View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Xiamen University Institutional Repository

生命的化学 , 2014, 34(1): 13-22 www.life.ac.cn doi: 10.13488/j.smhx.201401013

夏宁邵，男，1964年7月生，教授，厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心主任，公共卫生学院院长，全国体外诊断产业技术创新战略联盟理事长。

长期致力于病毒性疾病的应用基础及转化研究。主持研制出全球第一个商品化重组戊型肝炎疫苗及30余种传染病诊断试剂盒并均实现产业化，研制的重组人乳头瘤病毒16/18型二价疫苗正在进行三期临床试验。所主持项目获国家技术发明二等奖、国家科技进步二等奖、中国专利金奖各1项，获授权专利22项，在Lancet、PNAS等SCI刊物发表论文90余篇。

大肠杆菌表达的病毒样颗粒疫苗

李少伟，夏宁邵*

(厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心，厦门 361102)

摘要：重组病毒样颗粒是病毒衣壳蛋白外源表达的重要形式，形态结构与天然病毒高度相似，位于纳米尺度的大小易于被免疫系统识别，可激发机体产生保护性免疫反应，且不含有病毒基因，因此，是一种理想的疫苗形式，也是基于结构进行疫苗设计的重要结构载体。目前已上市的乙型肝炎疫苗、人乳头瘤病毒疫苗和戊型肝炎疫苗等基因工程疫苗均采用病毒样颗粒形式。大肠杆菌表达系统被广泛用于基因工程药物的生产，具有安全性好、生产周期短、易于放大生产等优点，在病毒样颗粒疫苗应用上具有良好前景。本文综述了利用大肠杆菌研制戊型肝炎疫苗和人乳头瘤病毒疫苗的进展，特别是这些病毒样颗粒疫苗的表达及组装、表位结构特征和临床试验结果。

关键词：疫苗；病毒样颗粒；大肠杆菌；戊型肝炎病毒；人乳头瘤病毒；重组蛋白

Virus-like particle-based vaccine development using *Escherichia coli* expression system

LI Shaowei, XIA Ningshao*

(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in infectious disease, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: Virus-like particles (VLPs) are generated by the self-assembly of viral structural protein using various expression systems. VLPs ensemble native virus particles in morphology and maintain key immune epitopes as authentic virus. In light of nanometer-sized particles with diameters of 20- 60 nm, VLPs were shown to be a passport to immune recognition, thus being capable of eliciting strong protective immune responses. Recombinant VLP-based vaccines have superior safety profiles due to lack of any viral genome. There are several licensed and highly successful VLP-based vaccines produced using recombinant DNA

收稿日期：2013-12-24
基金项目：国家自然科学基金项目(30925030；81172885)
*通信作者：E-mail：nsxia@xmu.edu.cn

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

technology, such as recombinant hepatitis B, human papillomavirus and hepatitis E vaccine. *E.coli* expression system was well-established in production of biotherapeutics. This production platform for recombinant VLP-based vaccines has many advantages, such as rapid replication cycle and amenability for scale-up for commercial scale production. This review outlines the success of hepatitis E and human papillomavirus vaccines derived from *E.coli*. We highlight the protein expression, particle assembly, key epitope structure and clinical trials of these VLP-based vaccines.

Key words: prophylactic vaccine; virus-like particles; *Escherichia coli*; hepatitis E virus; human papillomavirus; recombinant protein

疫苗是预防病毒性疾病最为成功的干预手段。早期，人们经验地利用动物活体或鸡蛋制备疫苗，随着新技术的发展，后期的疫苗更多依赖于细胞培养方法和分子生物学技术的应用。新近在基因递送和表达、纳米颗粒、蛋白质制造和佐剂技术等方面取得的进展，特别是整合了人单克隆抗体分离、结构生物学和高通量测序技术，利用解析中和性单克隆抗体与病毒表面蛋白的复合物结构，阐明中和作用的结构基础，使得我们能够从原子水平上进行疫苗抗原的设计。2013年，两篇Science论文利用结构生物学解析了人呼吸道合胞病毒(Respiratory syncytial virus，RSV)的融合细胞前中和表位构象并进一步设计新型的RSV疫苗，这一领域的进展被美国Science杂志评选为年度十大科学突破之一[1]。可以说，随着各种技术的进步和学科的融合，我们已经进入分子疫苗学时代。

病毒样颗粒(virus-like particles，VLPs) 是由病毒的一个或多个结构蛋白在体内或体外自组装而成的空心颗粒，因其不含病毒的遗传物质，无法复制和扩增，而不具备感染致病的能力。VLPs在形态结构上与天然病毒颗粒相似，很好地模拟天然病毒的抗原表位，数十纳米的尺度(大约40nm)和高度有序的表位结构也有利于树突状细胞的吞噬和抗原加工，从而有效地诱导机体产生对病毒的免疫保护反应[2]。与传统疫苗相比，VLPs具有相当的免疫原性和更好的安全性而成为一种理想的疫苗形式，它还可作为载体蛋白携带外源抗原或通过化学耦连接入非蛋白抗原，是疫苗设计的重要构件。目前，已发现35种病毒的蛋白能形成VLPs[3]，其中，已上市的乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)、人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)和戊型肝炎病毒(hepatitis E virus，HEV)等三种基因工程疫苗均采用VLPs的疫苗形式[4]。

