研组织分散、经费投入不足等。艾滋病疫苗计划的风险和资金投入都很大,有强大疫苗研究发展实力的跨国生物技术公司对艾滋病疫苗的投入并不十分积极。国际上20多年的艾滋病防治实践显示,只有同时采取以宣传教育为主的行为干预和以疫苗为主的生物医学干预的双重策略,才能最终在全球控制艾滋病。

2 全球现行疫苗策略简介

现在各国科学家对研发HIV预防性疫苗达成了广泛的共识:有效的疫苗必须能

收稿日期:2005-06-07

基金项目:“863”新一代基因工程艾滋病疫苗研究项目(2003AA219100)等

作者简介:张晓燕,女,北京市宣武区南纬路27号中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心病毒与免疫研究室和参比实验室,副研究员,研究方向为慢病毒疫苗研究;E-mail:zhangxy@chinaids.org.cn
邵一鸣(通讯作者),男,中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心病毒与免疫研究室和参比实验室,主任,研究员,研究方向为病毒免疫与疫苗研究;E-mail:yshao@bbn.com

够诱导机体产生 HIV 特异性的 CD8⁺ 细胞毒 T 淋巴细胞反应 (CTL) 和中和抗体反应。目前各单一疫苗难以实现这一目标, 需要采用不同类型的疫苗联合免疫的策略才能提高艾滋病疫苗的效果。2005 年初, 在六大州 19 个国家共有 35 个艾滋病疫苗候选进入了人体早期临床实验。从疫苗的存在形式上看, 可供选择的 HIV 候选疫苗包括下列几种: 传统疫苗 (灭活疫苗和减毒活疫苗)、合成肽和蛋白亚单位疫苗、DNA 疫苗以及活载体疫苗。下面选取具有代表性的几种正在进入人体实验的疫苗进行介绍。

2.1 DNA 疫苗 (DNA Plasmid Vaccines)

DNA 疫苗是指把含有编码抗原蛋白基因的双链 DNA 分子 (主要指质粒 DNA 分子) 直接注射到体内, 通过抗原蛋白在体内的表达来诱导机体产生免疫反应的疫苗形式。1990 年, Wolff J A 等报道, 肌肉注射质粒 DNA 溶液能够在体内转染肌肉细胞并表达目的蛋白^[1]。随后, 很多研究证实, DNA 疫苗能够在各种动物体内诱导抗体、辅助 T 细胞、细胞毒性 T 细胞反应和保护性免疫^[2]。因此, 该疫苗很快成为抗感染、抗肿瘤免疫等领域的研究热点。与传统的灭活疫苗、减毒疫苗以及蛋白亚单位疫苗相比, DNA 疫苗具有如下优势。① 能够诱导有效的细胞免疫和体液免疫反应, 编码保护性免疫所必须的少数几种保护性抗原, 免疫反应较集中, 效率较高; DNA 疫苗能诱导构象依赖性抗体, 引发 CTL 反应, 并对变异株产生交叉保护。② 安全性好, 构建灵活。质粒 DNA 载体自身没有免疫原性, 可反复多次免疫, 技术通用性好、研发周期短、生产和运输成本低。以上这些特点使得 DNA 疫苗成为一种非常有希望的艾滋病候选疫苗。DNA 疫苗单独免疫产生的免疫反应较弱, 而与免疫佐剂、或重组病毒载体以 Prime-Boost 方式共同接种, 则可诱导较强 HIV 特异性的 CD8⁺ T 细胞免疫反应, 并且在灵长类动物实验中诱导了免疫保护反应。DNA 疫苗研究中常引起人们关注的问题如下。

2.1.1 安全性

1) 整合进入宿主细胞基因组: 外源 DNA 整合进入宿主细胞基因组, 可能引起原癌基因的活化, 或者肿瘤抑制基因的灭活等突变; 或通过引起染色体的断裂后重排而造成染色体的不稳定。随着疫苗载体被修饰以增加免疫原性, 这种整合的可能性渐增。目前可收集到的证据表明, DNA 疫苗整合进入宿主细胞基因组的可能性非常罕见。美国 FDA 建议每一种新的 DNA 疫苗在进入人体实验前, 都要进行是否与宿主细胞基因组 DNA 整合的动物实验研究。

