

主 编：孙树汉

副主编：戴建新 张平武 陈蕊雯

核 酸 疫 苗



第二军医大学出版社

核 酸 疫 苗

主 编 孙树汉

副主编 戴建新 张平武 陈蕊雯

编 者 (按姓氏笔画顺序排列)

王庆敏 王慧丽 孙树汉 任少强 陈蕊雯

吴 丹 吴海波 张平武 张国友 杨 桦

项洪刚 郭瀛军 戴建新

第二军医大学出版社

内 容 简 介

本书系统地阐述了与核酸疫苗相关的免疫学基础及其免疫机制,介绍了从疫苗的构建到临床前研究的相关理论、策略和具体的技术方法,全面地反映了当今国际上核酸疫苗研究的最新进展。全书共八章,包括概论、核酸疫苗的免疫学基础、核酸疫苗的构建、免疫流程、免疫保护效应的评价、影响核酸疫苗诱发机体免疫应答的因素、中试研究及安全性评价、核酸疫苗的应用。最后在书末附录中介绍了中国生物制品规程、人用重组DNA制品质量控制要点、新生物制品审批办法和新制品人体观察的技术要求等法规。

本书可供综合性大学、农林、医学院校及研究所有关专业的科研人员、教师、研究生和高年级本科生参考。

图书在版编目(CIP)数据

核酸疫苗/孙树汉主编. —上海:第二军医大学出版社,2000.5

ISBN 7-81060-078-8

I.核… II.孙… III.核酸—疫苗—研究 IV.R979.9

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 20233 号

305 / 30
22

核 酸 疫 苗

主 编:孙树汉

副 主 编:戴建新 张平武 陈蕊雯

责任编辑:李春德

第二军医大学出版社出版发行

(上海市翔殷路 800 号 邮政编码:200433)

全国各地新华书店经销

江苏省丹阳教育印刷厂印刷

开本:787×1092 1/16 印张:19.25 字数:475 800

2000 年 5 月第 1 版 2000 年 5 月第 1 次印刷

印数:1~3 000

ISBN 7-81060-078-8/R·017

定价:41.00 元

书 目 录

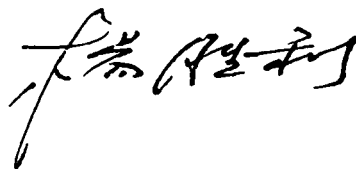
序

在预防疾病的各种手段中,免疫预防是一种比较方便、有效和经济的措施。1980年WHO正式宣布全球消灭天花,这是医学史上最重要的事件之一。其后,WHO又提出了在全球消灭麻疹、脊髓灰质炎的目标。从疫苗的应用方面看,不仅数量有所增加,而且预防接种的范围也正在逐渐扩展,其中控制大规模感染,如流感、乙肝等疫苗新制剂的问世,预防条件致病菌和耐药菌株感染制品的诞生,预防肿瘤和抗寄生虫感染疫苗的研究等,充分显示微生物学、免疫学和分子生物学的研究成果正在不断地付诸应用,造福人类。

在20世纪90年代初,一系列关于注射外源基因在体内诱导免疫应答的报道揭开了核酸疫苗研究的序幕。由于核酸疫苗可诱导机体产生全面的免疫应答,并且对不同亚型的病原体具有交叉防御作用,同时又具有安全、可靠、生产方便等优点,故被认为是继减毒、灭活疫苗和基因工程亚单位疫苗之后的第三代疫苗。在1994年的世界卫生组织会议上,与会专家一致认为核酸疫苗将成为疾病防治中的又一个重要手段,特别是它将在一种疫苗预防多种疾病方面发挥作用。从而,人类在疫苗研制和生产技术上出现了崭新的局面。

本书是我国第一部系统介绍核酸疫苗的著作。它内容充实,不仅反映了国内外研究发展的最新进展,而且论述了核酸疫苗相关的免疫学、分子生物学的理论基础和研制核酸疫苗的相关技术和法规。编者对核酸疫苗研究的相关理论有深刻的理解,而且有丰富的实际工作经验。相信它将为这个领域的教育、科研工作者提供有价值的参考。我十分愿意向读者推荐这本书。

中国工程院院士



前 言

在人类与疾病抗争的历史中,预防工作一直是极为重要的环节之一,疫苗则是人们预防疾病的一大法宝。回顾历史,疫苗经历了两次重大变革。第一次是以牛痘及脊髓灰质炎疫苗为代表的减毒、灭活疫苗,它为天花及小儿麻痹症等疾病的控制及根除作出了巨大贡献,但存在潜在的致病性。随着分子生物学技术的发展,以天然或重组成分为主的亚单位疫苗的研制成功是疫苗的第二次变革。这类疫苗以其成分单一、效果明确、无致病力等优点著称,但由于其复杂的工艺和昂贵的价格而限制了它的应用范围。自1993年美国Merck研究室的Liu等报道将含有流感病毒基因的质粒直接肌注于小鼠体内可诱发全面的免疫应答,并可抵抗流感病毒攻击。其后,许多国家的研究人员进行了大量工作,多方位、多角度证实了表达特定抗原蛋白的核酸作为疫苗的可能性及其免疫学机制。表明核酸疫苗与常规疫苗相比具有高效、持久、广谱、简便、廉价、无致病性等特点。在短短的几年间,就有7种核酸疫苗(HIV、HBV、单纯疱疹病毒、流感病毒、结核杆菌、疟原虫、T细胞淋巴瘤)经FDA批准进入临床试验,发展之迅速可见一斑,有人也因此将该技术誉为“疫苗的第三次革命”。可以预见,核酸疫苗将作为一种新型的疫苗而得到广泛的研究和应用。