为了充分去除杂质，特别是避免含有病毒基因，VLPs的制备通常在表达系统外源表达后进行体外组装。表达系统可分为真核表达系统和原核表达系统。其中，真核表达系统包括杆状病毒/昆虫细胞表达系统[5, 6]、植物体表达系统[7, 8]、酵母表达系统[9, 10]、哺乳动物细胞表达系统[11]，而原核表达系统主要为大肠杆菌表达系统[12, 13]。真核表达系统具有复杂的蛋白辅助折叠与后期修饰等功能，因而大部分病毒的衣壳蛋白在真核系统都能形成VLPs。但是由于真核表达系统常面临培养周期长、成本高、表达量低、难纯化等难题，制约了VLPs疫苗的研发速度。

与真核表达系统相比，大肠杆菌表达系统更早、更广泛地被应用于生物医药领域，并且是公认的高效、低成本、安全性良好的表达系统。大肠杆菌来源的疫苗产量高、成本低，尤其适合开发面向全世界(特别是多数的发展中国家)的新型疫苗。但由于颗粒性抗原结构和组装都较为复杂，一般认为在大肠杆菌中的组装效率较低，因此，如何利用大肠杆菌进行颗粒性抗原的表达和组装是当今疫苗界的难题之一[14]。近几年来，在利用大肠杆菌表达系统制备VLPs的技术取得了一系列突破，据统计，大肠杆菌表达系统可表达35种VLP中的16种，大肠杆菌表达的VLP可由包涵体复性得来，也可利用低温培养的策略获得可溶性的表达，甚至可以同时表达多个结构蛋白进行多层颗粒共组装[15]。其标志性事件为全球首个戊型肝炎疫苗成功上市，该疫苗是第一种采用了大肠杆菌表达系统的VLPs疫苗[16]。此外，使用大肠杆菌表达系统的HPV16/18型双价疫苗(宫颈癌疫苗)和

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

HPV6/11型双价疫苗(尖锐湿疣疫苗)均已进入了临床试验阶段。

1 戊型肝炎病毒 VLPs 疫苗

1.1 戊型肝炎病毒

戊型肝炎病毒(hepatitis E virus，HEV)引发的急性肝炎是全球主要的病毒性肝炎之一，症状与甲型肝炎类似，多数呈自限性，但症状更重，病死率更高，特别是孕妇病死率可高达20%[17]。慢性肝病患者合并戊肝感染易引发肝衰竭，死亡率达70%[18]。HEV主要通过消化道传播，偶尔可通过输血或垂直[19]途径传播。与大多数粪-口传播的传染病一样，提供清洁饮用水及加强人畜排泄物的消毒处理是最重要预防戊型肝炎的措施。然而，这些措施在疫区往往不易及时做到，如果疫情一旦形成，仅凭这些措施也难以迅速消除疫情，接种疫苗是个体防护戊肝的最直接和最有效的手段，也是避免戊肝疫情爆发的有效手段。由于HEV仅能在人或其他灵长类动物原代肝细胞中进行持续培养，体外大量培养戊肝病毒未能取得成功，无法进行减毒或者灭活疫苗的开发。因此，基因工程疫苗成为研究的主要思路。

1991年，Tam 等[20]首次报道HEV的全基因序列，揭示HEV基因组为线性单股正链的RNA，全长约为7.2 kb，包含3个开放读码框架(ORF)。其中，ORF1开始于HEV病毒基因组的5’端，编码1 693个氨基酸多肽，包括病毒复制和蛋白加工所需的非结构蛋白，包括甲基转移酶RNA依赖的RNA 聚合酶(RdRp)、RNA解旋酶、木瓜酶样丝氨酸蛋白酶以及未知功能的X和Y结构域(与rubella病毒相似)[21]。ORF3 共含369个碱基，编码123个氨基酸的磷酸化小肽(pORF3)，无糖基化，大小约为13.5 kD，参与病毒入侵免疫系统、调控病毒复制和衣壳组装[22]。

ORF2全长1 980 bp，编码660个氨基酸的主要结构蛋白pORF2。ORF2蛋白N端为典型的信号肽序列，其后是一个富含精氨酸的强正电结构域，与病毒组装过程中的基因组RNA衣壳化(encapisidation)有关。ORF2在翻译过程中通过信号肽识别蛋白(SRP)机制进入内质网(ER)，并在ER中糖基化和累积，可能在此形成衣壳的子粒(capsomer)。PORF2可能与HBV的MS蛋白一样直接由ER分泌至细胞表面，而无需经Golgi体。病毒体最后的组装/成熟因需要基因组RNA的衣壳化，因此必然发生在ER外的胞浆中或胞膜内壁，gpORF2在细胞膜上的聚集可能意味着病毒体的装配。同时，衣壳蛋白在细胞膜上的定位也提示成熟病毒通过芽生方式分泌至细胞外的可能性。采用具有修饰功能的体外转录翻译体系进行PORF2的体外翻译，获得88 kD的gpORF2除单体外，还可见明显的二聚体形式，说明gpORF2有自发形成同源二聚体的倾向，病毒衣壳的子粒很可能即是由gpORF2的同源二聚体组成[23]。

HEV分离毒株的核苷酸序列同源性分析显示，感染人类的HEV可分为4种基因型，相同基因型的病毒同源性大于90%，而不同基因型之间的同源性为70%~90%[24]。地域上，基因1型主要分布在亚洲和非洲部分，基因2型主要在墨西哥和西亚，这两种都只能从人身上分离到，与水源性爆发和散发型传播相关；基因3型零星分布在世界各地，基因4型病毒主要存在亚洲和欧洲，3型和4型病毒可由于食用感染病毒的猪肉传给人类，猪也可以感染分离自人的这两种型别HEV。提示这两类HEV感染宿主存在差异，即基因1、2型只感染人，基因3、4型除了感染人，还能感染其他哺乳动物，属人兽共患病毒。幸运的是，由于ORF2编码的结构蛋白氨基酸序列具有较高的同源性，不同基因型HEV的血清学表现相似，各基因型病毒间的交叉保护实验证明，4种HEV基因型属于同一种血清型，为疫苗的研制提供了便利。