2) 自身免疫: 对小鼠的研究表明, DNA 疫苗免疫不会引起系统的自身免疫。早期的人体实验也没有检测到抗核抗体或者抗-DNA 抗体的增加。通过追踪观察人体临

床实验的参加者自身免疫症状或体征, 以及实验室自身免疫的标记, 到目前为止, 尚未发现 DNA 疫苗引起自身免疫的有说服力的证据。

3) 抗生素的耐药性: 因为疫苗的 DNA 质粒携带某种抗生素的耐药性基因而得以选择性生长。有人担心, 在疫苗接种者体内产生相同的抗生素耐药性。两种防范措施使得这种结局难以发生: ① DNA 疫苗携带的耐药基因是出于细菌而非哺乳动物复制启动区, 因此仅在细菌中表达; ② 这种耐药性针对的抗生素通常已不用于治疗人类感染。

2.1.2 免疫原性

DNA 疫苗诱导的免疫反应来自于宿主细胞 (包括树突状细胞和肌肉细胞) 所摄取的质粒、经表达后递呈并活化相应的免疫细胞。表达的蛋白经过细胞浆内抗原的加工形成多肽, 与 MHC I 型分子结合, 递呈在细胞的表面, 刺激 CD8⁺ T 淋巴细胞的反应。同时也激活对质粒编码蛋白的抗体反应, 提示质粒编码蛋白可以接近并刺激 B 淋巴细胞。因此, DNA 疫苗可以模拟病毒感染的过程诱导体液免疫和细胞免疫反应。只是单独使用 DNA 免疫, 反应不强。

2.1.3 灵长类动物实验

在灵长类动物实验表明, 包括 DNA 疫苗在内的免疫配伍, 可以在免疫缺陷病毒攻击时提供免疫保护 (预防感染、降低病毒载量、改善临床预后)。比较有效的疫苗免疫方案如下: ① DNA 质粒初始免疫+重组的修饰性痘苗病毒 (MVA) 加强; ② DNA 质粒免疫+细胞因子免疫佐剂 (IL-2); ③ DNA 质粒免疫+非离子化连锁的共聚物的免疫佐剂 +/- 重组腺病毒载体加强; ④ DNA 质粒初始免疫+重组的鸟痘苗病毒 (fowlpox) 加强; ⑤ DNA 质粒免疫+细胞因子免疫佐剂 (IL-12)+重组 Gp140 蛋白加强。

众所周知, 其它的含有 DNA 疫苗的免疫配伍, 在灵长类动物接受 SIV 或 SHIV 的攻击时, 已经失败, 或者仅提供有限的保护时限。

2.2 痘病毒载体

与 DNA 疫苗相比, 活载体疫苗的优势体现在以下几方面: ① 能主动感染宿主细胞, 提高了外源基因进入细胞的效率; ② 载体自身有佐剂效应, 能诱导细胞因子和趋化因子的产生; ③ 多数能诱导长期的免疫应答。活载体疫苗主要包括基于 Canarypox 载体、Fowlpox 载体、Modified Vaccinia Ankara (MVA) 载体以及腺病毒载体的疫苗。常用的 HIV 候选疫苗的活载体, 能够容纳大量的外源基因, 可感染哺乳动物细胞, 诱导大量的外源蛋白的表达。各种痘病毒载体及其特点如下。

2.2.1 Fowlpox 载体疫苗 (FPV)

痘病毒科禽痘病毒属鸡痘病毒, 感染

范围仅局限于自然宿主和宿主来源细胞。鸡痘病毒为骨架的重组体接种哺乳动物细胞后引起外源基因的表达。

1) 安全性: FPV 已经被接种于家禽、小鼠、兔子、雪貂和猴子, 未见局部或系统性副作用。因为不能在非禽类物种体内复制, 对于可能的系统感染的担心要比具有复制能力的病毒载体低得多。Therion 生物技术公司采用 9 种不同的 FPV, 在 300 名癌症患者进行的多个 I 和 II 期临床研究数据已经支持了该疫苗的安全性。

2) 免疫原性: 大量的动物实验表明, 重组的 Fowlpox 病毒免疫可诱导针对所表达基因的产物的免疫保护反应, 包括体液免疫和细胞免疫, 可抵抗包括 HIV 和疟疾在内的各种感染。重组表达肿瘤抗原的 FPV 在动物和人体临床实验中, 均成功地被证实具有治疗效果。

3) 灵长类动物实验: DNA 疫苗初免、重组 FPV 加强的联合免疫在非人类灵长动物试验中诱导免疫保护, 抵御免疫缺陷病毒攻击。一项研究表明, 4 只免疫的恒河猴受到保护, 而其它所有的对照动物均被 SIV 感染。另外一项研究证实, 在没有引起保护的免疫动物中, 有些能够降低病毒载量、增加 CD4 细胞数、降低发病率和死亡率。

2.2.2 载体疫苗 (Modified Vaccinia Ankara, MVA)

