

## · 综述 ·

## 乙型肝炎治疗性疫苗研究进展

任珊 陈新月

成人罹患急性乙型肝炎康复后多表现出针对 HBV 核衣壳(HBcAg)、多聚酶和包膜蛋白(HBsAg)的多克隆抗体和特异性辅助性 T 细胞(CD4<sup>+</sup>T 细胞)及细胞毒性 T 细胞(CTL)应答。类似情况同样出现在慢性感染后自愈(约 10%)或对 IFN- $\alpha$  治疗有反应的患者中<sup>[1]</sup>。但这些细胞应答在慢性乙型肝炎患者体内非常弱甚至检测不到<sup>[2]</sup>。将携带 HBV 抗体捐献者的骨髓移植给慢性乙型肝炎患者,并促使后者病毒清除的研究使免疫疗法的概念得到验证<sup>[3]</sup>。基于此,新的免疫疗法——治疗性疫苗,目的即以诱导炎性细胞因子刺激 CD4<sup>+</sup>和 CTL 细胞应答为靶向,打破免疫耐受、重建或增强免疫应答从而抑制病毒复制。这些试验方案主要是在常规预防性疫苗的基础上形成的各种新型蛋白疫苗及 DNA 疫苗,其中可同时包括或者不包括药物调控的免疫应答。

## 一、蛋白疫苗

早期临床研究多集中于利用前-S1 抗原(Pre-S1)和 S 抗原来激活 T 细胞应答。但疗效有限,通过增加 HBV 抗原、非结构蛋白表位、改变疫苗形式或辅以新型佐剂等途径形成的新型疫苗,除迅速诱导细胞免疫功能外,也可提高 Th2 型免疫应答以增加保护性抗体。

1. 亚单位疫苗:HBV 蛋白中前-S1(Pre-S1)、前-S2(Pre-S2)抗原、S 和 HBcAg 的任一组合通过酵母或者其他真核细胞表达构成了治疗性亚单位疫苗。法国巴斯德实验室<sup>[4,5]</sup>对 118 名慢性乙型肝炎患者肌注 GenHevacB<sup>®</sup>疫苗(Pre-S2/S)发现疫苗组 HBV DNA 转阴率高于对照组(15% vs 2.7%,  $P=0.038$ )且入组时病毒载量低于 200 pg/ml 的受试者所获得的结果较好。遗憾的是,治疗结束 1 年后,两组受试者在 HBV DNA 转阴率、HBeAg 血清转换率方面没有显著性差异。另一项研究<sup>[6]</sup>对 27 名疫苗诱导免疫应答的受试者进行分析显示,1/4 的患者出现了大量针对 HBsAg 特异性 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞调控产生的 IFN- $\gamma$ 。相比之下,另一项研究<sup>[7]</sup>对 43 名慢性乙型肝炎病毒感染的儿童注射 GenHevacB<sup>®</sup>疫苗治疗后,病毒复制或 HBeAg 血清转换方面没有显著效果。可能是因为入组儿童病毒载量超过了 2000 pg/ml,围产期感染使其缺乏应答。同一疫苗试验方案研究显示<sup>[8]</sup>,GenHevacB<sup>®</sup>疫苗可以使 31 名 HBsAg 阳性而 HBV DNA 阴性的慢性乙型肝炎非复制携带者 3 人中的 HBsAg 发生血清学转换,提示该疫苗可以刺激慢性乙型肝炎非复制携带者的免疫应答。

另一项对 19 名处于病毒复制的慢性乙型肝炎携带者注射 Meinyu 疫苗

作者单位:100069 北京,首都医科大学附属佑安医院特需病房

通讯作者:陈新月, Email: chenxy63050639@Yahoo.com.cn

(HBsAg/Pre-S2)的研究显示<sup>[9]</sup>,有31%患者在末次注射后1年半时仍可以检测到增殖性T细胞应答。

另外有6名患者在缺乏CTL活动的情况下,可以检测到大量的IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 生成。