1.2 戊型肝炎病毒的免疫表位和结构基础

ORF2编码单一的结构蛋白组成病毒衣壳，含有感染血清抗体识别的表位区域，多肽位移法测定表位分区显示：HEV可划分为6个抗原区域，至少26个表位区域，其中aa 12-147、aa 381-504和aa 573-660区域表位最为集中[25]；此外，重组蛋白的性质研究发现ORF2蛋白的C端2/3可以形成较强的构象依赖性表位，识别这些表位的抗体在大多数感染者体内可持续相当长时间，而ORF2 N端1/3部分(aa 1-224)具有较强的急性期表位，在感染后期较快下降直至消失[26]。

Li等[27]利用含有ORF2 aa112-660的重组杆状病毒分别感染Tn5和SF9细胞，均可见58 kD和50 kD

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

重组蛋白的表达，其中58 kD蛋白在两种细胞中的表达、定位以及与细胞成份的结合等方面均未见明显差别，但50 kD蛋白在两种细胞中的表达方式差别明显：SF9细胞中50 kD蛋白明显滞留于细胞内，而Tn5细胞中50 kD蛋白大量见于培养上清，免疫荧光检测先可见HEV特异蛋白在细胞局部的聚集，细胞浆中可见大量的平均23.7 nm的病毒样颗粒。50 kD蛋白的两端测序表明N段仍为aa112，而C端为aa 607。以VLPs作为抗原检测HEV IgG和IgM抗体，具有良好的灵敏度和特异性。Zhang等人[28]在大肠杆菌中表达了ORF2 aa 394-606的E2蛋白可自发形成同源二聚体，且二聚体与病人恢复期血清反应性远远高于单体，提示存在二聚体依赖的强构象表位。Li等[13]进一步表达ORF2 aa 368-606的p239蛋白，发现其在4M尿素中即可在盐的作用下形成20 nm左右的病毒样颗粒，提示其N端可通过疏水相互作用对同源二聚体亚单位进行颗粒组装，利用突变分析鉴定了E2和p239蛋白中与二聚化和颗粒化相关的关键结构域。Zhang等[29]鉴定了E2蛋白上至少存在两个免疫优势的中和表位8C11和8H3，有趣的是，8C11 抗体的结合可促进8H3单抗的结合，并利用天然HEV病毒在体外和体内实验中验证了这两个表位协同作用的存在。

1999年Xing等[30]对昆虫细胞表达的VLPs进行低温电镜(cryo-EM)三维结构重建，获得分辨率为22 Å的空间结构，揭示HEV VLP为T=1的等二十面体对称结构，由60个单体蛋白组成，表面有明显突起，内部为空心，二倍轴方向的同源二聚体构成衣壳子粒(capsomer)。2009年Yamashita等[31]和Guu等[32]分别解析HEV基因3型和4型VLP的晶体结构，分辨率为3.5 Å，结构显示，VLP由三个结构域组成：S结构域(aa 118-303)构成病毒衣壳的基底层，P1或称M结构域(aa 314-453)在衣壳颗粒的2倍、3倍和5倍轴上形成相互作用，P2或称P结构域(aa 455-603)突出在病毒衣壳表面。同年，Li等[33]获得了2.0 Å的E2s结构域(aa 455-603)高分辨率结构，阐明了二聚体形成的关键氨基酸和作用机制，并分析了E2s上的中和表位区域，证明ORF2蛋白的二聚化结构是病毒与宿主细胞相互作用所必需的。Tang等[34]解析了1.9 Å分辨率的E2s和中和抗体8C11 Fab的免疫复合物晶体结构，首次精确定位了HEV中和表位，关键氨基酸位于Glu479、Ser497、Arg512、His577、Arg578和Lys534，其中Ser497决定该中和表位在宿主选择上的差异。

1.3 戊型肝炎疫苗的研究

1993年Purdy等[35]首先报道利用大肠杆菌表达缅甸株ORF2 C端2/3(aa 225-660)的重组蛋白trpE-C2，采用铝盐佐剂免疫食蟹猴，4周后抗体阳转，以HEV缅甸毒株和墨西哥毒株进行攻毒，与对照组ALT升高和排毒相比，蛋白免疫组病毒性肝炎生化指标正常，甚至未见粪便排毒。Tsarev等[36]采用昆虫杆状病毒表达系统表达HEV ORF2蛋白，并纯化获得纯度大于99%以上的HEV特异蛋白，吸附于佐剂后按每剂量50 μg、10 μg、2 μg、0.4 μg、0 μg(对照)五组0 d、28 d两针免疫恒河猴，每组4只，免疫后4周以30万MID50同型病毒(SAR-55株)进行攻毒，结果蛋白免疫组16只猴均不发病，肝活检仅1只2 μg 组和1只0.4 μg组出现轻微病理改变。Genelabs公司研究人员同样采用昆虫细胞表达ORF2的aa 112-660片段，获得大量可溶性的重组62 kD蛋白，纯化后免疫食蟹猴，可对1000CID50剂量的异源病毒(墨西哥株)攻击产生良好保护。McAtee等[37]用昆虫细胞表达的缅甸株ORF2 62 kD蛋白(aa 112-660)为双联体，用高效液相层析偶联电喷射质谱技术(LC-MS)将双联体解离，得到56.5 kD和58.1 kD的多肽，经蛋白质肽谱分析，该两个多肽的N端同为aa 112，C端分别为aa 637和aa 652，其中56.5 kD蛋白具有良好的免疫反应性。这些结果初步证实了基因工程戊肝疫苗的可行性。