为了适应疫苗研究日新月异的发展,让广大的科技人员和医务工作者全面了解核酸疫苗研究的基础理论及相关技术,我们参考了大量国外文献并结合自己的疫苗研究经验,编写了这部《核酸疫苗》。在编著过程中我们力求在严谨和科学的基础上,做到理论与实践相结合。希望从事分子生物学基础研究的工作者和有关科研人员能够从中获得一些启示,并研制出我国自己的核酸疫苗。

本书从介绍与疫苗相关的免疫学基础入手,逐步分析核酸疫苗的免疫机制,从而阐明其与常规疫苗的异同之处,使读者能够深刻理解核酸疫苗的优越性。随后,以核酸疫苗研究的思路及策略为主线,分步阐述疫苗基因的选择及克隆、疫苗效果评价以及增强机体免疫应答的策略等过程的相关理论、策略和具体的技术方法,使读者不但对核酸疫苗基础研究的总体思路有全面的了解,而且可参照其中颇具操作性的内容自己独立开展研究工作。疫苗的临床前研究是疫苗进入临床试验前的一个非常重要的阶段,我们在第七章参照美国FDA和中国药品审评办公室的相关规定,概述了该阶段的研究内容和要求,并在附录中引入了国家卫生部颁布的有关新生物制品研究和申报的相关法规,希望能对疫苗研究工作者的研究申报工作有所帮助。为了反映当今国际上核酸疫苗研究的最新进展并对科研工作者有一些具体的指导作用,我们从五个主要方面(病毒感染性疾病、细菌性疾病、寄生虫病、肿瘤、自身免疫性疾病)分别论述了核酸疫苗在这些方面的研究进

展,并分析了其潜在的应用前景。

感谢中国工程院杨胜利院士在百忙中抽暇审阅了书稿并为本书作序。

本校医学遗传教研室的胡振林、林懿、周凤娟、严宏利、寇志华、陈祖欢、魏林等同志在本书的校对工作中作出了重要贡献。此外,本校出版社的编辑在本书的形成与出版过程中给予了热情的指教、帮助与支持,在此一并表示衷心的感谢。

由于该领域的发展十分迅猛,所涉及的文献浩如烟海,限于篇幅,本书难以概括全面。此外,作为相对年轻的医学科学工作者,编者的学识和经验均有限,失误之处在所难免,热切希望广大读者和专家不吝指正,以便今后修订。

编 者

1999年10月

目 录

第一章 概论	1
第一节 研制核酸疫苗的理论依据.....	1
第二节 核酸疫苗应用研究的进展.....	2
一、核酸疫苗研制的技术路线	2
二、免疫接种途径	3
三、核酸疫苗载体中的非编码免疫刺激序列的免疫佐剂功能	4
四、临床或临床前研究的核酸疫苗	4
第三节 核酸疫苗研制中面临的机遇.....	6
一、核酸疫苗的优势	6
二、核酸疫苗的推广应用及亟待解决的问题	6
第二章 核酸疫苗的免疫学基础	8
第一节 机体的免疫系统.....	8
一、免疫器官	8
二、免疫细胞.....	11
三、抗原.....	15
四、抗体.....	17
五、补体系统.....	19
六、主要组织相容性复合体.....	19
七、细胞因子	22
第二节 人体的免疫应答反应	24
一、免疫应答的阶段.....	24
二、免疫应答中的 MHC 限制性	25
三、特异性体液免疫应答.....	26
四、特异性细胞免疫应答.....	31
第三节 病态免疫	33
一、变态反应.....	34
二、免疫耐受与自身免疫.....	35
三、免疫缺陷.....	39
四、肿瘤免疫.....	42
第四节 抗感染免疫及疫苗免疫防护	43
一、抗感染免疫机制.....	44
二、免疫记忆.....	45
三、核酸疫苗诱导的免疫反应.....	47
第三章 核酸疫苗的构建	53
第一节 核酸疫苗的候选基因	53

