

重组治疗性乙型肝炎疫苗 (YIC) 的实验研究

闻玉梅, 何丽芳, 瞿 涤, 马张妹, 姚 忻

(上海医科大学 卫生部医学分子病毒学重点实验室, 上海 200032)

[摘要] 研制了抗原-抗体复合物型乙肝治疗性疫苗。用小鼠实验证明这一治疗性疫苗的作用机理为: 通过复合物中抗体 Fc 段与抗原呈递细胞表面的 Fc 受体结合, 促进了细胞摄取抗原。复合物中的抗原经呈递后可比单纯抗原更有效地激活 T 细胞增殖, 释放更多的 γ -干扰素和白细胞介素-2, 属 TH1 类型应答。复合物可在小鼠中诱生较单纯抗原诱生的抗-HBs 高 10 倍以上。复合物还可诱生更强的细胞免疫, 表现为经特异的抗原刺激后, γ -干扰素的 mRNA 量增多。还发现复合物可在对 HBsAg 低应答鼠系中 (B 10.S) 诱生与正常应答鼠相当的抗体效价。在 HBsAg 阳性转基因鼠中, 复合物可使部分鼠的 HBsAg 转为阴性, 并可产生抗-HBs, 反映这一疫苗具有疗效。为制备人用乙肝治疗性疫苗建立了用重组酵母菌表达的 HBsAg 与人高效价抗乙肝免疫球蛋白组建治疗性疫苗的工艺, 以及产品标化及效力的参比实验技术。

[关键词] 乙型肝炎; 治疗性疫苗; 抗原抗体复合物; 免疫应答

1 前言

乙型肝炎(乙肝)是危害我国人民健康最严重的疾病之一。我国现有约 1.2 亿名乙肝表面抗原(HBsAg)携带者, 不仅可成为传染源, 部分人还可发展成为慢性肝炎, 肝硬化, 及肝癌患者。预防性乙肝疫苗在世界及我国均已证实可有效地预防乙肝, 但对乙肝患者并无疗效。目前用于治疗乙肝的干扰素和作用于病毒逆转录酶的新药拉米夫定(lamivudine)虽有抑制病毒复制的效果, 但停药后病毒常恢复复制, 并已发现有抗药变异株。此外, 上述治疗价格昂贵, 需长期注射或服用, 难以被广大患者所采用。我们于 1986 年发现我国 90% 以上的乙肝患者肝内无病毒基因整合, 提出了可以治愈乙肝的观点^[1]。1988 年在研究与分析乙肝患者的

免疫应答后, 提出我国多数乙肝患者为幼龄感染病毒, 处于对 HBsAg 的免疫耐受状态。设想用修饰 HBsAg 或用合成肽等改变抗原, 或改变抗原呈递方式等新治疗策略以治疗乙肝患者。这一新思路自 1988 年获国家高科技计划资助至今。首先在国内外无先例的条件下建立了鸭乙肝免疫耐受动物模型并利用这一模型研究了多种类型的治疗性疫苗^[2~5]。最终发现抗原-抗体免疫原性复合物(Immunogenic Complex 简称 IC)可有效地在部分鸭中清除病毒及病毒抗原, 认为可发展成为可供人体应用的治疗性疫苗。这一技术已于 1997 年获国家发明专利(专利证书号 ZL931124093)。1997 年起, 治疗性乙肝疫苗已被列为“863”计划重大项目, 现已完成重组型治疗性乙肝疫苗(YIC)的实验研究, 通过了部级鉴定, 已由北京生物制品所进

[收稿日期] 1999-07-15

[作者简介] 闻玉梅(1934-), 女, 湖北武昌人, 上海医科大学教授

* 国家高技术研究发展计划(“863”计划)资助项目(863-Z18-01)

行中试, 将申报临床研究。

在我国研制治疗性乙肝疫苗的同时, 法国巴斯德研究所的 Tiollais 等开始用 HBsAg 转基因鼠进行了实验研究^[6]。其路线为仅用 HBsAg 或病毒包膜抗原 (HBsAg + PreS2) 作为免疫原, 进行了人体实验, 有一定疗效^[7]。近年来, 该所学者又转为研究核酸疫苗 (DNA Vaccine) 在转基因鼠中的疗效^[8]。90 年代中期以来, 美国学者研究了病毒核心抗原合成肽交联佐剂组建治疗性疫苗, 在转基因鼠中虽有较好效果, 但在黑猩猩中结果不理想。此外, 史克, Chiron 等公司也在 90 年代中后期开展了乙肝治疗性疫苗的研制, 其路线均为用不同佐剂提高 HBsAg 的免疫原性。本课题组所采用的 IC 治疗性疫苗与上述疫苗的路线根本不同, 是通过改变对 HBsAg 的呈递方式以诱生有效的免疫, 消除免疫耐受性。本课题组对 IC 治疗性乙肝疫苗进行了作用机理研究, 动物实验及生产工艺研究。现将基础理论研究及动物实验的结果介绍如下:

2 抗原-抗体免疫原性乙肝治疗性疫苗的机理研究

为消除对 HBsAg 的免疫耐受性, 本项目设计的治疗性疫苗是通过将 HBsAg 与相应的特异抗体 (抗-HBs) 按一定比例及工艺结合组成复合物 (IC)。IC 中的抗体分子的 Fab 段可与 HBsAg 结合, 而抗体分子的 Fc 段可与抗原呈递细胞 (APC) 表面的 Fc 受体结合, 从而将复合物中的 HBsAg 带入 APC 内, 促进 HBsAg 被 APC 所摄取。鉴于 IC 被摄取后, 其中的抗原呈递方式可不同于单独抗原的呈递, 会更有效地激活 T 辅助细胞 (TH), 诱生免疫介导的细胞因子及/或特异抗体。