2001年，Zhang等[28]发现用GST融合表达载体在大肠杆菌中表达HEV ORF2 aa 394-606，经过凝血酶酶切和纯化后获得二聚体蛋白E2，以弗氏佐剂免疫恒河猴，可诱导具有保护性的中和抗体。Li等[13]将E2蛋白N端延伸至aa 368位置在大肠杆菌中表达重组蛋白p239，经过分子筛HPLC、动态光散射、透射负染电镜和原子力显微镜等多种颗粒检测方法证实病毒样颗粒的形成，以铝佐剂混合p239免疫小鼠，10 d后全部抗体阳转。进一步的恒河猴动物保护实验显示，铝佐剂配制的p239疫苗能够使动物抵御基因1型或4型HEV的攻击，即使在高滴度HEV的作用下仍可完全预防肝炎的发生，证实p239病毒样颗粒具有良好的免疫原性和

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

免疫保护性。结构上，p239的尺寸是E2蛋白的5~8倍[4]，虽然两者的免疫反应性相当[13]，但p239的免疫原性较E2蛋白提高了近200倍[38]，使其成为有效的预防性疫苗，显示了大肠杆菌表达VLP的重要性。

HEV p239疫苗在I/II期临床试验中显示了良好的安全性和免疫原性[39]，并确定人用剂量为每针次30 μg，免疫程序与乙肝疫苗相同，即0、1、6月三针免疫。2007年8月在江苏省东台市启动p239疫苗的单中心、随机、双盲、安慰剂(乙肝疫苗)对照的III期临床试验。试验共招募122 179名16~65岁健康志愿者，经筛选并有效接种第1针的人数共112 604人，全程接种97 356人，全程接种率为86.46%；其中试验组和对照组有效接种第1针各56 302人。从而，完成了戊肝疫苗第一个、也是史上临床试验人数最多之一的Ⅲ期临床试验[40]。获得结果包括：

(1)安全性：在整个研究期间未发现与疫苗相关的异常反应、偶合反应及严重不良事件。在接种结束后5年的长期安全性观察中，试验组的严重不良事件发生率与对照组无统计学差异，且均与疫苗接种无关，提示受试疫苗具有良好的安全性。回顾性分析在III期临床试验过程中接种戊肝疫苗期间意外怀孕的妇女的不良反应和胎儿的发育情况，未发现任何异常[41]。同时，数据表明乙肝病毒携带者接种戊肝疫苗的安全性与一般人群无异[42]。

(2)免疫原性及免疫持久性：戊肝疫苗全程免疫后1个月，受试者戊型肝炎IgG抗体阳转率为98.69%(95% *CI*：98.35%~98.97%)；免后平均抗体水平为19.02 WU/ml(95% *CI*：18.62~19.43 WU/ml)；免后抗体平均增长倍数为139.27倍(95% *CI*：134.01~144.74倍)。接种戊肝疫苗的受试者在全程免疫后2年内抗体阳性率保持在99%以上，在全程免疫后第25个月抗体几何平均滴度下降到1.6 WU/ml，仍高于自然感染戊肝病毒后抗体几何平均滴度。提示戊肝疫苗具有较好的免疫原性，且在全程免疫后24个月时仍能保持较高的戊型肝炎IgG抗体阳性率和抗体水平。对乙肝病毒携带者亚组进行分析，数据表明戊肝疫苗在该人群中诱导的抗体水平与一般人群无异。

(3)预防戊型肝炎的效果：在97 356名全程接种的受试者中，自全程接种后1个月起的连续1年内(7月~19月)，共确诊了15例戊型肝炎病例，均发生于对照组，疫苗保护率为100.0%(95% *CI*：72.14%~100.0%)。受试者于0、1月接种前2针戊肝疫苗之后，在5个月的时间内(接种第3针之前)获得的保护率为100.0%(95% *CI*: 9.1%~100.0%)，暗示戊肝疫苗接种在戊肝爆发时的应用潜力，此外，受试疫苗在不同性别、不同年龄人群中均具有对戊型肝炎的预防作用。同时，HEV 239疫苗也能够有效预防HEV隐性感染，保护率为78.3%(95% *CI*: 65.6%~86.3%)，这对于某些戊肝感染的高危人群，如免疫缺陷患者，基础性慢性肝病病人，食品从业人员等具有重要的意义[43]。

大肠杆菌表达的HEV 239戊型肝炎疫苗(益可宁®，Hecolin®)已经获得新药证书、生产文号，并通过GMP生产标准检查，于2012年10月27日正式上市，为戊型肝炎的预防提供利器[16]。

2 人乳头瘤病毒 VLPs 疫苗

2.1 人乳头瘤病毒与相关疾病

人乳头瘤病毒(Human Papillomavirus, HPV)是一类DNA病毒，能感染人的表皮及粘膜上皮，诱导上皮组织的疣状增生乃至良恶性肿瘤，据估计5%的人类肿瘤是由HPV导致的[44]。其中，女性第二大恶性肿瘤宫颈癌与HPV关系最为密切，世界范围内每年宫颈癌新发病例约50万，其中86%的病例发生在发展中国家，我国每年宫颈癌新发病例约10万，死亡病例约3万。此外，HPV还与口腔癌，肛门癌，女性的阴道癌、外阴癌，男性的阴茎癌有着高度的相关性。除恶性肿瘤之外，HPV感染还能引起上皮组织的多种良性的细胞增生，如尖锐湿疣、复发性乳头状瘤等。其中，尖锐湿疣是一种相当常见的性传播疾病。虽然该疾病为良性病变，但是具有反复发作、不易痊愈的特点，往往会给患者带来沉重的心理压力及经济负担。