一、候选基因的筛选原则	53
二、已用于构建核酸疫苗的候选基因	55
第二节 用于构建核酸疫苗的相关载体	57
一、克隆载体	57
二、表达载体	63
第三节 获取候选基因的方法	67
一、构建 cDNA 表达文库筛选候选基因	67
二、用 PCR 法获得候选基因	70
三、人工合成候选基因	74
第四节 核酸疫苗构建的策略与方法	74
一、抗原基因和载体的制备	74
二、抗原基因和载体的连接	77
三、重组 DNA 分子导入宿主细胞	78
四、重组子的筛选和鉴定	80
第五节 核酸疫苗在体外哺乳动物细胞中的表达与检测	82
一、核酸疫苗导入哺乳动物细胞的主要方式	83
二、体外哺乳动物细胞中抗原表达的检测	85
第四章 核酸疫苗的免疫流程	89
第一节 核酸疫苗的制备	89
一、细菌的扩增	89
二、核酸疫苗的纯化	89
三、核酸疫苗的质量监控	93
第二节 核酸疫苗免疫接种的方法及途径	96
一、肌肉注射	97
二、基因枪介导的皮内或皮下导入	98
三、其他途径的导入方法	99
四、几种免疫接种途径的免疫保护效果评价	100
第三节 核酸疫苗的剂量及周期	101
一、免疫接种剂量的确定原则	101
二、免疫周期	102
第五章 免疫保护效应的评价	105
第一节 细胞免疫检测	105
一、T 细胞功能测定	105
二、NK 细胞活性测定	108
三、间接反映细胞免疫应答状况的细胞因子检测	110
四、抗体亚类的检测	118
第二节 体液免疫检测	118
一、免疫酶技术	118
二、免疫荧光技术	122

三、放射免疫分析法	126
四、免疫组织化学技术	126
五、免疫印迹法	134
六、B 细胞功能的检测	137
七、间接反映体液免疫应答状况的细胞因子检测	139
八、血清免疫球蛋白的测定	142
第三节 病毒血清学试验	142
一、空斑形成试验	142
二、中和试验	143
三、血凝和血凝抑制试验	145
第四节 保护率的测定	147
第六章 影响核酸疫苗诱发机体免疫应答的因素	149
第一节 载体设计对核酸疫苗免疫效果的影响	149
一、DNA 序列中 CpG 基元的免疫刺激作用	149
二、复制型 RNA 疫苗	154
三、启动子对抗原基因转录水平的影响	156
四、载体大小等因素对疫苗载体表达的影响	158
五、多抗原的表达	158
第二节 核酸疫苗导入的方法对免疫效果的影响	158
一、肌肉注射法引发的免疫应答	159
二、基因枪法(微粒介导的转染)引发的免疫应答	162
三、皮内注射法引发的免疫应答	163
四、“无针头”注射引发的免疫应答	164
五、不同接种方法对免疫应答影响的比较	164
第三节 佐剂及辅佐分子的作用	168
一、细胞因子的免疫佐剂效应	168
二、共刺激分子的佐剂效应	173
三、趋化因子的佐剂效应	174
四、脂质体介导的 DNA 免疫	175
第四节 多种疫苗形式的联合作用	176
第五节 其他影响因素	178
一、年龄和性别因素对肌注质粒 DNA 表达的影响	179
二、肌注的剂量、体积等因素对 DNA 表达的影响	179
三、预先注射蔗糖溶液对表达的影响	180
四、抗原提呈细胞的应用	181
第七章 中试研究及安全性评价	183
第一节 中试工艺流程的确定	183
一、中试研究的规模	183
二、工程菌的发酵条件	183

三、核酸疫苗纯化工艺	196
第二节 中试产品的质量控制	204
一、原材料的质量控制	204
二、培养过程的质量控制	205
三、纯化过程的质量控制	206
四、最终产品的质量的控制	206
第三节 核酸疫苗的安全性评价	207
一、免疫效能评估	207
二、局部反应和全身毒性研究	207
三、遗传毒性	207
四、生殖毒性研究	208
五、肿瘤发生研究	208
六、佐剂和疫苗接种设备的使用	208
第八章 核酸疫苗的应用	210
第一节 病毒感染性疾病的核酸疫苗	210
一、乙型肝炎核酸疫苗	210
二、艾滋病核酸疫苗	218
三、流感病毒核酸疫苗	231
第二节 核酸疫苗与非病毒微生物感染性疾病	235
一、结核病	235
二、肺炎支原体感染	237
三、肺炎球菌感染	238
四、幽门螺旋杆菌感染	239
五、破伤风杆菌感染	240
六、布鲁菌感染	241
七、沙眼衣原体感染	242
八、考德里立克次体感染	244
九、莱姆病	244
第三节 寄生虫病核酸疫苗	246
一、疟疾核酸疫苗	246
二、利什曼病核酸疫苗	253
三、日本血吸虫(亚洲种)的 DNA 疫苗	254
四、猪带绦虫病核酸疫苗	255
第四节 肿瘤核酸疫苗	256
一、肿瘤概述	257
二、肿瘤抗原	258
三、经典肿瘤疫苗	259
四、肿瘤核酸疫苗	261
第五节 核酸疫苗与自身免疫性疾病	268