这是高度减毒的牛痘病毒株, 研制的目的在于消灭天花。MVA 通过在鸡胚细胞中几百次体外传代而获得, 大约 10% 的痘病毒基因组被缺失, 但保留了在人体细胞内的复制能力。MVA 在人体细胞内的重组基因表达水平, 与具有完全复制能力的痘病毒载体相近。

1) 安全性: MVA 已经接种于大量的动物物种, 包括猴、小鼠、猪、羊、牛、马、象, 未见局部或系统性副作用。超过 120 000 人的临床实验, 已经证实了它的安全性。同时, MVA 肌肉、皮下、皮内免疫, 成功地抵御了天花的感染。最近, 由国际艾滋病疫苗行动组织 (International AIDS Vaccine Initiative, IAVI) 实施了以 MVA 作为 HIV 重组疫苗载体, 由 300 名志愿者参加的 I 期临床实验, 研究表明, MVA 是安全的载体。小鼠和非灵长类动物实验进一步证实了在免疫抑制的状态下 MVA 的安全性。最近, 采用 MVA 的相近的天花疫苗免疫表明, 在非常罕见的情况下, 能够引起心脏的心肌炎和心包膜炎症。另外, 还有心绞痛、心脏病发作。MVA 的免疫是否能够引起同样的心绞痛或心脏病发作还不清楚。

2) 免疫原性: 动物试验中, MVA 免疫具有免疫原性, 对 HIV、流感病毒、副流感病毒、麻疹病毒、黄热病毒、疟疾以及天花感染具有保护作用。猴体实验已经积累了大量的 MVA 疫苗免疫数据。在 DNA 疫苗初

始免疫后,采用表达 HIV 抗原的 MVA 联合免疫的策略,有效加强了诱导的免疫反应。

3) 灵长类动物实验:DNA 疫苗初始免疫,表达 HIV 抗原的 MVA 加强免疫的策略,在非灵长类动物体内诱导了针对免疫缺陷病毒的保护性免疫反应。在没有预防感染的免疫实验中,与对照动物相比,也观察到了较低的病毒载量、CD4 细胞数的增加、发病率和死亡率的降低。

2.2.3 非复制型腺病毒载体疫苗 (Nonreplicating Adenoviral Vector Vaccines)

腺病毒载体最初是作为基因治疗的工具被开发出来的。载体来源于 5 型腺病毒 (Ad5),通过缺失或者灭活 E1 或其它基因区而形成非复制型载体。HIV 腺病毒重组疫苗载体是用编码 HIV 抗原的 DNA 片断 (转基因),置换 1 个或多个可以进入人细胞的病毒基因成分,形成复制能力缺失的病毒载体。该载体携带 HIV 转基因进入细胞,表达 HIV 蛋白或多肽片断。通过这种方式,无需真正的病毒感染,非复制型载体将 HIV 抗原导入抗原递呈细胞的细胞浆内,然后结合 MHC I 型分子,递呈到细胞表面,被 CD8⁺ T 细胞识别,激发 HIV 特异性细胞毒性 T 细胞反应。作为 HIV 疫苗候选,已经进入动物和早期临床实验。

1) 安全性:腺病毒载体疫苗免疫已经产生下列问题。① 可能出现身体局部和系统的反应。已经有几百人参与的基因治疗疗效评估,多数是基于 Ad5。研究数据表明,当采用皮内或肌肉注射时,腺病毒引起的副作用非常微弱。在 HIV-1 Gag-Ad5 的临床实验中,当投药量逐渐增加时,发现中等程度、散在的注射位点的反应、身体不适,以及疼痛,尤其在大剂量、体内没有既存的 Ad5 中和抗体的个体内,反应尤为明显。这些副作用通常在注射后 24~48 小时消失。在腺病毒载体大量临床实验的背景下,一名患有鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺陷 (OTCD) 的十几岁青少年,在美国宾夕法尼亚大学接受 E1/E4-缺失型腺病毒载体基因治疗时死亡,促使有关方面重新评估人和动物实验的安全性数据。因此尽管肌肉小量注射尚未引起严重的副作用,系统性高剂量投药却引起 1 例致命性反应。目前, HVTN 使用肌肉注射腺病毒最高量为 1 011 颗粒单位,低于致死量的 300 倍。② 担心非复制型腺病毒转变为复制型的潜在可能。HIV 疫苗研究通常采用的腺病毒载体为 E1 缺失型,有时也采用 E3 或 E4 区缺失,亦或两者同时缺失。缺失的成分由包装细胞系提供,不再由载体本身产生,防止形成复制型腺病毒载体。③ 担心腺病毒载体在组织培养细胞释放病毒颗粒之前,可能引起细胞病变。理论上讲,一个疫苗的腺病毒载体可能通过和一个机体正在感染的腺病毒株进行重组,而形成具有复制能力