HPV属于乳头瘤病毒科(Papillomaviridae)乳头瘤病毒属(*Papillomavirus*)[45]，是一类无包膜的，嗜上皮组织的小双链DNA病毒，在电镜下，天然的HPV呈现T=7的等二十面体对称结构。HPV基因组大约有7.2~8 kb，包含8个开放读码框，编码6个早

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

期蛋白和2个晚期蛋白，其中，晚期基因区(L区)长约3 000 bp，编码2个病毒衣壳蛋白，即病毒主要衣壳蛋白L1和次要衣壳蛋白L2，两种蛋白共同组成病毒的衣壳，与病毒包装、入胞、感染等密切相关。L1衣壳蛋白是HPV衣壳蛋白的主要成份，基因全长约1.5 kb，蛋白表观分子量为55~60 kD，占病毒衣壳蛋白总量的80%~90%。L2衣壳蛋白也参与病毒颗粒的形成[46]，L1、L2蛋白以5:1的比例共同组成病毒颗粒，其中L2蛋白位于五聚体中心的长轴上[47]，L2蛋白可能在病毒基因组DNA的包装中起到主要作用，并参与了病毒侵入宿主细胞的多个步骤[48]。

由于乳头瘤病毒(PV)缺少可靠的细胞培养模型以及血清标志物，其命名与分类主要依据宿主特异性和基因组序列[45]。其中，L1基因高度保守，差异最大的PV中L1基因同源性依然高达40%，通常根据L1蛋白的同源性进行分型，同源性小于60%分为不同的类(Genus)，在60%~70%之间为种(Specie)，在70%~90%之间为同一型(Type)，在90%~98%的不同病毒为亚型(Sub-type)而同源性在98%以上的不同株则被定义为型内变异(Variant)。目前，分类依据增加了编码早期蛋白E1和E2的基因序列，依据E1-E2-L1的同源性PV可以分为29类，用希腊文字母表示。HPV主要存在于alpha、beta、gamma、mu以及nu 5类中，其中alpha类的HPV主要引起生殖道粘膜病变，称为嗜生殖道粘膜型。导致恶性肿瘤的高危型HPV主要分布alpha类中的第5、6、7、9、11种，其中较为常见的HPV16属于第9种，HPV18属于第7种，而主要引起生殖器疣的HPV6、11属于第10种。目前，已知的HPV型别累计180多种，且不断有新的型别被分离鉴定。

2.2 人乳头瘤病毒免疫表位和结构基础

HPV的病毒颗粒由L1和L2蛋白共同组成，L1位于表面，L2位于内部且含量较少，因此，免疫血清中绝大多数的抗体都是由L1蛋白诱导产生的。外源表达的L1蛋白可以在体外自组装成VLP而不需要L2蛋白的参与，而利用真核细胞(如293FT、293TT和昆虫细胞等)共表达L1和L2蛋白，可形成同时含有L1和L2以及包裹报告基因的HPV假病毒。低温电镜结构显示，5个L1蛋白单体聚合形成星状的五聚体形态(即壳粒，capsomere)，72个壳粒通过相互作用组装成为与天然病毒结构类似的T=7等二十面体对称结构的VLP[49]，假病毒中L1蛋白结构与VLP相同，L2则结合于L1五聚体的孔洞内部。形态上VLP与天然病毒颗粒无异，保留了病毒衣壳的天然构象，且不含有病毒基因组，是理想的HPV疫苗形式。

晶体结构结果显示，HPV16 L1的三级结构核心是由20-382位氨基酸残基所组成的一个典型的“果冻卷”状β折叠桶，其中含有两组各4条β片层组成的反向平行的结构，该8个β片层结构分别以字母B到I命名。在各个β片层之间有B-C、C-D、D-E、E-F、F-G和H-I环状连接肽连接。其中的DE、FG、HI三个连接肽具有较大的柔性，明显突出于β折叠桶的外表面，是HPV L1蛋白抗原表位的主要分布区域，五个L1蛋白紧密接触，形成14Å的中空的圆台状五聚体，五聚体结构中伸出的L1蛋白C端的α螺旋区域，与另一五聚体的EF环相互作用，由Cys428与相对应的L1蛋白Cys175形成二硫键，连接两个五聚体，最终组装形成颗粒结构[50-52]。

多个型别HPV L1蛋白氨基酸序列的比对结果显示，几乎所有的序列高变区均位于五聚体外表面上的环状结构区域(BC、DE、EF、FG和HI)，提示这些高变区是HPV血清型和组织特异性的结构基础。利用多株HPV 中和单抗的进行突变定位，其结合位点均位于表面环高变区内[51,53-57]。虽然有低分辨率的电镜结构显示，中和抗体与L1蛋白结合比例包括1个抗体Fab结合1个单体、1个五聚体等结合方式，但目前尚无免疫复合物晶体结构鉴定L1表面免疫表位的报道。结构显示这些环状结构在五聚体的表面聚集成了复杂的空间结构，且多个一级序列距离较大的环共同形成了表面结构特征，构成了型特异性的构象中和表位，可以预见只有保持天然构象的L1蛋白才能诱导保护性的中和抗体，中和表位的形成是HPV VLP疫苗的结构基础[58,59]。HPV主要中和表位具有型特异性，这也是目前HPV疫苗采用多价策略的主要原因[51]。虽然，HPV L2蛋白免疫原性低下，但最近研究表明，处于包埋状态的L2的表位可能在病毒感染过程中暴露，其诱导中和抗体具有型别交叉的中和活性，且多数为线性表位，可以进行移植和重