一、自身免疫性疾病的发病机制	268
二、实验室自身免疫性脑脊髓炎	269
附录一 中国生物制品规程(一部,1995年版)	274
一、生物制品统一名称规程	274
二、生物制品生产、检定用菌种、毒种管理规程	275
三、生物制品国家标准品的制备和标定规程	277
四、生物制品分批规程	278
五、生物制品分装规程	278
六、生物制品包装规程	280
七、生物制品贮存、运输规程	281
八、实验动物和动物试验管理规程	281
附录二 人用重组 DNA 制品质量控制要点	285
附录三 新生物制品审批办法	289
一、总则	289
二、新生物制品的分类和命名	289
三、新生物制品的研究	289
四、新生物制品的人体观察	289
五、新生物制品的生产	290
六、附则	290
附录四 《新生物制品审批办法》的补充规定	292
附录五 新制品人体观察的技术要求	295

第一章 概 论

核酸疫苗技术作为一种新的免疫接种手段问世不久就在感染性疾病及肿瘤的防治中显示出巨大的潜力。所谓核酸疫苗,就是把外源基因克隆到真核质粒表达载体上,然后将重组的质粒 DNA 直接注射到动物体内,使外源基因在活体内表达,产生的抗原激活机体的免疫系统,引发免疫反应。在 1994 年 5 月的世界卫生组织会议上,与会专家充分肯定了核酸疫苗应用的潜在价值,并认为核酸疫苗的研究与未来实施的用一种疫苗预防多种传染病的计划是一致的。大量的实验结果表明,核酸疫苗不仅可用于人类疾病,而且还可广泛应用于人畜共患病和动植物疾病。它不仅具有预防疾病的作用,同时还具有治疗疾病的作用。因此,在不久的将来,核酸疫苗有望成为人类防治疾病的重要手段。

第一节 研制核酸疫苗的理论依据

自从英国医生 Jenner 用牛痘苗(1798 年)预防天花并获得成功以来,科学工作者又陆续研制了炭疽(Pasteur,1881 年)、卡介苗(1923 年)等 30 余种减毒、灭活疫苗。这些疫苗现被称为第一代疫苗。随着现代生物学技术特别是基因工程技术的不断完善,人们又研制了乙型肝炎亚单位疫苗等第二代疫苗并陆续用于各类传染病的预防。上述疫苗在人类疾病防治过程中发挥了很大作用,但是也存在着诸多不足。减毒、灭活疫苗的潜在致病性和亚单位疫苗免疫反应的不完全性迫使人们继续寻找更为理想的免疫接种剂。

1990 年 Wolff 等注意到给小鼠直接肌肉注射纯化的 DNA 或 RNA 重组表达载体,可使载体上的基因在局部肌细胞内表达,这种表达可持续数月,甚至持续终生,且没有检出注射的外源核酸与宿主染色体整合。1991 年 Williams 等发现输入的外源基因在体内的表达产物可诱导免疫应答。1992 年 Tang 等的实验进一步证实了 Williams 等的这一发现。1993 年 Ulmer 等证实小鼠肌肉注射含有编码甲型流感病毒核蛋白(NP)的重组质粒后,可有效地保护小鼠抗不同亚型、分离时间相隔 34 年的流感病毒的攻击。随后的大量动物实验都说明在合适的条件下,DNA 接种后既能产生细胞免疫又能引起体液免疫。于是,核酸疫苗技术应运而生,并逐渐地显示出它作为第 3 代疫苗的优越性。

核酸疫苗可以诱导产生体液和细胞介导的免疫反应。在多种疾病的动物模型上证实这些反应是具有保护性的。用含血凝素(HA)编码基因的质粒 DNA 肌肉注射 2 次、每次 1 μg ,就可以完全保护小鼠免受致死量同源病原体的进攻。给小鼠肌肉注射编码狂犬病毒糖蛋白的质粒 DNA 可以保护小鼠在注射 5 倍 LD_{50} 剂量的狂犬病毒时免于死亡。

抗体反应是发挥免疫保护作用的主要免疫反应之一。首先被证实的对于蛋白质的抗体反应是鼠和非人类灵长目动物针对流感病毒蛋白质的抗体反应。同样,含有编码 A 型流感病毒的血凝素基质蛋白与核蛋白,以及 HIV 的 gp120 和 gp160、牛疱疹病毒的 gIv、狂犬病毒表面糖蛋白、乙型肝炎病毒表面抗原、丙型肝炎病毒核心蛋白、丁型肝炎病毒表面抗原、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)的 NP、棉尾兔乳头病毒(CRPV)的主要外壳蛋白和单纯疱疹病毒

(HSV)的 gB 和 gD 的质粒 DNA 在肌肉注射后也可以诱导机体产生抗体。病毒中和抗体的反应可以抵抗流感病毒 HA、HIV、狂犬病毒、CRPV 和 HSV 的攻击。通过向非洲绿猴肌肉注射编码流感病毒 HA 的 DNA 可获得 4 个月或更长时间的持久性抗体反应。用黑猩猩作人乙肝核酸疫苗的实验结果显示,在给一只雌性黑猩猩注射 2 mg 乙肝核酸疫苗,而给另一只雄性黑猩猩注射 400 μ g 乙肝核酸疫苗后,前者可检测出效价显著(>100 IU/L)的抗 HBsAg 抗体,而后者可检测出效价很低(<60 IU/L)的抗 HBsAg 抗体。尽管 DNA 扩散效率的不同可能对免疫应答的水平带来一些影响,但注射量的差别却可在较大程度上影响诱生的抗体效价。此外,诱生抗体的效价不仅同一次注入的疫苗量有关,也与免疫接种的次数、途径、局部组织状况及个体情况有关。

