

· 综 述 ·

基于 CTL 的抗病毒治疗性疫苗研究进展^{*}林 盛^{1,2#}, 龙海霞^{1#} 综述, 朱 波^{1△} 审校

(1. 第三军医大学新桥医院全军肿瘤研究所, 重庆 400037; 2. 泸州医学院附属医院肿瘤科, 四川泸州 646000)

关键词: 细胞毒性 T 淋巴细胞; 治疗性疫苗; 树突状细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.17.016

中图分类号: R373.05; R186**文献标识码:** A**文章编号:** 1671-8348(2010)17-2281-03

随着现代分子生物学和免疫学的研究进展,关于疫苗的传统概念发生了革命性的变化,治疗性疫苗的出现彻底改变了疫苗只能预防的经典概念,大大拓展了人们对疫苗组成和功能的认识,被称为是疫苗学的第三次革命。治疗性疫苗目的在于诱导抗原特异的 T 细胞反应,能杀伤肿瘤细胞或感染有病原体的病态细胞;它能在已患病个体中诱导特异性免疫应答,清除病原体或异常细胞,使疾病得以治愈。治疗性疫苗与传统的预防性疫苗相比有以下优点:(1)传统预防性疫苗多为灭活、减毒活疫苗或重组亚单位疫苗,新型治疗性疫苗则为编码无毒力抗原蛋白的病毒核酸或能激发特异性机体免疫应答的细胞或多肽疫苗;(2)传统疫苗主要靠病毒的蛋白刺激机体产生中和性保护抗体,治疗性疫苗不仅能刺激机体产生保护性抗体,而且能刺激特异性细胞免疫应答;(3)传统预防性疫苗只能起到一定的预防作用,对于已感染病毒的个体却无能为力,而治疗性疫苗则不仅能预防疾病,而且更能起到特异性的治疗作用,具有更广泛的应用前景。

自 200 年前接种牛痘以预防天花后,疫苗已广泛用于传染病的预防和治疗。这些疫苗可以诱导机体产生保护性抗体,以获得对该病原体的免疫预防能力。然而,对某些慢性或潜伏性感染的病毒,这些抗体几乎不起作用。对于乙型肝炎病毒(HBV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、单纯疱疹病毒(HSV)、人乳头瘤病毒(HPV)等感染,则更多的依赖于细胞免疫,而不是单纯的抗体介导的体液免疫。对于这些慢性病毒感染,免疫治疗尤其是主动特异的、能诱导产生细胞免疫应答的治疗性疫苗接种则是一种非常有效的方式。因此,发展能有效激活免疫系统杀伤病毒感染细胞,而对自身组织却无损伤的治疗性疫苗,已迫在眉睫。

1 治疗性疫苗的基本类型

目前已有多种病毒治疗性疫苗被开发并应用于病毒的治疗研究。它们包括 T 细胞疫苗、树突状细胞(dendritic cells, DC)疫苗、多肽疫苗及核酸疫苗等,其中大部分疫苗都是基于或主要基于细胞毒性 T 细胞(CTL)表位的疫苗。

1.1 T 细胞疫苗 T 细胞疫苗是用 CTL 多肽表位在体外诱导产生特异性 CTL,后者被克隆、扩增、筛选和鉴定后,仅将主要组织相容性复合体(MHC-I)类限制性的 CD8⁺ T 细胞输入机体,诱导细胞免疫应答产生,而且直接回输 CTL,可以人为控制 CTL 的强度,避免其过度而导致大量受染细胞死亡,也可避免其过低,而无清除病毒作用。其中依据 MHC-I 类分子特异的多肽结合基序合成的多肽,在体外诱导产生的抗原特异性

CTL 细胞,用于治疗病毒性疾病,则是近年来的新设想。将 T 细胞从过去应用为靶细胞转变为效应细胞,为 T 细胞疫苗的概念增添了新的内涵。

越来越多的研究表明,病毒特异性 CTL 介导的细胞免疫具有清除病毒的功能,是宿主防御病毒感染的主要机制之一。国外已有报道,用特异性 CTL 过继免疫治疗接受骨髓移植后严重巨细胞病毒(CMV)感染的患者,获得满意效果,给受者输入体外扩增的 CMV 特异性 CTL,可安全有效地恢复机体对 CMV 特异的 T 细胞反应,且不产生任何病理损伤和中毒反应,在回输 1×10^7 个细胞后,患者可检出的 T 细胞反应的数量与有免疫力的骨髓供者相等甚至超出。