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

塑，为研究广谱的HPV疫苗开辟了新的思路。

2.3 人乳头瘤病毒疫苗的研究

由于HPV具有严格的种属特异性，病毒生活史依赖于宿主细胞的分化过程，难以在其他动物或细胞中进行繁殖或体外培养，且HPV基因组中含有致癌基因，因而无法采用传统的减毒或灭活方式研制HPV疫苗，目前已上市或研究中的HPV预防性疫苗多数采用基因工程疫苗形式。已上市的HPV疫苗包括默沙东(Merck)公司的HPV16/18/6/11四价疫苗Gardasil®[60]和葛兰素史克(GSK)公司的HPV16/18二价疫苗Cervarix®[61]，已在世界范围内广泛应用，但在我国处于临床试验阶段。目前，我国多家研究机构或企业利用大肠杆菌、酵母和昆虫细胞等表达系统进行HPV疫苗的研究开发。

2.3.1 人乳头瘤病毒四价疫苗 Gardasil®(Merck 公司)

HPV疫苗Gardasil®为四价疫苗，含有HPV6，11，16，18四种型别，适应症为预防因这些病毒的感染及其导致的宫颈癌、尖锐湿疣等疾病。关键技术是通过基因密码子优化，使其适于在酿酒酵母中高效表达，L1蛋白纯化后经过颗粒重组装形成VLP。

在上市前Gardasil®先后共进行了12次临床试验，共21 514名志愿者接种了疫苗(11 813人接种试验苗，9 701人接种安慰剂)，全部采用0，2，6月三针免疫方案。最初的I/IIa临床试验在3 160人中评估了三种单价疫苗(HPV11、HPV16和HPV18)的安全性和免疫原性。结果显示，在随访的4~5年间，Gardasil®对相应型别HPV持续感染、相关CIN2/3以及原位癌的保护率为100%(76%~100%)，对相应病毒引起的外生殖器病变(包括生殖器疣和阴道、阴门瘤样病变)保护率也是100％(88%~100%)[62]。

2.3.2 人乳头瘤病毒二价疫苗 Cervarix®(GSK 公司)

HPV疫苗Cervarix®主要针对HPV16,18所引起的宫颈癌、宫颈癌前病变及阴道癌前病变。与Gardasil®不同，Cervarix®采用了杆状病毒昆虫细胞表达系统，虽然表达成本较高，但是具有表达蛋白活性高、不存在过度糖化等显著优点。此外，Cervarix®采用了全新的佐剂系统AS04。传统佐剂不同，AS04含有3-去酰基脂质A。脂质A为革兰氏阴性菌表面的脂多糖，具有很强的佐剂效应。但是由于其强烈的内毒素毒性，无法应用于疫苗中，但经过磷酸化修饰的脂质A，既保留了佐剂特性又极大降低了毒性，进一步去酰基化修饰，内毒素毒性减至最低。含有3-去酰基脂质A的新型佐剂AS04之前应用于HBV疫苗，被证明具有良好的佐剂效果和安全性。

在临床试验中，Cervarix®对HPV16/18持续感染保护率为96%(75%~100%)HPV16/18相关CIN的保护率达到100％(42.4%~100%)。在4.5年后，免疫人群的HPV16/18抗体阳性率仍达98％。此外，研究还发现，除了HPV16/18以外，Cervarix®对于同属高危型的HPV 45、HPV52及HPV 31也有保护效果，并且对15~55岁年龄段的女性都有效果[63]。

2.3.3 基于大肠杆菌表达的人乳头瘤病毒疫苗

由于真核表达系统的表达量低，培养成本高，给大规模工业化生产带来了困难，并且使得最终产品的成本高昂，限制了其在发展中国家的应用。厦门大学与厦门万泰沧海生物技术有限公司在戊肝疫苗成功的基础上，研制基于大肠杆菌表达系统的人乳头瘤病毒疫苗。目前， HPV16/18宫颈癌疫苗已经进入III期临床试验，HPV6/11尖锐湿疣疫苗已获得临床批件。经过优化的HPV L1基因在大肠杆菌中高效表达，并经过独特方法纯化和重组装的VLP吸附到传统的铝佐剂上，免疫程序为0、1、6月。其中，HPV16/18疫苗的I和II期临床试验显示了良好的安全性和与已上市疫苗相当的中和抗体生成水平[64]。基于大肠杆菌的HPV疫苗将在生产成本上具有优势，有望在全世界特别是发展中国家的宫颈癌、尖锐湿疣等HPV相关疾病防控中发挥重大的作用。

3 结语与展望

采用基因工程和细胞培养技术的病毒样颗粒疫苗是人类病毒疫苗史上的一大突破，与传统的减毒或灭活疫苗相比，高度纯化的VLP疫苗具有组分单一，不含有病毒核酸，良好的安全性和质量可控等显著的优点，但是研究难度更大，虽然有数十种的VLP在实验室中成功制备，但是极少数能够在疫苗应用中取得突破，获得合适的放大