细胞介导的免疫应答反应是核酸疫苗诱导机体抵抗病原攻击的又一主要机制。其中,CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的激活及对靶细胞的杀灭是疫苗发挥保护作用最主要的机制之一。CTL 识别与主要组织相容性复合体 I 类分子(即 MHC I 类分子)相连接的长度为 9~11 个氨基酸的抗原肽。这样,由 DNA 产生的蛋白抗原可以通过 MHC I 类分子进入抗原提呈途径。这是一种常被活的减毒病毒、重组病毒载体和细胞内细菌使用的抗原提呈系统。这种抗原提呈机制一般不被亚单位蛋白疫苗或灭活的病毒疫苗所使用。由于核酸疫苗在这方面的特点,它可被用来代替危险性大的活性病毒减毒疫苗。肌肉注射编码 LCMV 抗原的质粒 DNA 小鼠的脾或淋巴结细胞在体外用抗原、分裂素、IL-2 刺激或在体内用 LCMV 感染时,可以很容易地检测到细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的存在。针对 H-2 限制的多肽抗原决定簇(俗称表位)的特异性效应 CTL 已经通过用编码流感 A 病毒 NP、乙肝病毒表面抗原和 HIV 包膜蛋白(env)的 DNA 免疫小鼠或用编码 HIV(env)的 DNA 免疫灵长目动物的实验而得到证实。Ulmer 等用流感病毒,Wang 等用 HIVgp 160 重组体疫苗,Xiang 等用牛痘病毒、腺病毒和狂犬病毒的糖蛋白重组体以及 Yokoyama 等用 LCMV 都证实了 CTL 能够识别和杀死被病毒感染的靶细胞。研究小鼠流感病毒的 NP 时发现肌肉注射 1 μ g 的 NP 的 DNA 就可以诱导产生抵抗流感病毒的 CTL。在其他的研究中发现,在用流感病毒 NP 的 DNA 免疫后,抗 NP 的 CTL 可以持续存在 2 年多。肌肉注射一次表达 HBsAg 的 DNA 可以更迅速诱生比注射重组 HBsAg 更强、更持久的体液和细胞免疫反应。

第二节 核酸疫苗应用研究的进展

一、核酸疫苗研制的技术路线

若要了解核酸疫苗的研究进展,可在英特网上浏览专门网页,其网址为<http://wurw.genweb.com/dnavax/dnavax.html>。Whalen 博士提出的自我帮助程序已被多数学者所接受,现介绍如下:

(1)目的基因的选择:须确认目的基因序列中是否含有多余的内含子,该内含子在哺乳动物细胞内是否影响外显子在转录成 mRNA 时的连接,如果候选基因片段是 PCR 产物,须经测序得到确认。

(2)选择合适的真核质粒表达载体:载体需含有真核启动子(CMV、R1V、SV40 等),质粒 DNA 不能整合到宿主细胞染色体并能持续稳定地表达目的基因,CpG 基元(motif)序列可增强免疫。现一般选择含 CMV 启动子的 pcDNA3 作为表达载体。

(3)将目的基因与表达载体相连,构成重组子。提取重组子后用离子交换层析法纯化。

(4)转染哺乳动物细胞检测相应蛋白质的表达。

(5)可选择含有报告基因的表达载体作对照,分析转入的 DNA 是否表达,报告基因可为 β -半乳糖苷酶基因或绿色荧光蛋白基因。

(6)疫苗接种方式和剂量。针对小鼠,可采用直接肌肉注射($100\ \mu\text{g}/\text{次}$)、脂质体包被或将 DNA 包被金颗粒后用基因枪射入表皮($0.5\ \mu\text{g}/\text{次}$)等。

(7)疫苗接种部位。疫苗可经肌肉、皮下或粘膜(如鼻腔滴入)等途径接种。不同接种途径免疫效果不同,主要是与不同宿主细胞的 DNA 摄入和表达高低及转染细胞将抗原提呈给免疫系统的能力有关。导入再生肌肉组织或利用高渗蔗糖溶液可增加细胞对质粒的摄入。

(8)动物模型的选择及免疫周期和免疫次数。可选择小鼠(BALB/c、C57BL/6、H-2K、H-2b品系)、树鼩、鸡、兔、羊、猪、猴和猩猩等病原体易感动物作为模型,免疫周期为4~6周,免疫次数以1~3次为佳。