的腺病毒。这种情况很少见。不过腺病毒疫苗免疫的参加者如果患有上呼吸道感染,应该预防性监测重组腺病毒的脱落,预见隐伏的安全问题。

2) 免疫原性:编码 HIV 抗原的腺病毒载体在猴尾猿和人体实验中已经表明,能够引起强烈的 CD8⁺ T 细胞反应,也诱导了抗体反应。编码 SIV Gag 的 Ad5 免疫的恒河猴呈现了有效的细胞毒性 T 淋巴细胞反应,致病性 SIV 攻毒时显示明显的免疫保护;CD4 细胞数丢失减少,抑制急性、慢性病毒血症,降低发病率和死亡率。

3) 既存的载体免疫:美国 30%~70% 的临床实验参与者体内存有针对 Ad5 的中和抗体。1/3 的人中和抗体效价为 1:200 或者更高。南非人 Ad5 中和抗体接近 90%。既存的载体免疫似乎降低宿主对 Ad5 腺病毒载体疫苗的反应性。在猴中进行的 Ad5 初始免疫,限制了同样载体加强免疫的有效性。这种缺陷可以用增加疫苗剂量,或采用非同源性初始-加强免疫策略来克服。例如,猴实验用不同的血清型免疫 (Ad5 初始免疫-Ad24 加强) 提高了细胞免疫反应。一个初步实验报告提示 Ad5 初始免疫后,用 Canarypox Vector (ALVAC vCP 205) 加强,与同样采用腺病毒载体加强免疫的动物相比,诱导了针对 HIV 的更高的细胞免疫反应。

4) 灵长类动物实验:在动物模型中已经证实,腺病毒 HIV 疫苗载体可以激发高价的抗体和高频率的 CTL 反应,对灵长类动物的病毒攻击实验具有保护作用。在 I 期临床实验中,含有 HIV_{gag} 基因的腺病毒载体疫苗的系列免疫,或者作为 DNA 疫苗的加强免疫,引起了明显的 Gag 特异性 CD8⁺ T 细胞免疫反应。联合使用非复制型腺病毒载体进行免疫的策略,对免疫缺陷病毒的攻击提供了保护作用。与前述痘病毒载体实验相似,在疫苗免疫不能预防病毒感染时,与对照动物相比,也观察到了较低的病毒载量、CD4⁺ T 细胞数的增加、发病率和死亡率的降低。被证实有效的免疫配伍如下:

DNA 质粒初始免疫+重组腺病毒加强;

非同源性腺病毒初始-加强免疫策略。

2.3 蛋白与 (脂) 多肽疫苗 (Proteins, Peptides, Lipopeptides)

2.3.1 合成多肽疫苗

合成多肽疫苗是运用肽合成技术制备的一种高纯度制品,曾经是艾滋病疫苗研究中的一个十分活跃的领域。在 HIV 各种肽抗原中,含有中和抗体的主要抗原决定簇位于 Gp120 第三可变区 (V3) 序列。多肽疫苗是按照 HIV 膜蛋白含有中和抗体决定簇的第 3 可变区 (V3) 序列、用化学方法合成 25~35 个氨基酸的多肽 (V3 肽)。使用单一的或多聚体的 V3 肽进行免疫,以求诱导出相

应的中和抗体。由于它仅靠化学合成,工艺简单、无安全性顾虑,因此是最先进入人体试验的艾滋病疫苗。然而, I 期临床试验表明,此种疫苗刺激机体产生中和抗体和细胞免疫的能力较差^[3-5]。

2.3.2 蛋白亚单位疫苗

蛋白亚单位疫苗也是艾滋病疫苗研究的重点方向之一。已知 HIV-1 基因编码的各种蛋白产物大都有免疫原性,因而可将其有关基因重组后在细菌、酵母和真核细胞系统中表达,用作候选的保护性抗原。其中研究最多的是 HIV 膜蛋白 (Env 蛋白),这是因为此蛋白暴露在病毒颗粒表面,对免疫系统是很强的刺激原,所以,以重组膜蛋白为基础的亚单位疫苗一直是艾滋病疫苗临床试验的主角。但此类疫苗的缺点是基本不能引起机体产生细胞免疫。由于这类疫苗经过 I、II 期临床试验未观察到明显效果,部分接种后仍被 HIV 感染,致使美国国立卫生研究院 (NIH) 做出不再进行计划中的 III 期临床试验的艰难决定。经过几年的争论和出于对 HIV 疫苗的迫切需要,美国 VaxGen 公司和美国军队于 1999 年 4 月用此类疫苗在美国和泰国开始进行 III 期临床试验。2003 年 2 月, VaxGen 公司宣布,他们研制的 AIDSVAX Gp120 疫苗在历经 3 年的 III 期临床试验后,不能有效地预防 HIV 对人体的感染^[6],最终宣告失败。但是,有关专家认为,其教训对发展新一代疫苗也是很有意义的。