在接受Hepacare®疫苗(Pre-s2/Pre-S1/S)治疗的11名慢性HBV携带者中<sup>[10]</sup>,有10名出现了针对包膜抗原特异性的增殖性T细胞应答。然而,该应答与针对核衣壳抗原所产生的增殖性T细胞应答是各自独立的,而且没有检测到直接针对病毒感染的靶细胞的细胞毒性活动,即便在5名对疫苗有反应的患者中也是如此。疫苗组患者与对照组患者唯一有统计学意义的差异是,前者的淋巴细胞产生了更多的IL-5(一种Th2细胞因子)。在最近一项研究中<sup>[11]</sup>,42名慢性HBV携带者通过口服盐水溶液Hepacare®疫苗的方式使36%患者病毒载量显著降低,26%出现了HBeAg血清学转换,其中大部分患者肝脏组织学改善明显。更明显的是,自然杀伤细胞(NK细胞)的数量在所有患者中均有增加,伴随增殖性和细胞毒性应答的增加,IFN- $\gamma$ 生成增加、IL-10减少<sup>[12]</sup>。由于这些细胞在HBV感染过程中被激活并通过分泌各种细胞因子抑制病毒复制,因而在免疫中的地位非常重要<sup>[13,14]</sup>。

以上研究表明,增加抗原成分的亚单位疫苗接种确实能抑制慢性感染患者病毒复制,但这一效果短暂,仍不是理想的治疗性疫苗。因此还需要进一步改良以提高其疗效。

2. 免疫复合物型疫苗:改变抗原提呈方式增强免疫原性和调控应答类型,是治疗性疫苗研究的另一途径。由重组HBsAg和抗-HBs免疫球蛋白组合的抗原-抗体免疫复合物疫苗<sup>[15]</sup>可以通过增强FcR介导的MHC-I类提呈途径增加被抗原提呈细胞(APCs)捕获和提取的可能性从而增强HBsAg的免疫原性效果,增加HBsAg特异性T细胞的产生。该方法<sup>[16]</sup>对14名伴有病毒复制的慢性HBV携带者治疗后分别有64.3%和43%达到了病毒DNA低于检测下限和HBeAg消失。最新的治疗性疫苗YIC(重组酵母HBs抗原-抗体免疫复合物)Ⅱb期临床试验证实,在44周随访结束时60mg治疗组更易于获得HBeAg血清转换和DNA抑制(21.8%和9%, $P=0.03$ )<sup>[15]</sup>。

3. 多肽疫苗(表位疫苗):由于蛋白抗原最终是通过APC加工处理成表位多肽与MHC分子结合从而被特异性T细胞识别并激发免疫应答反应的,有观点认为这种有效的保护取决于一组抗原表位的组合与搭配。因此对抗原分子表位的研究成为近年来新的研究方向。

第一军医大学构建了多表位疫苗,在HBV基因组中优选了5个高度保守的人类白细胞抗原(HLA)表位识别肽,分别来自表面抗原、核心抗原、HBV DNA多聚酶、HTL及CpG岛核心序列。在大肠埃希菌和哺乳动物细胞NS-1中表达,Western印迹结果显示抗HBV患者的血清可特异识别此融合蛋白,提示该重组蛋白具有很强的抗原性和较理想的免疫原性。

Heathcote 等<sup>[17]</sup>通过另一种多肽疫苗对慢性 HBV 感染患者进行治疗。该疫苗包括:来源于 HBcAg 的一段多肽与乙型肝炎治愈患者 CD8<sup>+</sup> CTLs 所识别的抗原表位相对应;来源于破伤风毒素的一段多肽包含 CD4<sup>+</sup> 辅助 T 细胞所识别的基序;两个棕榈酸分子。有研究表明,该疫苗对健康受试者是安全的,且可以诱导针对 HBcAg 的 CTL 应答。另一项对 19 名慢性 HBV 携带者的研究未发现该疫苗具有不良反应。然而,该疫苗所诱导的细胞毒性活性相对较弱,仅仅是在健康受试者中所观察到的 1/10,在病毒抑制或 HBeAg 血清学转换方面没有作用,而且相关的 CTL 抗原表位仅有 1 个。因此可以认为,该疫苗在慢性乙型肝炎患者中治疗失败与缺乏辅助 T 细胞功能有关,这些患者中的 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞可能不能以持续和有效的方式帮助 CTLs 产生应答。