(9)免疫佐剂。细胞因子(IFN- γ 、IL-2、IL-2 和 GM-CSF 等)、脂质体和粘附分子(ICAM)等都可作为核酸疫苗的佐剂。

(10)免疫保护效果的检测。可检测体液免疫和细胞免疫功能。

(11)可采用 PCR 技术检测转入的 DNA 在局部组织的存在情况;用免疫组织化学法检测抗原蛋白的局部表达。

(12)对以上步骤取得的结果进行评价和分析。

二、免疫接种途径

目前很多实验室都在对用传统的针头皮内注射质粒 DNA 的方法进行研究。用皮内注射方法得到的结果在抗原表达和被试动物的种属间有很大差别。以流感病毒的 NP 为例,尽管皮内注射能诱发抗体反应和 CTL 反应,但在对比肌肉或皮内两种接种途径的保护效果的实验中显示,皮内注射总体的保护效果欠佳。在研究使用编码3种不同疟原虫抗原基因(CSP、SSP2、HEP17)的质粒 DNA,用皮内和肌肉两种方法给药均能保护小鼠;相对地,皮内途径使小鼠体内针对 SSP2 的抗体反应最强,而肌肉途径可使针对 CSP 和 HEP17 的抗体反应较强。由此可见,不同抗原基因的免疫保护效果可随接种途径的不同而产生差异。

Tang 等在小鼠上应用了一种本来用于转染植物细胞研究的技术,名曰“biolistic 免疫”。在该方法中,DNA 被裹上蚀态金颗粒,然后以水蒸气或压缩气体膨胀为动力,将准备好的 DNA 射入目的细胞。Webster 等用了流感毒株——A/PR/8/34 在雪貂上做了 biolistic 免疫的研究。在这个实验中,病毒排放孢子的量被用作衡量免疫力的程度。结果显示,用 HA 的 DNA 以 biolistic 法免疫雪貂,遂用病毒攻击,在感染的 3.5 d 后可发现病毒排放孢子被抑制;然而,一些病毒的复制还是可以进行的,因为在受到激发后,所有动物血清中抗体的效价明显上升。biolistic 免疫也可以诱发细胞介导的免疫反应。Hui 等在将组织经外科手术暴露后用肌肉或脾内的方法免疫小鼠 MHC 抗原 H-2k^b 基因可产生特异性 CTL。比较 biolistic 免疫和皮内注射这两种方法在流感 NP 诱生 CTL 的研究表明,用传统针头皮内注射 $1\ \mu\text{g}$ DNA 不能诱生 CTL,而用基因枪注射 $16\ \text{ng}$ 的 DNA 即可诱生 CTL。

在小鼠体内用肌肉注射和基因枪注射法分别注射编码人谷丙转氨酶的 DNA,结果显示,通过基因枪注射 $16\ \text{ng}$ 的 DNA 比肌肉注射 $1\ \mu\text{g}$ 的 DNA 诱导产生的抗体效价高。许多研究人员也试图用无针头的注射器来进行 DNA 免疫。这些装置使疫苗在压缩气体驱动活塞造成

的高压下成为一股极细的液体流。这股液体流可以穿透组织且已在临床上用于注射传统疫苗和药物(如胰岛素),但这一技术易使 DNA 因受显著的剪切力而发生构象及结构上的变化,在使质粒渗透到深层肌肉中的技术上也存在一定问题。另外,对除注射以外的免疫接种途径也有必要进一步研究。

三、核酸疫苗载体中的非编码免疫刺激序列的免疫佐剂功能

免疫刺激序列(immunostimulatory sequences,ISS)由胞嘧啶核苷酸和鸟嘌呤核苷酸(CpG)为基元组成。在核酸疫苗的质粒载体 DNA 骨架中,氨苄抗性基因的两个 5' AACGTT3' 序列就是具有较强活性的 ISS。此结构在细菌 DNA 中的比例较高,而在脊椎动物 DNA 中比例较低,并且,脊椎动物中 80% 以上的 CpG 均被甲基化。脊椎动物 DNA 和细菌 DNA 的这种显著差别可能是使 CpG 序列成为免疫刺激信号的基础。ISS 可作用于多种免疫活性细胞。1995 年,Krieg 和 Yi 等发现,经 CpG 刺激后 95% 的 B 细胞进入细胞增殖期,并分泌 IgM 和 IL-6。在体外将 ISS 作用于人单核/巨噬细胞可显著增加细胞中 IFN- α 、IFN- β 、IL-12 以及 IL-18 的 mRNA 表达。这些细胞因子的分泌可促进 NK 细胞活化和 IFN- γ 的合成,并使 Th 前体细胞向 Th1 细胞分化。

四、临床或临床前研究的核酸疫苗

(一)核酸疫苗用于病毒性疾病

1. 流感病毒(influenza virus) 核酸疫苗最早用于流感病毒的研究。1993 年 Robinson 等将编码流感病毒血凝素(HA)的质粒 DNA 肌注小鼠和鸡,动物体内产生了特异性的抗 HA 抗体,并使动物能抵御致死量流感病毒的攻击。甲型流感病毒常发生变异,使原有的疫苗对新毒株不起作用。Ulmer 等选择甲型流感病毒中保守的核蛋白(NP)基因制备核酸疫苗,给小鼠肌注疫苗,诱导出抗 NP 的特异性抗体和 CTL 反应,同时,免疫鼠能抵抗异型病毒的攻击。