2.3.3 VLPs 疫苗

VLPs 疫苗是一类以 HIV 核心蛋白 Gag 为基础的复合疫苗。这种复合疫苗既不含 HIV 核酸,又囊括了尽可能多的 HIV 抗原决定簇,而且由于其组装成颗粒状,本身的抗原性极强,免疫动物无需佐剂,接种量可以很小,十分经济。在动物试验中,已观察到 VLPs 疫苗可诱导 CTL 及抗体反应,是有希望的新一代 HIV 疫苗。此类疫苗的缺点为纯化及保存较困难。至于其能否在人体观察到好的效果,尚需经临床试验检验。

3 艾滋病疫苗研究的最新进展——新型疫苗研究策略

3.1 抗原改造加强免疫原性

3.1.1 T 细胞疫苗的抗原改造

艾滋病病毒的遗传多样性决定了现场流行的艾滋病病毒与疫苗株病毒之间必然存在遗传学差异。由于免疫保护是由同时识别两者共同序列的免疫反应提供,因而,两者遗传距离越接近,疫苗所活化的免疫反应保护效果越好;相反,两者遗传距离越远,疫苗所活化的免疫反应保护效果越差。如何缩小两者之间的差异似乎是 T 细胞疫苗设计的关键点。目前,至少有 3 种策略在尝试之中,分别被称之为共同序列 (Consensus Sequence)、祖病毒序列

(Ancestor Sequence) 与树中心序列 (Center of Tree) 的策略^[7,8]。这些策略的共同点是,利用目前基因库的病毒氨基酸序列设计出一个人工的中心化序列,如此设计出的序列可能不同于任何单一的序列,但这样可避免选择边缘病毒株作为疫苗株,保证疫苗株序列与现场流行株序列距离较近。遗传学距离的接近能否诱导更多的交叉免疫学反应尚有待于验证,由于病毒在人群中不断地逃逸适应^[9],其共同序列应是一个在人群中免疫原性很弱的序列,因而,可能难以活化有效的免疫反应;而祖病毒序列中免疫原性强的表位在病毒的不断逃逸中已不复存在,因而,所活化的免疫反应对流行病毒株可能不具有保护力。树中心序列与其它序列相比,理论上亦不具备明显的免疫学优势。与以上策略相比,以活化针对保守 T 细胞表位为目的的疫苗策略更为可取。研究表明,不同亚型的 HIV 感染所活化的 T 细胞免疫具有很强的交叉反应^[10,11],而且有些保守表位已被确定^[12]。如何更好地活化保守 T 细胞表位的问题,是 T 细胞疫苗研究的关键。

3.1.2 中和抗体疫苗的抗原改造

由于目前已确定在膜蛋白上存在保守的中和表位,因而,目前这方面研究的目标大多是提高其保守中和表位的免疫原性。所采取的策略主要包括以下几类。①通过全部或部分切除 V 环^[13],或去糖基化^[14,15]的方法改造膜蛋白结构,提高保守中和表位的免疫原性。这种方式可以提高局部的免疫原性或抗原性,但至今尚不足以从根本上改变保守中和表位所处的隐蔽位置与弱免疫原性的状态。②通过基因洗牌 (Gene Shuffling) 的方式获得新的膜蛋白,用中和抗体大规模筛选出免疫原性强的膜蛋白为疫苗免疫原^[16]。③利用其它病毒的假病毒颗粒为载体,如鼻病毒或乙肝病毒的假病毒颗粒,将已知序列的中和表位置于载体表面作为免疫原^[17];利用特定的、在病毒感染过程中所必需的立体构象作为免疫原。

3.2 免疫佐剂协同以提高疫苗免疫反应强度

3.2.1 T 细胞疫苗佐剂

根据免疫佐剂作用的靶细胞可将其分为 3 大类:抗原递呈细胞 (APC) 佐剂、T 细胞佐剂以及同时作用于两类细胞的佐剂。APC 佐剂包括增加 APC 数量与分化的 GM-CSF,提高 APC 成熟的 CD40L 与 CpG; T 细胞佐剂包括促进 T 细胞极化的 IL-12、IL-18 与 IFN- γ ,增强 T 细胞激活的 IL-2 与 B7 分子,增强 T 细胞增殖的 IL-7 以及促进记忆性 T 细胞分化的 IL-15 等^[18]。另外,炎症因子与趋化因子可同时作用于两类细胞,比如 IL-6、IL-8、MIP-1b 等,因而也可以提高疫苗的免疫反应。

