

戊型肝炎疫苗研究最新进展

王晓娟 王玲 庄辉

【关键词】 戊型肝炎; 戊型肝炎病毒; 疫苗

Progress of hepatitis E vaccine WANG Xiao-juan, WANG Ling, ZHUANG Hui. Department of Microbiology, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China

Corresponding author: WANG Ling, Email: lingwang@bjmu.edu.cn; ZHUANG Hui, Email: zhuangbmu@126.com

【Key words】 Hepatitis E; Hepatitis E virus; Vaccine

戊型肝炎是由戊型肝炎病毒(HEV)引起的急性自限性疾病,一般不发展成慢性,但最新研究表明,在器官移植等免疫抑制人群中存在持续性HEV感染^[1]。HEV主要经粪口途径传播,也可经输血和母婴传播^[2]。HEV只有一个血清型,但其基因型主要有1~4型,基因1型和2型只感染人,而3型和4型既可感染人,也可感染多种动物。基因1型主要侵犯青壮年,儿童和老年人群多为亚临床感染,孕妇感染后病死率高达20%^[3],该型主要流行于卫生条件较差的中亚、东南亚、中东、北非及西非等地区的发展中国家,常引起大规模水源性流行;基因2型主要分布于墨西哥;基因3型主要引起散发病例,该型病毒主要存在猪和其他动物中,近年来已成为发达国家急性散发性病毒性肝炎的主要原因;基因4型主要流行于亚洲,猪为主要动物宿主,常引起小规模食源性暴发,该型主要感染老年及免疫力低下人群^[4]。目前在自然界中已发现了基因3型和4型HEV多种动物宿主。通过对人和动物HEV的核酸序列比较分析及跨种系传播的动物实验^[5,6],进一步证实HEV可在人和动物之间传播。基因3型和4型HEV引起的戊型肝炎已被认为是一种人兽共患病^[7]。全世界范围内约有1/3的人感染过HEV^[8],我国戊型肝炎的发病率也呈逐年上升趋势。因此,研制安全有效的HEV疫苗对于预防戊型肝炎具有重要意义。由于缺乏有效的细胞培养模型,难以进行HEV灭活或减毒疫苗的研制,因此,基因工程疫苗是HEV疫苗研制重要途径之一。已有很多学者在不同细胞体系(如原核细胞、昆虫细胞、酵母细胞、动物和植物等细胞)中表达HEV ORF2衣壳蛋白或其部分氨基酸片段,其表达产物均有良好的免疫原性,但由于各种原因大部分均未进入临床试验。迄今全世界范围内只有两种候选疫苗完成了I~III期临床试验。现将疫苗研制最新进展综述如下。

一、原核细胞表达疫苗——HEV239

我国“国家传染病诊断试剂与疫苗研制中心”最新研制的HEV239疫苗(基因1型,368~606 aa)是在E2(394~

606 aa)基础上^[9,10],克服了E2在纯度提高95%以上时,免疫原性显著下降的缺点,将E2氨基酸位点向N末端延长至368 aa位点,在大肠埃希菌(*Escherichia coli*) ER2566中表达,所表达的蛋白通过G3000SW_{XL}分子筛层析柱(7.8 mm×30 cm),在HPLC中发现其滤过分子筛的时间显著缩短,形成了相对分子质量(*Mr*)>500 000的蛋白颗粒分子^[11],并对其抗原性、免疫原性及对动物和人的免疫保护效果进行了系列研究。

1. HEV239的抗原性、免疫原性及对恒河猴的保护效果: HEV239是迄今为止第一株原核表达的颗粒型HEV蛋白,纯度>95%^[12]。该抗原肽在SDS-PAGE中是以二聚体形式迁移的,100℃ 2 min后裂解成单体结构,能够被人抗-HEV血清所识别,且二聚体与戊型肝炎患者血清的反应性强于单体。HEV239重组蛋白与E2(394~606 aa)具有相同的HEV中和表位和共同的C末端。仅N末端比E2多26个氨基酸,此延伸的26个氨基酸不影响疫苗的抗原性,并可使该蛋白聚集成直径为15~30 nm的病毒样颗粒。经动态光散射仪测量其平均水化半径为13 nm左右,可增强多肽与多肽之间的反应。用铝佐剂吸附的HEV239和E2分别免疫Balb/c小鼠,表明HEV239较E2的免疫原性显著提高^[12]。此外,HEV239颗粒能诱导大鼠体内产生T细胞依赖的抗体反应(T细胞表位位于533~552 aa)^[13]。Emerson等^[14,15]研究发现HepG2、HuH7等细胞能吸附天然HEV,且HEV对HepG2细胞有一定感染能力;何水珍等^[16]在此研究基础上用基因重组蛋白HEV239疫苗模拟HEV吸附HepG2细胞模型,并用多株HEV单克隆抗体进行阻断,发现多株单抗可阻断HEV239对HepG2细胞的吸附,提示HEV239具有与HEV颗粒相似的部分表面抗原空间结构。