4. DC 疫苗(树突状细胞疫苗):治疗性 DC 疫苗利用 DC 较强的抗原提呈能力,负载 HBV 特异性抗原,既增强 T 细胞活化的第一信号,又能上调 DC 表面分子的表达,辅助刺激分子产生 T 细胞活化必需的第二信号。Li 等<sup>[18]</sup>用慢性 HBV 携带者自体 DC 负载 HBsAg 制成的 DC 疫苗治疗 19 例慢性 HBV 携带者,发现有 11 例(57.19%)显效,10 例(52.16%)清除了循环中的 HBeAg,有 5 例(26.13%)发生了 HBeAg 的血清学转换,并且还发现 DC 疫苗与拉米夫定联合应用能更有效清除 HBV。

5. 佐剂治疗性疫苗:氢氧化铝作为目前重组 HBsAg 疫苗的佐剂,其有效性和安全性已得到证明,但其主要诱导机体产生 Th2 类免疫应答和体液免疫,对 HBV 感染细胞清除作用有限。研究表明新型佐剂 CpG ODN(非甲基化胞嘧啶和鸟嘌呤核苷酸为核心的寡聚脱氧核酸)能激活 APC 表面的 Toll R9,诱导产生 IL-12、TNF- $\alpha$  等 Th1 型为主的细胞因子。据 Koike 等报道<sup>[19]</sup>,目前 CpG7909 作为乙型肝炎疫苗佐剂与 Engerix-B 联合免疫健康成年人,与对照组相比能迅速提高机体特异性抗体滴度,并能诱导产生较强的 CTL 反应,同时该佐剂能被人体很好的耐受。胞壁酰二肽(muramyl dipeptide, MDP)是弗氏完全佐剂的最小有效结构单位,其相对分子量很小活性很强,能增强体液免疫和细胞免疫。研究表明,MDP 衍生物 MDP-Lys(L18)克服了 MDP 的毒副作用(如致热原性、致炎、代谢迅速),用作重组 HBsAg 疫苗的佐剂皮下免疫小鼠,与铝佐剂的疫苗相比能诱导出较高的抗体滴度,并且在细胞免疫方面能产生较强的 DTH 反应<sup>[20]</sup>。

6. 抗病毒联合疫苗免疫治疗:以上临床试验表明,基于疫苗的免疫疗法对于抑制慢性乙型肝炎患者病毒复制是一种潜在有效的方法。然而,在大多数患者中,一旦治疗结束,疫苗所诱导的免疫应答很快会消失。因此,以辅助细胞如 IL-2 为靶向的免疫调节疫苗联合抗病毒药物治疗慢性乙型肝炎的研究成为热点。14 名接受 Engerix-B<sup>®</sup>疫苗和拉米夫定联合治疗的患者中,有 9 名 HBV DNA 转阴。相比之下,给予小剂量 IL-2 并未能增加疫苗的疗效。最近一项研究<sup>[21]</sup>重复了以上的试验证实联合治疗组的患者其 HBeAg 血清学转换显著高于拉米夫定单药治疗组。另外一项研究<sup>[22]</sup>所用疫苗包含 100  $\mu$ g 纯化冰冻重组 HBsAg,并以 AS02B



(包含 L18、QS21 和油)为水性乳液佐剂。其结果表明,疫苗和拉米夫定联合治疗是安全可耐受的。尽管联合治疗诱导产生了大量的 HBsAg 特异性细胞因子以及表面抗体,但与拉米夫定单药治疗相比,未能提高 HBeAg 血清学转换率(18.8% vs 16.1%,  $P=0.6874$ )。

## 二、DNA 疫苗

最新研究的 DNA 疫苗<sup>[23,24]</sup>将 HBsAg 的 DNA 负载于质粒上接种患者使其在体内重新合成 HBsAg,消除注射和反转的风险,并反复刺激免疫活性细胞产生与减活病毒疫苗同样效果的体液免疫和细胞免疫。此外,质粒骨干上的免疫刺激性非甲基化 CpG 位点使 DNA 疫苗具有内嵌的佐剂,使 T 细胞两极化,产生 Th1 应答,从而生成 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  等细胞因子<sup>[24]</sup>。第一个治疗性 DNA 疫苗试验<sup>[25,26]</sup>是在 HIV 慢性感染患者中进行的,旨在触发已存在的但是较弱的记忆应答,同时诱导长期细胞毒性应答,以此控制病毒复制。对于 HBV 而言,首先应该评估受试者对 DNA 疫苗的耐受性。Mancini-Bourgine 等<sup>[27]</sup>对 10 名现有治疗应答不佳的慢性 HBV 感染者肌注 DNA 疫苗,除 2 名患者表现为疾病恶化(未出现肝衰)外,其余均耐受良好。所有患者均出现 HBV DNA 水平的降低和 HBeAg 血清学转换,同时还检测到血清 IFN- $\gamma$  增高。