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

制备工艺、组装工艺和制剂工艺组合是阻碍其发展的重要原因。大肠杆菌表达系统在基因工程药物中得到了广泛的应用，但在制备和组装大尺度的、结构复杂的VLP方面仍然存在诸多问题，从蛋白质结构优化和分子设计入手，同时进行大肠杆菌的外源表达调控机制相关的功能基因改造，使其更适合VLP的表达和组装，可能是解决问题的途径。但无论如何，基于大肠杆菌的戊型肝炎疫苗和HPV疫苗的成功研制给了我们信心和鼓舞，相信最简单的大肠杆菌表达和最接近病毒免疫功能的VLP技术相结合，带给我们的是一个全新的开始。

参 考 文 献

[1] In vaccine design, looks do matter. Science, 2013, 342(6165): 1442-1443

[2] Grgacic EV, Anderson DA. Virus-like particles: passport to immune recognition. Methods, 2006, 40(1): 60-65

[3] Noad R, Roy P. Virus-like particles as immunogens. Trends Microbiol, 2003, 11(9): 438-444

[4] Zhao Q, Li S, Yu H, et al. Virus-like particle-based human vaccines: quality assessment based on structural and functional properties. Trends Biotechnol, 2013, 31(11): 654-663

[5] Berger I, Fitzgerald DJ, Richmond TJ. Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. Nat Biotechnol, 2004, 22(12): 1583-1587

[6] Senger T, Schädlich L, Gissmann L, et al. Enhanced papillomavirus-like particle production in insect cells. Virology, 2009, 388(2): 344-353

[7] Greco R, Michel M, Guetard D, et al. Production of recombinant HIV-1/HBV virus-like particles in Nicotiana tabacum and Arabidopsis thaliana plants for a bivalent plant-based vaccine. Vaccine, 2007, 25(49): 8228-8240

[8] Biemelt S, Sonnewald U, Galmbacher P, et al. Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. J Virol, 2003, 77(17): 9211-9220

[9] Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, et al. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. Nature, 1982, 298(5872): 347-350

[10] Mcaleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, et al. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. Nature, 1992, 24(5947): 500-502

[11] Even-Chen Z, Drummer H, Levanon A, et al. Development of a novel hepatitis B vaccine containing Pre-S1. In: Biologicals from Recombinant Microorganisms and Animal Cells: Production And Recovery. Vch Publishers, Inc: New York, New York, USA; Balaban Publishers: Rehovot, Israel. 1991: 533-547

[12] Zhang W, Carmichael J, Ferguson J, et al. Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in Escherichia coli: denaturation, renaturation, and self-assembly of virus-like particles *in vitro*. Virology, 1998, 243(2): 423-431

[13] Li SW, Zhang Jun, Li YM, et al. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. Vaccine, 2005, 23(22): 2893-2901

[14] Park EY, Saito T, Dojima T, et al. Visualization of a recombinant gene protein in the baculovirus expression vector system using confocal scanning laser microscopy. J Biosci Bioeng, 1999, 87(6): 756-761

[15] Zeltins AC. Characterization of virus-like particles:a review. Mol biotechnol, 2013, 53(1): 92-107

[16] Wu T, Li SW, Zhang J, et al. Hepatitis E vaccine development: a 14 year odyssey. Hum Vaccin Immunother, 2012, 8(6): 823-827

[17] Tsega E, Krawczynski K, Hansson BG, et al. Hepatitis E virus infection in pregnancy in Ethiopia. Ethiop Med J, 1993, 31(3): 173-181

[18] Péron JM, Bureau C, Poirson H, et al. Fulminant liver failure from acute autochthonous hepatitis E in France: description of seven patients with acute hepatitis E and encephalopathy. J Viral Hepat, 2007, 14(5): 298-303

[19] Khuroo MS, Kamili S, Khuroo MS. Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. J Viral Hepat, 2009, 16(7): 519-523

[20] Tam AW, Smith MM, Guerra ME, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. Virology, 1991, 185(1): 120-131

[21] Magden J, Takeda N, Li T, et al. Virus-specific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus. J Virol, 2001, 75(14): 6249-6255

[22] Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK, et al. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. J Virol, 1997, 71(12): 9045-9053

[23] Zafrullah M, Ozdener MH, Kumar R, et al. Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. J Virol, 1999, 73(5): 4074-4082

[24] Ando TS, Fankhauser RL. Genetic classification of Norwalk-like viruses, 2000: S336-S348

[25] Heyndrickx L, Stewart-Jones G, Jansson M, et al. Selected HIV-1 Env trimeric formulations act as potent immunogens in a rabbit vaccination model. PLoS One,