该研究组分别用5、10、20 μg剂量各两针(0,4 w)免疫24只恒河猴,10 μg组免疫12只恒河猴,5、20 μg组分别免疫6只恒河猴。21只猴均在初免后第2周即产生抗-HEV抗体,而5 μg小剂量组有3只恒河猴在初免后第4周出现抗体。于免疫后第7周各组都达到较高的抗体水平(3组总平均抗体水平达1384 IU/ml)。随后,该研究组用HEV基因1型分离株10⁶基因组当量(genome equivalent, GE)攻击恒河猴,3种免疫剂量的HEV239备选疫苗对9只恒河猴的保护率均为

100%。当增加病毒量用 10^7 GE攻击恒河猴,保护率为78% (7/9), 5 μ g组和10 μ g组各有一只恒河猴出现粪便排毒,持续排毒时间分别为3 w和1 w,但均未出现丙氨酸氨基转移酶(ALT)异常。对照组3只恒河猴粪便排毒均持续时间达1个月以上,并有1只恒河猴出现ALT升高,说明HEV239备选疫苗,对恒河猴具有较好的保护力。分别用基因4型HEV 10^7 GE和 10^8 GE各攻击3只恒河猴(均为10 μ g疫苗免疫组),未发现粪便排毒和ALT升高,提示HEV239备选疫苗可阻断基因1型和基因4型HEV的感染。

2. I期/II期临床试验:2004年12月该疫苗经中国食品药品监督管理局批准,进入I期/II期临床实验。I期试验是将疫苗注入人体内,观察其安全性。II期继续扩大样本观察安全性和有效性。该研究从2005年1月起至2006年7月,试验现场在广西壮族自治区的HEV流行地区^[17]。

457名志愿者(17~55岁)随机分为两组,分别于0、6个月和0.1、6个月给予20 μ g 氢氧化铝佐剂的HEV239疫苗,对照组分别于0、1、6个月给予5 μ g HBV商品化疫苗。试验结果发现,三针20 μ g可使100%的受试者HEV血清抗体阳转,抗体几何平均浓度(GMC)为15.9 IU/ml(95%CI: 13.8~18.2 IU/ml);而两针20 μ g可产生98%血清学转换,GMC为15.9 IU/ml(95%CI: 13.8~18.2 IU/ml),两组差异具有统计学意义($P<0.05$),说明三针免疫效果优于两针。此外,155名中学生(16~19岁)随机分为4组,于0、1、6个月分别给予10、20、30、40 μ g剂量的HEV239疫苗,以观察免疫剂量的递增效应。结果显示4种免疫剂量均可使100%的受试者产生HEV血清抗体阳转,且随着免疫剂量10~40 μ g的递增,GMC也增加。该试验过程中,疫苗组人群均未发现与疫苗相关的严重不良反应。表明该疫苗具有很好的安全性,并可产生较高滴度的抗HEV抗体。