1.2 DC 疫苗 DC 是专职抗原提呈细胞,能有效地将抗原递呈给 T 淋巴细胞,从而诱导 CTL 活化。荷载抗原的 DC 具有疫苗的功能,故称 DC 疫苗。荷载的抗原既可以是病毒抗原、人类白细胞抗原(HLA)限制的 CTL 表位肽(8~10 个氨基酸的短肽),也可以是肿瘤细胞,还可以是编码肿瘤抗原的基因。由于 DC 疫苗可以不依赖于 CTL 靶细胞,又有较高的抗原递呈效率,正成为新一代疫苗的代表^[1]。

采用病毒抗原多肽体外致敏 DC,然后将其回输或免疫接种带病毒特异性抗原的宿主,能够激活抗病毒适应性免疫应答,从而有效控制病毒感染。Huang 等^[2]研究证明采用 HBV 表面抗原(HBsAg)脉冲的 DC 疫苗,在转基因小鼠体内能诱导有效的 HBV 特异性 CTL 免疫应答。Chen 等^[3]从 HBV 感染患者体内分离单核细胞来源的 DC 用以负载乙型肝炎核心抗原,检测到了高水平的 IL-12, HBV 特异的 CD8⁺ T 细胞增殖及 IFN- γ 高表达。Wu 等^[4]观察 HBsAg 致敏患者自体外周血来源的 DC 疫苗治疗 17 例非活动性 HBsAg 携带者的临床效果,结果表明 4 例携带者治愈,好转 13 例,证实将抗 HBV 的 DC 回输,可显著降低并清除 HBsAg 感染,且彻底治愈非活动性 HBsAg 携带者,是一种安全、有效的治疗方法。

1.3 多肽疫苗 多肽疫苗因制作工序简单、费用低廉、化学性质稳定、无致病性等优点而成为免疫治疗的新方法。由于病毒的感染特性,如果直接将整个病毒做为免疫原刺激机体产生特异性 CTL 反应,可能再次引起诸如 HIV 之类的病毒感染,可能给疫苗制备和接种疫苗的人群带来危险。因此,基于 CTL 表位的多肽疫苗在抗病毒感染中更具有独特优势。

传统免疫学理论认为,CTL 识别的是与 MHC-I 类分子结合的内源性肽。现已有证据表明,合成表位肽能直接与 MHC-I 类分子结合,而不需抗原提呈细胞(APC)的加工处

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471579,30571714);新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-06-0780);全国优秀博士学位论文作者专项资金资助项目(200776)。 [#] 第三军医大学新桥医院肿瘤研究所在读博士生。 [△] 通讯作者, E-mail: oncology-bozhu@yahoo.com.cn。

理;它和天然的内源性肽在激活免疫系统方面具有着同等的效力。用表位肽疫苗在体内外都能诱导出特异性的 CTL 杀伤靶细胞。Melief 等^[5]采用 HPV E6 及 E7 蛋白的一段交叠肽(30~35 个氨基酸),在油包水乳剂的辅助下能显著诱导针对 E6 及 E7 的 T 细胞免疫应答。Ⅱ期临床结果表明效果显著,11 例患者中的 4 例观察到明显的治疗效果,3/4 的患者可观察到病毒清除。Spearman 等^[6]设计了特异性针对 HIV 的 CTL 多表位肽疫苗,对 80 名健康志愿者的临床研究表明,该疫苗能诱导特异的 CTL 细胞免疫效应,并证实了其临床应用的安全性。正是由于多肽疫苗具有特异性强的优势,多肽疫苗在抗病毒免疫治疗中有着广阔的应用前景。

1.4 核酸疫苗 核酸疫苗是近几年才发展起来的一种新的疫苗,它由基因治疗发展而来。由于它具有能在体内有效表达,尤其是能表达目前未鉴定的抗原表位等优势,因而发展异常迅速。所谓核酸疫苗是指将含编码外源蛋白基因的质粒 DNA 直接导入动物组织,外源基因于体细胞中表达后,表达产物被提呈,与 MHC 结合,刺激机体产生相应的抗体和 CTL,分别介导体液免疫和细胞免疫应答。这种外源基因是抗原的来源,具有疫苗的功能,又称 DNA 疫苗。