3.2.2 中和抗体疫苗佐剂

由于大多数抗体的产生为 T 细胞依赖

性,所以,提高 T 细胞活化的免疫佐剂一般都有助于抗体的产生,如 GM-CSF、CD40L 与 CpG 等。对 B 细胞活化有特异性辅助作用的是 C3d, C3d 的使用可以将抗体反应提高 1 至 2 个数量级^[19]。

3.3 新型免疫策略

3.3.1 初免/加强免疫策略

利用携带同一抗原的不同载体进行初免与加强,是目前广为应用的免疫策略。这一策略的最主要优势在于可以显著提高抗原特异性免疫反应,同时避免针对载体的免疫反应的影响;此策略已被用于提高 T 细胞或抗体的免疫反应。初免与加强的常用组合包括:DNA 初免/病毒载体加强以提高 T 细胞免疫反应, DNA 初免/重组蛋白加强^[20]提高活化的抗体免疫反应;其它更为复杂的组合也已被尝试。另外,由于有些载体在人群中已存在一定的免疫反应,所以,为避免已存在免疫反应的影响,更新的、其病毒本身在人群中很罕见的载体也已在研发之中,如,以腺病毒 11 和 35 型为骨架研发的载体^[21]。可避免原有免疫反应影响的新一代疫苗载体的研发必然会进一步促进疫苗研制的进展。

3.3.2 粘膜免疫策略

由于粘膜感染是艾滋病病毒感染的主要途径之一,而粘膜免疫的有效活化方式是经粘膜免疫,因而,探索经粘膜免疫是未来疫苗发展的重要方向。研究表明,粘膜免疫可以同时活化粘膜表面与系统的免疫力,而非粘膜免疫主要活化系统免疫力^[22],活化的粘膜免疫反应在抵御粘膜感染的病毒方面要有效得多^[23]。利用粘膜免疫作为初免、其它途径进行加强的免疫方式有可能取各自免疫途径之所长,因而,有一定的探索价值。

4 我国艾滋病疫苗领域的现状——挑战与机遇并存

近年来,在我国政府的高度重视下,在科技部、国际组织的大力资助下,由中国疾病预防控制中心牵头,我国系统、深入地开展了艾滋病疫苗的研究工作,并已制备了许多特色和创新点的候选艾滋病疫苗。政府的重视与支持、多支研究队伍的共识与努力,已使我国自行研制的艾滋病疫苗进入临床试验成为可能。经国家食品药品监督管理局 (SFDA) 批准,长春百克药业有限责任公司的“混合型艾滋病疫苗”于 2005 年进入 I 期临床试验。我国的优势在于其总体国力及长期以来靠自主研发疫苗控制传染病的成功实践中积累下来的上下游疫苗研发队伍和生产设施,这使中国成为南北合作中的发展中国家里最强的一支疫苗研发力量。同时,我国还拥有丰富的灵长类动物资源、HIV 感染高发病率人群、支持疫苗试验的专业化队伍和良好的现场组织系

统,更成为国际大规模艾滋病疫苗临床试验争夺的热点现场之一。我国研制艾滋病疫苗的优势具体体现如下。

4.1 具有国际瞩目的疫苗评价现场和高水准的流行病队列研究

我国 HIV 流行现场因其高发病率和疾控网络的良好组织支持系统,备受国际艾滋病疫苗领域的重视,因为这是西方组织支持系统虽好但发病率太低和非洲国家高发病率但组织支持太差的状况所不能比拟的。以往我国因缺乏资源,只有大量横断面调查,没有队列研究,故还未能完全达到支持疫苗评价的要求。自 2003 年以来,在美国 NIH 的大力支持下,结合国家攻关课题,我国疾病控制系统同时在广西、四川和新疆完成了 3 个大规模吸毒人群的、达到国际水准的队列研究。其中新疆现场 94% 的保持率是 NIH 在全球最高的。获得的 3 个现场的年发病率分别为 3% (广西)、5% (四川) 和 9% (新疆),显然可作为很好的艾滋病疫苗临床试验现场。

4.2 大规模分子流行病学研究奠定了我国艾滋病疫苗的坚实基础

国家疾控中心自 20 世纪 90 年代起组织过 2 次大规模的全国 HIV 分子流行病学调查,调查 HIV 感染者 3 000 多人,建立了拥有 3 000 多个 HIV 流行株序列的基因库,摸清了中国 HIV 流行株的分布,选定了以 B'/C 重组毒株 CN54 为主,以 B' 毒株 RL42 为辅的 HIV 毒株,作为疫苗研究的原型株 (B'/C 和 B' 亚型 HIV 病毒占全国感染人群的 85%)。这些工作建立了中国 HIV 疫苗研究自主知识产权的基础,为国内多支艾滋病疫苗研究队伍提供了 HIV 基因克隆和大量基因序列资料,推动了国内该领域的工作。鉴于这项工作的坚实基础,我国 CN54 毒株还被欧盟选作 EuroVac 计划的原型株,对国际艾滋病疫苗研究作出了贡献。