3. III期临床试验:HEV239疫苗于2007年8月至2009年7月开始进入III期临床试验^[18]。试验现场为既有基因1型也有基因4型流行的江苏省,试验对象为16~65岁人群,共计112 604人(女性占56%)。受试人员全部参加了至少一针免疫剂量的临床试验,其中97 356人参加了三针30 μ g/剂氢氧化铝佐剂的HEV239疫苗全程免疫。疫苗组和安慰剂组人数比为1:1。在0.1个月两针免疫后,所有疫苗组受试者体内均快速产生保护性抗体,服用安慰剂的对照组有5例发生戊型肝炎,该疫苗对接受两针疫苗注射的受试者1个月内的保护率为100%(95%CI: 9.1%~100.0%),而对接受一针疫苗注射的受试者19个月内的保护率为95.5%(95%CI: 66.3%~99.4%)。注射该疫苗一年后,使用安慰剂的受试者中,有15人发生戊型肝炎,其中13例扩增出HEV RNA,经核酸序列分析,12例为基因4型HEV感染,1例为基因1型感染,而疫苗组无一例感染。该疫苗对接受三针疫苗注射的受试者12个月内的保护率为100%(95%CI: 72.1%~100.0%)。由于江苏省人群中HEV的流行优势株为基因4型,说明该疫苗对基因4型也具有很好的保护作用。在全部受试者中未发现该疫苗有严重的不良反应。通过三期临床试验表明,HEV239疫苗在抗原性、免疫原性及安全性方面均达到了较

满意的效果。

由于该项研究的接种对象不包括慢性肝脏疾病的受试者,该疫苗是否能够预防慢性肝病患者的HEV感染尚不清楚;该疫苗的长期保护效果、加强免疫的时间及对孕妇、<15岁及>65岁人群的安全性和预防效果也有待进一步研究。

二、真核细胞表达疫苗——rHEV重组疫苗

迄今报道的免疫效果较好的另一个备选疫苗是真核表达疫苗,是由美国国立卫生研究院(NIH)研究组构建的首蓓银纹夜蛾核型多角体基因重组病毒(AcNPV),在SF9昆虫细胞中表达HEV基因1型SAR55株(ORF2区112~607 aa),Mr为56 000的铝佐剂重组衣壳蛋白疫苗。Purcell等^[19]用两针1 μ g/剂(每针间隔4 w)、一针10 μ g/剂、两针10 μ g/剂(每针间隔4 w),分别免疫36只恒河猴(每组12只),对照组8只恒河猴给予HAV疫苗。10 μ g一针免疫后第2周出现96%抗-HEV抗体阳转,而小剂量1 μ g一针免疫后仅出现58%的血清学阳转($P<0.05$)。各剂量组恒河猴至接种后第3周均发生了血清抗-HEV阳转;1 μ g和10 μ g两针免疫剂量组在免疫后第4周,抗-HEV抗体水平分别可高达483 IU/ml和485 IU/ml,且两针免疫产生的抗-HEV抗体水平显著高于一针免疫(61 IU/ml)。该研究于免疫第8周分别用HEV基因1型(Sar-55)、基因2型(Mex-14)、基因3型(US-2)分离株 10^6 猴半数感染剂量(MID₅₀)攻击35只恒河猴(每组3~4只),用两针1 μ g或10 μ g各免疫猴子后经不同基因型病毒攻击,未见明显肝脏组织病理改变,肝功生化学检测ALT水平正常,但1 μ g组有2只,10 μ g组有4只出现病毒血症,而一针10 μ g免疫组83.3%(10/12)猴子未出现肝组织病理学改变,但58.3%(7/12)的猴子出现毒血症。说明一针不如两针免疫效果好,两针1 μ g组的免疫效果最好。此外,该研究组发现,在第一针免疫后,间隔6个月或12个月加强一针免疫,可增强该疫苗的免疫效果^[20]。

该疫苗于1998年由美国食品药品监督管理局批准进行临床试验。I期临床试验分别在美国和尼泊尔进行。该研究组分别用1、5、20、40 μ g于0、1、6个月3次免疫88名美籍志愿者(18~50岁,22人/组)后,未见任何严重不良反应^[21]。至第7个月时,5、20和40 μ g组有88%受试者发生抗-HEV抗体阳转。其中5 μ g组和20 μ g组受试者血清抗-HEV阳转率最高,分别为89.5%(17/19)和95.0%(19/20)。除40 μ g组外,1、5和20 μ g组抗-HEV抗体滴度水平(GMT)随免疫剂量的增加而增加,分别为50、188和309 U/ml。而40 μ g组产生的抗-HEV抗体滴度水平(247 U/ml)稍低于20 μ g组,且40 μ g组有一例受试者在第一针免疫后7 d出现带状疱疹,另一例在第二针免疫后21 d出现口腔疱疹。随后,该研究组在戊型肝炎地方性流行区尼泊尔人群中进行了I期临床试验。用5 μ g/剂、20 μ g/剂(0.1、6个月)分别3次免疫两组(每组22名)志愿者,均未发现任何严重不良反应。于免疫后第2个月,43名(43/44)志愿者出现了血清抗-HEV阳转;至免疫后第7个月,所有志愿者体内都检测到HEV抗体。表明该HEV重组疫苗具有较好的安全性和免疫原性^[22]。