Wang 等^[7]通过人巨细胞病毒(HCMV)表达的 3 个免疫显性抗原(pp65、IE1、IE2),在小鼠动物模型中,能刺激产生特异针对 3 种抗原的 CD4⁺ 及 CD8⁺ T 细胞亚群。另外在 HCMV 感染 6 个月的患者中也表现出强的巨细胞特异的 CTL 免疫应答。DNA 疫苗具有相对容易进行大规模生产、成本相对较低、性质比较稳定、便于储运等优点。更主要的是由于 DNA 疫苗编码的抗原能同时通过内源性及外源性抗原递呈,使抗原能同时递呈给 MHC-I 类分子及 MHC-II 类分子,因此 DNA 疫苗能同时诱导 CD8⁺ 及 CD4⁺ T 细胞反应,并能诱导体液免疫应答^[8-9]。但其局限性是 DNA 疫苗可以与宿主基因组整合,从而有可能破坏正常细胞的功能^[10]。再者,目前基因疫苗依然普遍存在基因表达水平低,诱导的免疫应答不足的缺点。RNA 疫苗能克服基因整合问题,但 RNA 极易被体液及皮肤中的核糖核酸酶降解,以致其使用受到限制^[11]。

2 治疗性疫苗在病毒免疫治疗中的研究进展

2.1 HIV 治疗性疫苗 Ide 等^[12]应用 HIV-1 来源的 HLA-A*2402 限制性 CTL 表位诱导 DC 制成的疫苗,对 4 例慢性 HIV-1 感染者进行临床 I 期实验。发现受试者对该疫苗耐受性良好,仅发生轻微的局部反应;酶联免疫斑点法(ELISPOT)检测 CD8⁺ 淋巴细胞中 IFN- γ 分泌情况,发现 2 例受试者体内产生了针对 HIV-1 的特异性 CTL 反应,且 T 细胞明显增多,但不能控制病毒反复增殖。Bazhan 等^[13]将 pcDNA-TCI 作为病毒核心,多肽蛋白总胆红素(TBI)位于表面制成类病毒颗粒形式的综合 HIV 疫苗。其中 TCI 包含 HIV-1 病毒 Env、Gag、Pol 及 Nef 蛋白来源 80 个 T 细胞表位,TBI 包含 HIV-1 病毒 Env、Gag 蛋白的多个 T 细胞及 B 细胞表位。将综合 HIV 疫苗免疫 BALB/c 鼠后发现,该疫苗与单独使用 TBI 蛋白疫苗或 pcDNA-TCI 质粒相比,能明显增强体液及细胞免疫应答水平,表明类病毒颗粒形式的综合疫苗有望成为 HIV 治疗性疫苗的新形式。Gahery 等^[14]利用 HIV 来源的 6 个多肽(分别为 Nef66-97、Nef117-147、Nef182-205、Gag183-214、Gag253-284 及 Env303-335)制成的脂肽疫苗应用于健康志愿者体内,以检测其有效性。发现 26 名志愿者中 25 名检测到 T 细胞增殖,22 名志愿者中 19 名检测到 CD8⁺ T 细胞反应。Pialoux 等^[15]将该脂肽疫苗应用于 24 例 HIV 慢性感染患者的Ⅱ期临床试验,

发现 23 例患者中 16 例体内产生针对至少一个多肽表位的 CD4⁺ 细胞增殖反应,13 例患者检测到 CD8⁺ 细胞免疫应答,9 例患者同时出现 CD4⁺ 及 CD8⁺ 反应。Connolly 等^[16]将 HIV 来源的 HLA-*0201 限制性表位 Gag386-394、Env134-142、Pol498-506 及流感病毒来源的 AMP58-66 分别负载 DC 制成疫苗,应用于 18 例 HIV 感染患者。分别皮下或静脉注射,高剂量或低剂量免疫 2 次,每次间隔 3 周。结果表明 18 例患者中 9 例产生至少针对一个表位的 CTL 反应。12 例产生针对流感病毒酸性黏多糖(AMP)蛋白的反应,3 例患者产生针对 4 种表位肽的显著 CTL 应答。