另外两个 I 期临床试验正在进行。一项在冈比亚进行的试验研究了疫苗联合或未联合拉米夫定治疗的效果。在该试验中,基因疫苗未诱导出可检测的 HBV 特异性 T 细胞,但 HBeAg 阴性的慢性携带者尤其是病毒载量较低的患者,在经过重组疫苗增强后,却可以检测到特异性细胞免疫应答。6 个月后,尽管疫苗接种可以较好耐受,但却未能再次检测出细胞应答。另一个在立陶宛进行的研究评估了 12 名慢性 HBV 携带者拉米夫定与疫苗联合治疗的效果。在该研究中所有受试者对编码 3 个 HBV 包膜蛋白外加 IL-12 的 DNA 疫苗都能较好耐受,有 8 名患者在末次疫苗注射后其病毒 DNA 阴性可以持续 1 年以上,同时他们的血清 IL-12 浓度亦有所升高。

## 三、结论和展望

总而言之,疫苗接种仍然是最便宜而且最有效的避免 HBV 感染的方法。很多疫苗注射制剂的疗效在健康受试者研究中已经得到证实。然而,在慢性 HBV 感染患者中该疗效并不长久,有很多因素必须进行评估。亟待解决的主要问题是疫苗所包含的抗原都以直接诱导针对病毒包膜的 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞应答为目的,然而刺激产生有效的细胞免疫应答同样还需要很多其他的抗原。同样值得考虑的是目前研究热点的 DC 疫苗、表位疫苗及蛋白疫苗额外的免疫刺激序列都将免疫应答指向扩大细胞和体液应答,但给药模式同样需要优化,应以能有效向免疫系统提呈抗原为靶向。另外一个重要因素是免疫疗法初始低病毒 DNA 可以增加诱导免疫应答产生的机会,这一因素使很多试验都将抗病毒治疗或免疫调节药物的降低病毒载量作用与疫苗相联合,以此触发免疫应答<sup>[28,29]</sup>。究竟免疫疗法是否比单纯的抗病毒药物联合治疗更为有效,只有对慢性携带者和康复患者相关