2. 乙肝病毒(hepatitis B virus) 乙肝是世界上流行最广的疾病之一。1993 年,Davis 将含乙肝表面抗原(HBsAg)基因的质粒给小鼠注射,小鼠产生了 HBsAg 抗体。1994 年 Davis 将 HBsAg 的三个邻近区域(pre-S1,preS2,S)的基因给小鼠单个注射和联合注射,诱导了全面的体液和细胞免疫应答。有关增强乙肝核酸疫苗效果和保护性免疫应答的研究尚在进行中。

3. 人类免疫缺陷病毒(HIV) 艾滋病的治疗是人类尚未攻克的难题,因而其预防极为重要。1993 年 Wang 等给小鼠和非人类灵长目动物肌注 HIV 包膜蛋白(env)的核酸疫苗,动物体内产生了特异性抗体和 CTL 应答。产生的中和抗体能在细胞外抑制 HIV 介导的合胞体的形成及 CD4 与 gp120 的结合。表明 env 基因可在宿主肌细胞内表达和加工,表达产物 gp160 被切割成 gp120 和 gp41 后,可折叠成天然构象,从而诱导全面的免疫应答。Boyer 等将 gp160 和 rev 蛋白基因、gag 和 pol 蛋白基因注射猩猩,其体内产生了体液和细胞免疫应答。用 HIV 攻击后 1 年,猩猩血中病毒仍为阴性。核酸疫苗为攻克艾滋病带来了希望。

4. 狂犬病毒(rabies virus) 狂犬病毒侵犯所有哺乳动物,给人类健康带来极大的威胁。目前最有效的疫苗是人二倍体细胞疫苗。1994 年 Xiang 等将编码糖蛋白的质粒接种小鼠,小鼠产生了全面的免疫应答并获得了保护作用。Lo Dmell 等在非人类灵长目动物中将核酸疫苗和人二倍体细胞疫苗作了比较,发现二者的免疫效果相似,这就为狂犬病的防治开辟了一条新途径。

在其他病毒感染的核酸疫苗研究中,如牛疱疹病毒(BHV)gD、gB 糖蛋白、丙肝病毒(HCV)核蛋白、新城疫病毒(NDV)F 蛋白、轮状病毒(Rota virus)VP4,VP6,VP7 蛋白、淋巴细

胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)核蛋白、人类巨细胞病毒(HCMV)膜蛋白、牛腹泻病毒糖蛋白 gp53、兔乳头状瘤 L1 蛋白、圣路易型脑炎病毒 E 蛋白核酸疫苗的研究中,这些核酸疫苗均能诱导全面的免疫应答,大部分免疫动物模型获得了保护。

(二)核酸疫苗用于细菌性疾病

1. 结核杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 全世界每年约有 300 万人死于结核,BCG 是最常用的疫苗。Huyen 和 Bonat 分别将 Ag85、hsp65 蛋白的核酸疫苗免疫小鼠后,使其产生了全面的免疫应答,并能抵抗结核杆菌的攻击。Tascon 等证实 hsp65 核酸疫苗与 BCG 获得的保护作用相似。另外,关于 hsp70、ESAT 等蛋白的核酸疫苗的实验研究也有相继报道。

2. 破伤风杆菌 (*Clostridium tetani*) 破伤风杆菌感染率较高,每年全世界大约有 40 万人死于本病。破伤风一旦发病,治疗效果不佳,因而预防极为重要。破伤风毒素 C 蛋白(tet C)是破伤风毒素 C 末端的非毒性区域,也是一个很好的候选抗原。Anderson 等将 C 蛋白核酸疫苗免疫小鼠,小鼠产生了抗 C 片段的免疫球蛋白和细胞免疫应答。免疫小鼠能抵抗致死量破伤风毒素的攻击。

3. 肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 肺炎球菌肺炎,占细菌性肺炎的 90%~95%。肺炎球菌 PSPA 蛋白是细菌表面的一种蛋白质,在小鼠实验中已经证明可产生良好的免疫力。MoDaniel 等将含 PSPA 基因的质粒免疫小鼠,ELISA 检测证实血清中产生较高的抗体水平。在攻击实验中,发现免疫小鼠血中肺炎球菌数目明显低于对照组,说明核酸疫苗产生了保护作用。此外,幽门螺旋杆菌、空泡毒素、布鲁菌 C7/12 蛋白、伤寒杆菌外膜蛋白等核酸疫苗的研究表明,这些疫苗均产生了一定的保护作用。

(三)核酸疫苗用于寄生虫感染性疾病

1. 疟原虫 (*Plasmodium yoelii*) 全世界每年约有 20 亿~50 亿的人感染疟原虫,每年有 100 万~200 万人死于疟疾。传统的经放射处理的子孢子疫苗远不能满足如此庞大的感染群。Hoffman 等将疟原虫环子孢子核酸疫苗免疫小鼠,小鼠体内产生了抗环子孢子特异性抗体和 CTL 应答,并使小鼠获得了保护作用,他们证实了这种保护作用依赖于 CD8⁺T 细胞。Dodan 等阐明环子孢子核酸疫苗产生的保护作用依赖于 CD8⁺T 细胞、IFN- γ 及含氮化合物等。他们还证实了核酸疫苗在不同品系的小鼠中产生的保护作用不同,这表明核酸疫苗的效果受多种因素的影响。