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2013, 8(9): e74552
[26] Xiang SH. Recent advances on the use of structural biology for the design of novel envelope immunogens of HIV-1. Curr HIV Res, 2013 [Epub ahead of print]
[27] Li TC, Takeda N, Miyamura T, et al. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. J Virol, 2005, 79(20): 12999-13006
[28] Zhang JZ, Ng MH, Xia NS, et al. Conformational antigenic determinants generated by interactions between a bacterially expressed recombinant peptide of the hepatitis E virus structural protein. J Med Virol, 2001, 64(2): 125-132
[29] Zhang J, Gu Y, Ge SX, et al. Analysis of hepatitis E virus neutralization sites using monoclonal antibodies directed against a virus capsid protein. Vaccine, 2005, 23(22): 2881-2892
[30] Xing L, Kato K, Li T, et al. Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual-domain T=1 particle presenting native virus epitopes. Virology, 1999, 265(1): 35-45
[31] Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, et al. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(31): 12986-12991
[32] Guu TS, Liu Z, Ye QZ, et al. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(31): 12992-12997
[33] Li SW, Tang XH, Seetharaman J, et al. Dimerization of hepatitis E virus capsid protein E2s domain is essential for virus-host interaction. PLoS Pathog, 2009, 5(8): e1000537
[34] Tang XH, Yang CY, Gu Y, et al. Structural basis for the neutralization and genotype specificity of hepatitis E virus. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(25): 10266-10271
[35] Purdy MA, Mccaustland KA, Krawczynski K, et al. Preliminary evidence that a trpE-HEV fusion protein protects cynomolgus macaques against challenge with wild-type hepatitis E virus (HEV). J Med Virol, 1993, 41(1): 90-94
[36] Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, et al. Recombinant vaccine against hepatitis E: dose response and protection against heterologous challenge. Vaccine, 1997, 15(17/18): 1834-1838
[37] Mcatee CP, Zhang Y, Yarbough PO, et al. Purification of a soluble hepatitis E open reading frame 2-derived protein with unique antigenic properties. Protein Expr Purif, 1996, 8(2): 262-270
[38] 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
[39] 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
[40] Zhang J, Zhang XF, et al. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet, 2010, 376(9744): 895-902
[41] Zhu FC,Wu T, Zhu FC, et al. Safety of the hepatitis E vaccine for pregnant women: a preliminary analysis. Hepatology, 2012, 55(6): 2038
[42] Wu T, Huang SJ, Zhu FC, et al. Immunogenicity and safety of hepatitis E vaccine in healthy hepatitis B surface antigen positive adults. Hum Vaccin Immunother, 2013, 9(11)[Epub ahead of print]
[43] Zhang J. Protection against hepatitis E virus infection by naturally acquired and vaccine-induced immunity, 2013 [Epub ahead of print]
[44] Frazer IH, Levin MJ. Paradigm shifting vaccines: prophylactic vaccines against latent varicella-zoster virus infection and against HPV-associated Cancer. Curr Opin Virol, 2011, 1(4): 268-279
[45] de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomaviruses. Virology, 2004, 324(1): 17-27
[46] Favre M. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. J Virol, 1975, 15(5): 1239-1247
[47] Buck CB, Cheng NQ, Thompson CD, et al. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. J Virol, 2008, 82(11): 5190-5197
[48] Holmgren SC, Patterson NA, Ozbun MA, et al. The minor capsid protein L2 contributes to two steps in the human papillomavirus type 31 Life cycle. J Virol, 2005, 79(7): 3938-3948
[49] Baker ST. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. Biophys J, 1991, 60(6): 1445-1456
[50] Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, et al. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. Mol Cell, 2000, 5(3): 557-567
[51] Bishop B, Dasgupta J, Klein M, et al. Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies. J Biol Chem, 2007, 282(43): 31803-31811

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[52] Wolf M, Garcea RL, Grigorieff N, et al. Subunit interactions in bovine papillomavirus. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(14): 6298-6303

[53] Bjornstrom E. To live and die in L. A.County:neighborhood economic and social context and premature age-specific mortality rates among Latinos.Health Place, 2011, 17(1): 230-237

[54] Ludmerer SW, Mcclements WL, Wang XM, et al. HPV11 mutant virus-like particles elicit immune responses that neutralize virus and delineate a novel neutralizing domain. Virology, 2000, 266(2): 237-245

[55] Christensen ND, Cladel NM, Reed CA, et al. Hybrid papillomavirus L1 molecules assemble into virus-like particles that reconstitute conformational epitopes and induce neutralizing antibodies to distinct HPV types. Virology, 2001, 291(2): 324-334.

[56] Slupetzky K, Shafti-Keramat S, Lenz P, et al. Chimeric papillomavirus-like particles expressing a foreign epitope on capsid surface loops. J Gen Virol, 2001, 82(Pt 11): 2799-2804

[57] Combita AL, Touzé A, Bousarghin L, et al. Identification of two cross-neutralizing linear epitopes within the L1 major capsid protein of human papillomaviruses. J Virol, 2002, 76(13): 6480-6486

[58] Tomita Y, Shirasawa H,Simizu B. Expression of human papillomavirus types 6b and 16 L1 open reading frames in Escherichia coli: detection of a 56,000-dalton polypeptide containing genus-specific (common) antigens. J Virol, 1987, 61(8): 2389-94

[59] Kelsall SR, Kulski JK. Expression of the major capsid protein of human papillomavirus type 16 in Escherichia coli. J Virol Methods, 1995, 53(1): 75-90

[60] Markowitz LE, Hariri S, Lin C, et al. Reduction in human papillomavirus (HPV) prevalence among young women following HPV vaccine introduction in the United States, National Health and Nutrition Examination Surveys, 2003-2010. J Infect Dis, 2013, 208(3): 385-393

[61] Schauner S, Lyon C. Bivalent HPV recombinant vaccine (cervarix) for the prevention of cervical Cancer. Am Fam Physician, 2010, 82(12): 1541-1542

[62] Perez G, Lazcano-Ponce E, Hernandez-Avila M, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) L1 virus-like-particle vaccine in Latin American women. Int J Cancer, 2008, 122(6): 1311-1318

[63] Lehtinen M, Paavonen J, Wheeler CM, et al. Overall efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against grade 3 or greater cervical intraepithelial neoplasia: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. Lancet Oncol, 2012, 13(1): 89-99

[64] Iankov ID, Federspiel MJ, Galanis E. Measles virus expressed Helicobacter pylori neutrophil-activating protein significantly enhances the immunogenicity of poor immunogens. Vaccine, 2013, 31(42): 4795-4801

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net