因素的不断理解,才能得到确定的答案。除了以上免疫效应的分析外,疫苗在人体中的真实潜在作用、安全性问题以及过量诱导免疫应答造成肝炎恶化的可能性都应在考虑范围内。

## 参 考 文 献

- 1 Rehmann B, Lau D, Hoofnagle JH, et al. Cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Invest*, 1996, 97:1655-1665.
- 2 Webster GJ, Reigat S, Brown D, et al. Longitudinal analysis of CD8<sup>+</sup> T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. *J Virol*, 2004, 78:5707-5719.
- 3 Shouval D, Ilan Y. Transplantation of hepatitis B immune lymphocytes as means for adoptive transfer of immunity to hepatitis B virus. *J Hepatol*, 1995, 23:98-101.
- 4 Pol S, Driss F, Carnot F, et al. Efficacy of immunotherapy with vaccination against hepatitis B virus on virus B multiplication. *C R Acad Sci III*, 1993, 316:688-691.
- 5 Pol S, Driss F, Michel ML, et al. Specific vaccine therapy in chronic hepatitis B infection. *Lancet*, 1994, 344:342.
- 6 Couillin I, Pol S, Mancini M, et al. Specific vaccine therapy in chronic hepatitis B: induction of T cell proliferative responses specific for envelope antigens. *J Infect Dis*, 1999, 180:15-26.
- 7 Dikici B, Kalayci AG, Ozgenç F, et al. Therapeutic vaccination in the immunotolerant phase of children with chronic hepatitis B infection. *Pediatr Infect Dis J*, 2003, 22:345-349.
- 8 Yalcin K, Acar M, Degertekin H. Specific hepatitis B vaccine therapy in inactive HBsAg carriers: a randomized controlled trial. *Infection*, 2003, 31:221-225.
- 9 Ren F, Hino K, Yamaguchi Y, et al. Cytokine-dependent anti-viral role of CD4-positive T cells in therapeutic vaccination against chronic hepatitis B viral infection. *J Med Virol*, 2003, 71:376-384.
- 10 Jung MC, Gruner N, Zachoval R, et al. Immunological monitoring during therapeutic vaccination as a prerequisite for the design of new effective therapies: induction of a vaccine-specific CD4<sup>+</sup> T-cell proliferative response in chronic hepatitis B carriers. *Vaccine*, 2002, 20:3598-3612.
- 11 Safadi R, Israeli E, Papo O, et al. Treatment of chronic hepatitis B virus infection via oral immune regulation toward hepatitis B virus proteins. *Am J Gastroenterol*, 2003, 98:2505-2515.
- 12 Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, et al. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today*, 2000, 21:573-583.
- 13 Doherty DG, Norris S, Madrigal-Estebas L, et al. The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns. *J Immunol*, 1999, 163:2314-2321.
- 14 Kakimi K, Lane TE, Chisari FV, et al. Cutting edge: Inhibition of hepatitis B virus replication by activated NK T cells does not require inflammatory cell recruitment to the liver. *J Immunol*, 2001, 167:6701-6705.
- 15 Xu DZ, Zhao K, Guo LM, et al. A randomized controlled phase IIb trial of antigen-antibody immunogenic complex therapeutic vaccine in chronic hepatitis B patients. *PLoS ONE*, 2008, 3:e2565.
- 16 Celis E, Abraham KG, Miller RW. Modulation of the immunological response to hepatitis B virus by antibodies. *Hepatology*, 1987, 7:563-568.
- 17 Heathcote J, McHutchison J, Lee S, et al. A pilot study of the CY-1899 T-cell vaccine in subjects chronically infected with hepatitis B virus. The CY1899 T Cell Vaccine Study Group. *Hepatology*, 1999, 30:531-536.
- 18 Li YG, Chen M, Zhang DZ, et al. Clinical research on the treatment effect of autologous dendritic cell vaccine on the patients with chronic hepatitis B. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2003, 11:206-208.
- 19 Koike Y, Yoo YC, Mitobe M, et al. Enhancing activity of mycobacterial cell-derived adjuvants on immunogenicity of recombinant human hepatitis B virus vaccine. *Vaccine*, 1998, 16:1982-1989.
- 20 Vitiello A, Ishioka G, Grey HM, et al. Development of a lipopeptide-based therapeutic vaccine to treat chronic HBV infection. I. Induction of a primary cytotoxic T lymphocyte response in humans. *J Clin Invest*, 1995, 95:341-349.
- 21 Boni C, Penna A, Ogg GS, et al. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy. *Hepatology*, 2001, 33:963-971.
- 22 Davis HL, Michel ML, Whalen RG. DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and

- high levels of circulating antibody. *Hum Mol Genet*, 1993, 2: 1847-1851.
- 23 Michel ML, Davis HL, Schleef M, et al. DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice: aspects of the humoral response mimic hepatitis B viral infection in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 5307-5311.
- 24 Sato Y, Roman M, Tighe H, et al. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science*, 1996, 273: 352-354.
- 25 Calarota S, Bratt G, Nordlund S, et al. Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients. *Lancet*, 1998, 351: 1320-1325.
- 26 Calarota SA, Leandersson AC, Bratt G, et al. Immune responses in asymptomatic HIV-1-infected patients after HIV-DNA immunization followed by highly active antiretroviral treatment. *J Immunol*, 1999, 163: 2330-2338.
- 27 Mancini-Bourgine M, Fontaine H, Scott-Algara D, et al. Induction or expansion of T-cell responses by a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers. *Hepatology*, 2004, 40: 874-882.
- 28 Dahmen A, Herzog-Hauff S, Bocher WO, et al. Clinical and immunological efficacy of intradermal vaccine plus lamivudine with or without interleukin-2 in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol*, 2002, 66: 452-460.
- 29 Boni C, Penna A, Bertolotti A, et al. Transient restoration of anti-viral T cell responses induced by lamivudine therapy in chronic hepatitis B. *J Hepatol*, 2003, 39: 595-605.

(收稿日期: 2008-08-11)

(本文编辑: 温少芳)

任姝, 陈新月. 乙型肝炎治疗性疫苗研究进展 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2009, 3 (2): 215-220.