4.3 建立了 HIV 疫苗研发的全套技术平台并拥有自主知识产权和创新点

在科技部从“九五”开始的“863”计划资助下,构建了针对我国 HIV 流行株的蛋白、核酸和活载体候选疫苗,并建立了从疫苗设计到构建和免疫学评价的通用技术平台,并且这 3 类疫苗均拥有自主知识产权。其中中国疾病预防控制中心 (CDC) 与北京生物技术研究所以共同研制的以痘病毒天坛株 (该疫苗也是国家生物反恐储备苗) 为载体的艾滋病疫苗,是国际上唯一在大规模人群中使用过的活病毒载体艾滋病疫苗,具有很好的创新性。当前我国“863”计划支持的艾滋病 DNA 疫苗和重组痘苗疫苗已完成实验室研究,正在进行 GMP 生产和准备临床试验。

4.4 我国艾滋病疫苗 I 期临床研究取得新进展

2004 年 11 月 25 日,我国国家食品药

品监督管理局批准由我国自行研制的第一个复合型艾滋病疫苗(DNA 初始免疫、MVA 载体疫苗加强免疫)进入 I 期临床研究,用于进一步评价疫苗的安全性,疫苗抗原基因完全来自在中国流行的艾滋病病毒毒株。这标志着我国艾滋病疫苗 I 期临床研究取得了新的进展。2005 年 3 月 12 日,首批 8 名志愿者在南宁接种了艾滋病疫苗(或安慰剂)。自从在广西南宁投入临床研究,至今已有 7 组、34 名志愿者接种了艾滋病疫苗。志愿者均未出现副作用反应。I 期临床研究历时 14 个月。如果研究顺利完成并得到国家食品药品监督管理局认可,科研人员将开展 II 期临床研究,用以评价疫苗的免疫原性和扩大安全性试验^[24]。

然而,我国艾滋病疫苗的研制也还存在着很多问题,如:多年来我国对艾滋病疫苗研发投入的经费严重不足,产权难以保护;缺乏政策引导,研究队伍有限,力量分散;资助机制存在的弊病不利于我国 HIV 疫苗的发展;艾滋病疫苗研发缺乏研究、生产和现场评价的统盘考虑以及国家艾滋病防治工作发展的总体规划。因此,尽管艾滋病疫苗的研究富有特色和创新点,但却无力将之尽快推向临床试验。

5 中国艾滋病疫苗研究的未来展望

总之,HIV 感染在世界范围、特别是发展中国家的迅速蔓延,对人类健康、经济发展和社会安定正在造成严重影响,而艾滋病疫苗的成功研制是控制 HIV 流行的重要途径。

根据国际艾滋病疫苗研究的发展趋势和我国艾滋病疫苗研究的现状,建议组建中国艾滋病疫苗行动计划(China AIDS Vaccine Initiative, CAVI),整合现有疫苗研究队伍加入 CAVI,构建上下游结合的疫苗研究开发的联合体,并根据疫苗研发的需求,以国内有优势的队伍予以补充,以中国最好的队伍组合参与国际竞争。应制定适合国内研究实力的中国 HIV 疫苗研发计划,根据艾滋病疫苗是多组分疫苗联合应用的特点,有所为有所不为,将重点放在拥有中国特色、保障自主知识产权的有限疫苗路线上协同攻关,共同促进我国艾滋病疫苗的研究和开发。

(致谢:本文在写作的过程中得到了笔

者所在单位刘颖、刘勇 2 位博士的大力支持,在此表示感谢。)

参考文献 (References)