2. 利什曼原虫 (*Leishmania*) 利什曼原虫 gp63 蛋白是一种保守性较高的糖蛋白。Xu 等将 gp63 蛋白的核酸疫苗接种 BALB/c 小鼠,使小鼠获得了保护作用。免疫小鼠脾细胞经体外诱导,可产生高水平的 IL-2 和 IFN- γ ,说明细胞免疫与保护性免疫极为相关。

3. 日本血吸虫和猪带绦虫 血吸虫和绦虫均属扁形门寄生虫,两者有很高的同源性。副肌球蛋白是无脊椎动物中比较保守的蛋白,它参与补体的调节反应。Yang 等将日本血吸虫副肌球蛋白核酸疫苗肌注小鼠,小鼠产生了部分亚型的抗体(IgG1, IgG2a, IgG2b),攻击实验中小鼠没有获得保护作用,这可能是没有产生 IgE 和 IgA 等保护性抗体的缘故。猪囊虫病在我国流行甚广,孙树汉等将 cCl 蛋白和副肌球蛋白质粒接种小猪,在小猪体内诱发了体液免疫和细胞免疫,cCl 疫苗使小猪获得了保护作用,副肌球蛋白核酸疫苗保护作用的研究尚在进行之中。此外,伯氏螺旋体、弓形体、肺炎支原体等核酸疫苗的研究结果也有相继报道。

(四)核酸疫苗在肿瘤中的实验研究

Conny 等将含人癌胚抗原(CEA)的质粒免疫小鼠,获得了针对 CEA 的特异性细胞和体液

免疫应答,并保护小鼠抵抗表达 CEA 同系肿瘤细胞的攻击。编码多形上皮粘蛋白(PEM)的 MVC-I 基因与乳腺癌、胰腺癌、结肠癌相关。Teyllor 等将 MVC-I 核酸疫苗免疫小鼠,使小鼠获得了保护作用。这些研究成果均显示核酸疫苗在肿瘤防治中具有潜在的应用前景。

(五)其他

核酸疫苗还在自身免疫性疾病如实验性自身免疫性脑脊髓炎和 I 型变态反应的防治中得到应用。

第三节 核酸疫苗研制中面临的机遇

对疫苗技术而言,可从以下两个方面评估其成功与否:一是使临床上显见疾病得到预防的数目;二是看这项技术在人群中应用的水平。一个成功的疫苗技术必须满足以下几个要求:①这项技术能激发恰当的免疫反应来降低个体的发病率和死亡率。因为既然不是所有人都能接种疫苗,且不是所有接种的人都被保护,所以这就要求有一种疫苗技术,它能使接种产生的保护性自始至终地防止病原体再次进入人体,达到从整体上保护人群的目的;②这项技术必须非常安全,这样在大规模接种健康个体时可以避免不必要的麻烦;③这项技术还要有一定的伸缩性,这样才可以区别病原体上的各种抗原,防止各种新的、变异的抗原的入侵;④这项技术必须适用于抵抗许多种靶病原体。从这四个角度来分析以前使用的疫苗技术可以看出,不论是减毒疫苗、灭活疫苗、亚单位疫苗等均有这样或那样的不足,因此,一种新疫苗的出现并在相应领域中充分发挥作用已成必然。

一、核酸疫苗的优势

核酸疫苗与第一、二代疫苗相比具有如下优势:

(1)诱导机体产生全面的免疫应答,其保护性免疫应答对不同亚型的病原体具有交叉抵御作用;

(2)无减毒、灭活疫苗可能引起的致病作用,具有可靠的安全性;

(3)能表达经修饰的天然抗原,具有与天然抗原相同的构象和抗原性;

(4)与亚单位疫苗共有的高产性;

(5)可将编码不同抗原的基因构建在同一个质粒中,或将不同抗原基因的多种重组质粒联合应用,制备多价核酸疫苗;

(6)核酸疫苗既有预防作用,也有治疗作用;

(7)生产简便,成本低廉,稳定性好,贮运方便。

二、核酸疫苗的推广应用及亟待解决的问题

核酸疫苗的上述优势将给免疫接种带来一次伟大的变革。从理论上讲,迄今所有用于主动免疫的第一、二代疫苗和用于被动免疫的球蛋白都可完善成效果更加理想的核酸疫苗,尚无疫苗,也无其他良好预防措施的其他诸多感染性疾病乃至肿瘤或遗传性疾病,均可通过筛选到良好的保护性抗原之后完善成有效的核酸疫苗用于这些疾病的防治。

核酸疫苗的免疫机制已被多数学者所接受,其应用潜力也得到了世界各国的重视。美国 FDA 已批准流感、结核、疟疾、乙肝等数种核酸疫苗做临床应用实验,其中结核核酸疫苗和疟疾核酸疫苗获准生产。我国也有 10 余种核酸疫苗进入了临床前研究,在最近一二年内将会有一批核酸疫苗获准做临床应用实验。这预示着核酸疫苗将成为今后人类与疾病特别是感染性