2.2 乙肝治疗性疫苗 Jiang 等^[17]报道用 HBV-S 蛋白 CTL 表位(HBsAg28-39)负载的 DC 疫苗免疫转基因小鼠,3 次免疫后取小鼠脾淋巴细胞体外刺激,检测 IFN- γ 及 CTL 表达水平。结果表明,该疫苗能诱导特异性 CD8⁺ T 细胞免疫应答,且能有效降低血清 HBsAg 及 HBV DNA 载量,表明表位肽负载的 DC 疫苗能诱导有效的抗病毒免疫反应。Zhang 等^[18]将 HBV DNA 疫苗结合 LIGHT 基因后应用于 BALB/c 小鼠体内,发现 DNA 疫苗结合 LIGHT 组诱导的 HBsAg 特异性 T 细胞增殖及特异的 CTL 细胞毒效应,明显高于单独使用 DNA 疫苗组,说明 LIGHT 有望成为 HBV DNA 疫苗能有效的免疫佐剂。Lu 等^[19]对 835 名 13~14 年前接受重组 HBV 疫苗免疫的受试者体内免疫反应情况进行研究。537 名受试者体内存在明显的免疫反应增强,结果说明 HBV 疫苗能有效降低 HBsAg 阳性率。Jain 等^[20]用脂多糖作为佐剂装载 HBsAg 制成疫苗免疫小鼠。结果表明以脂多糖为佐剂组诱导的抗 HBsAg IgG 滴度及细胞免疫应答强度为未采用佐剂组的 6~10 倍。Nyström 等^[21]对 44 名常规 HBV 疫苗免疫无应答者采用 HAV 与 HBV 相结合的免疫方法,部分无应答者表现出 HBsAg 特异的免疫应答,并伴有 HBsAg 抗体的产生。Wang 等^[22]将编码 HBsAg 的 DNA 疫苗(pcD-S2)结合西咪替丁后应用于小鼠体内,发现西咪替丁作为佐剂能显著增强 HBsAg 特异的细胞及体液免疫应答,有效提高 IL-4 及 IFN- γ 表达水平,且介导 IL-12 的高表达及 IL-10、转化生长因子 β (TGF- β) 低表达。

3 结 语

治疗性疫苗作为病毒的特异性主动免疫治疗,近年来的研究取得可喜进展,其诱导机体特异性免疫应答,清除病毒感染的作用已在动物实验及临床研究中得到肯定。但大多抗病毒治疗性疫苗都停留在理论研究阶段,真正能应用于临床的却少之又少。这主要在于治疗性疫苗有效的应用于病毒感染的免疫治疗,还存在不少问题尚待进一步研究:(1)核酸疫苗的安全性还需时间验证,多肽疫苗需要更好的佐剂增强其免疫原性。多肽疫苗和 DC 疫苗仅限于特定 MHC 限制性人群或自体治疗等缺点。因此如何进一步优化各种疫苗形式将是今后治疗性疫苗研究热点。(2)虽然有研究提出病毒抗原相对于宿主细胞来说是外来物质,针对它的免疫应答不会对宿主产生交叉反应。但某些病毒感染是与人体自身正常细胞相结合起作用的,如 HIV,这就对合适的疫苗设计增加了难度,既要产生抗病毒免疫应答,又要确保不引起自身正常细胞的损伤。(3)治疗性疫苗普遍存在免疫原性弱等缺点,因此选择能增强机体免疫应答的佐剂显得就尤为重要。目前,主要使用的佐剂有氢氧化铝、热休克蛋白、脂质体、类病毒颗粒及免疫刺激复合物等。但佐剂本身具致炎和毒性作用,且佐剂的作用机制尚不明确,其安全性尚待进一步研究。