- [1] Wolff J A, Malone R W, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo[J]. *Science*, 1990, 247: 1 465~1 468
- [2] Donnelly J J, Ulmer J B, Shiver J W, et al. DNA vaccines[J]. *Annu Rev Immunol*, 1997, 15: 617~648
- [3] Keefer M C. San Francisco C A Infectious Diseases Society of America Annual Meeting, 1995
- [4] Rubinstein A, Goldstein H, Pettoello-Mantovani M, et al. Safety and immunogenicity of a V3 loop synthetic peptide conjugated to purified protein derivative in HIV-seronegative volunteers[J]. *AIDS*, 1995, 9: 243~251
- [5] Naylor P H, Szein M B, Wada S, et al. Pre-clinical and clinical studies on immunogenicity and safety of the HIV-1 p17-based synthetic peptide AIDS p17-based synthetic peptide AIDS vaccine—HGP-30-KLH[J]. *Int J Immunopharmacol*, 1991, 13 (1):117~127
- [6] Cohen J. Clinical research. A setback and an advance on the AIDS vaccine front [J]. *Science*, 2003, 300: 28~29
- [7] Gao F, et al. Centralized immunogens as a vaccine strategy to overcome HIV-1 diversity[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2004, (1): 161~168
- [8] Moore C B, et al. Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level[J]. *Science*. 2002, 296: 1 439~1 443
- [9] Gillespie G M, et al. Cross-reactive cytotoxic T lymphocytes against a HIV-1 p24 epitope in slow progressors with B*57[J]. *AIDS*, 2002, 16: 961~972
- [10] Francois -Bongarcon V, et al. Cross-clade HIV-specific CD8 T cell responses to Chinese B' and C/B' viruses in north American HIV-seropositive donors. Unpublished data
- [11] Sabbaj S, et al. Cross-reactive CD8+ T cell epitopes identified in US adolescent minorities [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2003, 33: 426~438
- [12] Yang Z Y, et al. Selective modification of variable loops alters tropism and enhances immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 envelope[J]. *J Virol*. 2004, 78: 4 029~4 036
- [13] Johnson W E, Desrosiers R C. Viral persistence: HIV's strategies of immune system evasion[J]. *Annu Rev Med*, 2002, 53: 499~518
- [14] Koch M, et al. Structure-based, targeted deglycosylation of HIV-1 gp120 and effects on

neutralization sensitivity and antibody recognition[J]. *Virology*, 2003, 313: 387~400

- [15] Xu L, et al. DNA shuffling creates HIV-1 gp120 variants that induce broadly neutralizing antibodies in rabbits [J]. *AIDS Vaccine*, 2004, abstract: 49
- [16] Arnold G, et al. Neutralizing of diverse HIV-1 primary isolates elicited by gp41 ELDKWA - displaying human rhinoviruses selected from combinatorial libraries[J]. *AIDS Vaccine*, 2004, abstract: 49
- [17] Berzofsky J A, et al. Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114: 450~462
- [18] Green T D, Montefiori D C, Ross T M. Enhancement of antibodies to the human immunodeficiency virus type 1 envelope by using the molecular adjuvant C3d [J]. *J Virol*, 2003, 77: 2 046~2 055
- [19] Otten G, et al. Induction of broad and potent anti-human immunodeficiency virus immune responses in rhesus macaques by priming with a DNA vaccine and boosting with protein-adsorbed polylactide coglycolide microparticles[J]. *J Virol*, 2003, 77: 6 087~6 092
- [20] Barouch D, et al. Immunogenicity of heterologous prime-boost vaccine regimens involving adenovirus serotypes 11 and 35 [J]. *AIDS Vaccine*, 2004, abstract: 3
- [21] Belyakov I M, et al. Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-vaccinia challenge [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 1 709~1 714
- [22] Belyakov I M, et al. The importance of local mucosal HIV-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes for resistance to mucosal viral transmission in mice and enhancement of resistance by local administration of IL-12 [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102: 2 072~2 081
- [23] Gherardi M M, et al. Prime-boost immunization schedules based on influenza virus and vaccinia virus vectors potentiate cellular immune responses against human immunodeficiency virus Env protein systemically and in the genitoretal draining lymph nodes [J]. *J Virol*, 2003, 77: 7 048~7 057
- [24]http://www.sfda.gov.cn

(注:本文参考文献除特别注明外,其它均来自笔者实验室实验结果以及下列网站资料: http://www.iavireport.org/trialsdb/default.asp; http://chi.ucsf.edu/vaccines)

(责任编辑 李慧政)

·读者·作者·编者·

《中国学术期刊文摘(英文版)》即将创刊

为了不断提高我国科技期刊在国际上的影响,促进国际科技界对我国科学技术研究整体水平的了解,推动我国科技工作者学术论文的国际交流,根据中国科协书记处的决定,我社将创办《中国学术期刊文

摘(英文版)》,并预计 2006 年 1 月出版创刊号。《中国学术期刊文摘(英文版)》是我国唯一的综合性英文版科技类学术检索刊物,将与《中国学术期刊文摘》(中文版)成为姊妹刊物。该刊由中国科学技术协会主

管,科技日报社主办,将以中国科协全国性学会主办的学术期刊为基础,选择一批我国优秀的中、英文科技期刊为来源刊物,收录其中重要的学术论文,以英文摘要形式登载。(本刊编辑部)