该疫苗于2001年7月至2004年1月在尼泊尔的加德满

都进行Ⅱ~Ⅲ期临床试验^[21]。该地区为HEV基因1型流行区。试验对象为2000名HEV抗体阴性健康军人,平均年龄(25.2±6.25)岁,99.6%为男性,采用随机双盲对照试验,试验组和对照组人数之比为1:1。分别于0、1.6个月接种20 μg疫苗,对照组注射安慰剂为HBV疫苗。接种后观察显示:在接种第2针和第3针期间,疫苗组960人中有1人被诊断为戊型肝炎,对照组961人中有8人被诊断为戊型肝炎,该疫苗保护率为85.7%(95%CI:-16.0%~98.2%);接种三针后,疫苗组898人中有3人被诊断为戊型肝炎,对照组896人中有66人被诊断为戊型肝炎,该疫苗保护率为95.5%(95%CI:85.6%~98.6%)。在安全性方面,该疫苗无任何严重不良反应。表明该真核表达重组疫苗rHEV对预防该地区人群HEV感染效果较好。三针免疫后随访2年,发现43.7%受试者抗体滴度下降到失去保护性的滴度水平(2.5 IU/ml)。提示该重组疫苗的长期免疫效果有待进一步研究。

三、HEV239与rHEV两种备选疫苗的比较

HEV239(368~606 aa)与rHEV(112~607 aa)具有相同的C末端,前者N末端比rHEV少256个氨基酸,两种疫苗均包括了HEV免疫构象型表位区域(459~606 aa)^[24],而大部分构象型表位都在HEV表面,能中和HEV并阻断病毒与宿主细胞受体的结合。虽真核表达体系的rHEV蛋白具有翻译后加工修饰功能,与原核体系表达的蛋白HEV239相比更接近于天然蛋白,免疫原性应更优于原核细胞表达蛋白,但大规模临床试验表明,HEV239比rHEV具有更好的免疫原性,可能与HEV239重组二聚体的构象型表位暴露更充分有关。rHEV疫苗的N末端氨基酸长度较长,肽链折叠较紧密,导致C末端抗原表位被遮盖,从而影响了其免疫活性。此外,原核表达体系的安全性较杆状病毒在昆虫细胞中的表达体系更为可靠,且原核表达体系生产成本低廉,更易于在发展中国家使用。