治疗性疫苗的最终目的是能够激活有效的免疫反应,以使病毒得到彻底清除,并能产生长期的记忆性细胞反应,以防止病毒再次感染。随着对抗病毒免疫应答认识的不断深入,人们发现 CD4⁺T 淋巴细胞在抗病毒免疫应答中同样起着关键性的作用。CD4⁺T 淋巴细胞不仅有助于 CTL 的活化,而且其本身也发挥着多种效应细胞的功能。因此,理想的治疗性疫苗应是包括多种抗原的多种表位(包括 CTL 表位、B 细胞表位、Th 细胞表位)的合理搭配与组合的多价疫苗,在提高疫苗免疫原性以最大限度地发挥 CTL 的抗病毒作用的同时,充分利用其它抗病毒成分的功能。总之,随着对机体抗病毒免疫效应机制的进一步研究,治疗性疫苗应用于病毒感染患者的免疫治疗将会有更广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Ovali E, Dikmen T, Sonmez M, et al. Active immunotherapy for cancer patients using tumor lysate pulsed dendritic cell vaccine: asafety study[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2007, 26(2):209.
- [2] Huang Y, Chen Z, Jia H, et al. Induction of Tc1 response and enhanced cytotoxic T lymphocyte activity in mice by dendritic cells transduced with adenovirus expressing HBsAg[J]. *Clin Immunol*, 2006, 119(3):280.
- [3] Chen W, Zhang Z, Shi M, et al. Activated plasmacytoid dendritic cells act synergistically with hepatitis B core antigen-pulsed monocyte-derived dendritic cells in the induction of hepatitis B virus-specific CD8 T-cell response[J]. *Clin Immunol*, 2008, 129(2):295.
- [4] Wu BF, Yang JY, Zhou Y, et al. Clinical Research of Anti-HBV Dendritic Cell for Inactive HBsAg Carrier Patients[J]. *China Modern Doctor*, 2008, 46(7):15.
- [5] Melief CJ. Immunotherapy of established papilloma virus-induced (pre-)malignant lesions in mice, rabbits and patients[J]. *Ann Oncol*, 2006, 17(1):11.
- [6] Spearman P, Kalams S, Elizaga M, et al. Safety and immunogenicity of a CTL multiepitope peptide vaccine for HIV with or without GM-CSF in a phase I trial[J]. *Vaccine*, 2009, 27(2):243.
- [7] Wang Z, Zhou W, Srivastava T, et al. A fusion protein of HCMV IE1 exon4 and IE2 exon5 stimulates potent cellular immunity in an MVA vaccine vector[J]. *Virology*, 2008, 377(2):379.
- [8] Kim D, Hoory T, Wu TC, et al. Enhancing DNA vaccine potency by combining a strategy to prolong dendritic cell life and intracellular targeting strategies with a strategy to boost CD4⁺T cell[J]. *Hum Gene Ther*, 2007, 18(11):1129.
- [9] Hung CF, Monie A, Alvarez RD, et al. DNA vaccines for cervical cancer: from bench to bedside[J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(6):679.
- [10] Pejavar-Gaddy S, Finn OJ. Cancer vaccines: Accomplishments and challenges[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008, 67(2):93.
- [11] Rammensee HG. Some considerations on the use of peptides and mRNA for therapeutic vaccination against cancer[J]. *Immunol Cell Biol*, 2006, 84(3):290.
- [12] Ide F, Nakamura T, Tomizawa M, et al. Peptide-loaded dendritic-cell vaccination followed by treatment interruption for chronic HIV-1 infection: a phase 1 trial[J]. *J Med Virol*, 2006, 78(6):711.
- [13] Bazhan SI, Karpenko LI, Lebedev LR, et al. A synergistic effect of a combined bivalent DNA-protein anti-HIV-1 vaccine containing multiple T- and B-cell epitopes of HIV-1 proteins[J]. *Mol Immunol*, 2008, 45(3):661.
- [14] Gahery H, Daniel N, Charmeteau B, et al. New CD4⁺ and CD8⁺T cell responses induced in chronically HIV-1 infected patients after immunization with an HIV type 1 lipopeptide vaccine[J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2006, 22(7):684.
- [15] Pialoux G, Quercia RP, Gahery H, et al. Immunological responses and long-term treatment interruption after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) lipopeptide immunization of HIV-1-infected patients: the LIP-THERA study[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15(3):562.
- [16] Connolly NC, Whiteside TL, Wilson C, et al. Therapeutic Immunization with HIV-1 Peptide-Loaded Dendritic Cells is Safe and Immunogenic in HIV-1-Infected Individuals[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15(2):284.
- [17] Jiang WZ, Fan Y, Liu X, et al. Therapeutic potential of dendritic cell-based immunization against HBV in transgenic mice[J]. *Antiviral Res*, 2008, 77(1):50.
- [18] Zhang Y, Jiang W, Fan Y, et al. Engineering enhancement of the immune response to HBV DNA vaccine in mice by the use of LIGHT gene adjuvant[J]. *J Virol Methods*, 2008, 153(2):142.
- [19] Lu CY, Ni YH, Chang LY, et al. Long-term Efficacy and Immune Memory of Neonatal Recombinant Hepatitis B Vaccination in Adolescents Aged 13-14 Years[J]. *Int J Infect Dis*, 2008, 5(10):348.
- [20] Jain V, Sahu R, Misra-Bhattacharya S, et al. Enhancement of T-helper type I immune responses against hepatitis B surface antigen by LPS derivatives adjuvanted liposomes delivery system[J]. *J Drug Target*, 2008, 16(9):706.
- [21] Nyström J, Cardell K, Björnsdóttir TB, et al. Improved cell mediated immune responses after successful re-vaccination of non-responders to the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) vaccine using the combined hepatitis A and B vaccine[J]. *Vaccine*, 2008, 26(47):5967.
- [22] Wang J, Su B, Ding Z, et al. Cimetidine enhances immune response of HBV DNA vaccination via impairment of the regulatory function of regulatory T cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 372(3):491.