综上所述,我国用原核细胞表达的HEV基因重组疫苗(HEV239),无论在安全性还是在免疫原性方面,均较美国NIH研究组用昆虫细胞表达的rHEV候选疫苗效果好。尽管在某些方面尚需进一步研究,但相对于其他候选疫苗来说,已迈出成功的一大步。HEV239疫苗目前正在进入国家食品药品监督管理局审批程序,可望不久将投入商品化生产,用于戊型肝炎的预防。该疫苗的应用,将有效预防高危职业人群、孕妇、老年及各种原因所致的免疫力低下人群,以及到戊型肝炎疫区旅游者的HEV感染,对于降低戊型肝炎发病率具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Meng XJ. Recent advances in hepatitis E virus. *J Vir Hep*, 2010, 17(3):153-161.
- [2] Mushahwar IK. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol*, 2008, 80(4):646-658.
- [3] Skidmore S. Overview of hepatitis E virus. *Curr Infect Dis Rep*, 2002, 4(2):118-123.
- [4] Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol*, 2008, 48(3):494-503.
- [5] Li LJ, Zhu YH, Fu HW, et al. Full-genome nucleotide sequence and analysis of a Chinese swine hepatitis E virus isolate of genotype 4 identified in Guangxi Zhuang Autonomous Region: evidence of zoonotic risk from swine to human in South China. *Liver Int*, 2009, 29(8):1230-1240.
- [6] Ji YL, Zhu YH, Liang JR, et al. Swine hepatitis E virus in rural southern China: genetic characterization and experimental infection in rhesus monkeys (*Macaca mullatta*). *J Gastroenterol*, 2008, 43(7):565-570.
- [7] Meng XJ. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol*, 2010, 140(3-4):256-265.
- [8] Purcell RH, Emerson SU. *Prevention/Thomas HC, Lemon S, Zuckerman AJ, eds. Viral hepatitis*, 3rd ed. Malden, MA: Blackwell Publishing, 2005:635-645.
- [9] Li SW, Zhang J, He ZQ, et al. The study of aggregate of the ORF2 peptide of hepatitis E virus expressed in *Escherichia coli*. *Chin J Biotechnol*, 2002, 18(4):463-467. (in Chinese)
- [10] 李少伟,张军,何志强,等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒ORF2片段的聚合现象研究. *生物工程学报*, 2002, 18(4):463-467.
- [11] Zhang J, Ge SX, Huang GY, et al. Evaluation of antibody based and nucleic acid based assays for diagnosis of hepatitis E virus infection in a rhesus monkey model. *J Med Virol*, 2003, 71(4):518-526.
- [12] He ZQ, Zhang J, Li SW, et al. Particulate Recombinant hepatitis E virus capsid protein and its antigenicity and immunogenicity. *Chin J Biotechnol*, 2004, 20(2):262-268. (in Chinese)
- [13] 何志强,张军,李少伟,等. 颗粒化重组戊型肝炎病毒衣壳蛋白及其抗原性与免疫原性. *生物工程学报*, 2004, 20(2):262-268.
- [14] Li SW, Zhang J, Li YM, et al. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. *Vaccine*, 2005, 23(22):2893-2901.
- [15] Wu T, Wu XL, Ou SH, et al. Difference of T cell and B cell activation in two homologous proteins with similar antigenicity but great distinct immunogenicity. *Mol Immunol*, 2007, 44(12):3261-3266.
- [16] Emerson SU, Nguyen H, Graff J, et al. In vitro replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein. *J Virol*, 2004, 78(9):4838-4846.
- [17] Emerson SU, Clemente-Casares P, Moiduddin N, et al. Putative neutralization epitopes and broad cross-genotype neutralization of hepatitis E virus confirmed by a quantitative cell-culture assay. *J Gen Virol*, 2006, 87(Pt 3):697-704.
- [18] He SZ, Zheng ZZ, Wu T, et al. The Establishment of cellular attachment model for hepatitis E virus (HEV) and its application in the identification of HEV cellular attachment region. *Chin J Virol*, 2006, 22(6):426-430. (in Chinese)
- [19] 何水珍,郑子峰,吴婷,等. 戊型肝炎病毒细胞吸附模型的建立及病毒吸附区域初步研究. *病毒学报*, 2006, 22(6):426-430.
- [20] Zhang J, Liu CB, Li RC, et al. Randomized-controlled phase II clinical trial of a bacterially expressed recombinant hepatitis E vaccine. *Vaccine*, 2009, 27(12):1869-1874.
- [21] Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, et al. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomized, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 2010, 376(9744):895-902.
- [22] Purcell RH, Nguyen H, Shapiro M, et al. Pre-clinical immunogenicity and efficacy trial of a recombinant hepatitis E vaccine. *Vaccine*, 2003, 21(19-20):2607-2615.
- [23] Zhang M, Emerson SU, Nguyen H, et al. Recombinant vaccine against hepatitis E: duration of protective immunity in rhesus macaques. *Vaccine*, 2002, 20(27-28):3285-3291.
- [24] Safary A. Perspectives of vaccination against hepatitis E. *Intervirology*, 2001, 44(2-3):162-166.
- [25] Emerson SU, Purcell RH. Recombinant vaccines for hepatitis E. *Trends Mol Med*, 2001, 7(10):462-466.
- [26] Shrestha MP, Scott RM, Joshi DM, et al. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med*, 2007, 356(9):895-903.
- [27] Xiong JH, Guo SQ, Ge SX, et al. The preliminary analysis of the recognition epitopes of anti-HEV monoclonal antibodies on HEV ORF2. *Chin J Virol*, 2008, 24(2):83-87. (in Chinese)
- [28] 熊君辉,郭顺清,葛胜祥,等. 抗戊型肝炎病毒单克隆抗体识别表位的初步研究. *病毒学报*, 2008, 24(2):83-87.

(收稿日期:2011-03-24)

(本文编辑:张林东)