2.1 证实抗体中的 Fc 段是促进 APC 摄取 IC 的关键

应用对 HBsAg 有免疫应答的 Balb/c 小鼠, 用刀豆蛋白 A 腹腔注射获得巨噬细胞, 分别与 HBsAg、anti-HBs, IC 孵育。细胞经洗涤, 裂解后测定被吞噬的 HBsAg 的百分率。结果 IC 的吞噬率为 64.5%, 而 HBsAg 的吞噬率仅为 2.5%。分别用羊抗-HBs, 鼠抗-HBs 组建 IC 免疫鼠, 结果前者免疫诱生的抗-HBs 远低于后者。这是由于 APC 表面的 Fc 受体只识别同种动物抗体的 Fc 段,

羊抗-HBs 只有聚集 HBsAg 的作用而无通过 Fc 促进吞噬的作用, 故免疫效果较差^[9]。用胃蛋白酶消化去除鼠-抗-HBs 的 Fc 后组建 IC, 因缺少 Fc 段, 鼠腹腔巨噬细胞吞噬复合物的百分率大大降低^[9]。

2.2 证实 IC 经 APC 的呈递作用后可更有效地激活 T 细胞

取分别经 HBsAg, IC, 抗-HBs 孵育的巨噬细胞, 与同品系小鼠浓集脾脏来源的 T 细胞同孵育, 用³H-TdR 掺入实验测定 T 细胞增值反应, 结果显示经与 IC 孵育后的巨噬细胞可更有效地促进 T 细胞增殖 (表 1)。

表 1 鼠腹腔巨噬细胞的抗原呈递作用^[10]

Table 1 Antigen presentation of mouse peritoneal macrophages

浓集 T 细胞来源	共孵育的巨噬细胞			
	IC	HBsAg	鼠抗-HBs	培养液对照
经 HBsAg 免疫鼠	3351 ± 525*	633 ± 323	1242 ± 174	1433 ± 92
未免疫鼠	2298 ± 74	260 ± 74	612 ± 117	1000 ± 285

*³H-TdR 掺入的 cpm 数 # 与其他 cpm 数相比 p < 0.01

2.3 证实经 IC 免疫的小鼠脾细胞在 HBsAg 刺激下可诱生更高水平的 TH1 型细胞因子

分别用 HBsAg 及由 HBsAg 与鼠抗-HBs 组建的 IC 免疫小鼠, 取脾细胞, 经 HBsAg 刺激后, 用细胞因子试剂盒 (Amersham 公司产品) 检测 γ -干扰素, 白细胞介素-2, 白细胞介素-4, 白细胞介素-5 及肿瘤坏死因子- α 。结果显示 IC 免疫鼠脾细胞较 HBsAg 免疫鼠脾细胞经特异抗原刺激后, 可诱生更多的 TH1 型细胞因子 (表 2)。

表 2 用 IC 或 HBsAg 免疫鼠脾细胞在 HBsAg 作用下诱生的细胞因子^[10]

Table 2 Cytokines induced by HBsAg in HBsAg or IC immunized mouse splenocytes

	细胞因子 / (pg·ml ⁻¹)				
	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-5	TNF- α
经 IC 免疫鼠脾细胞	583.5 ± 90*	365 ± 60*	< 15	—	370 ± 62.3
经 HBsAg 免疫鼠脾细胞	300.0 ± 90	130 ± 30	< 15	—	284.3 ± 83.9

* 与 HBsAg 免疫鼠比较 p < 0.02

以上实验证实了 IC 乙肝治疗性疫苗设计路线的理论, 从而为进一步开发与生产 IC 治疗性疫苗奠定了基础。

3 重组酵母菌表达的 HBsAg 与鼠抗-HBs 组装成 IC (YIC) 的免疫原性研究

为组建可供乙肝患者应用的 IC 治疗性疫苗, 选择我国北京生物制品研究所生产的 HBsAg 为原料 (YHBsAg), 并与国外的重组 HBsAg 进行了抗原电镜观察, 免疫原性, 抗原结合力, 纯度等性能的对比。建立了制备 YHBsAg-鼠抗-HBs 复合物的方法, 在鼠中首先进行了免疫原性实验研究。结果见图 1。与 HBsAg 相比, YIC 在鼠中初次免疫后显示略增强免疫应答效果, 但经再次免疫后 IC 诱生的抗-HBs 的效价 ($\log 3.9 \pm 0.3$) 可达单用 HBsAg 免疫鼠抗体效价 ($\log 2.4 \pm 0.25$) 的 10 倍以上。通过 mRNA 的细胞因子半定量测定方法, 发现用 YIC 免疫的鼠脾细胞经用 HBsAg 刺激后, 诱生 IFN- γ 的 mRNA (24h, T/C 为 1.07), 明显高于单用 HBsAg 免疫的小鼠 (24h, T/C 为 0.71)。而 IL-4 的 mRNA 则在两组间无明显差异 (图 2)。这些实验证明我国生产的 YHBsAg 可作为原料制备 YIC, 并可刺激机体产生比单独 HBsAg 免疫更强的体液及细胞免疫应答。

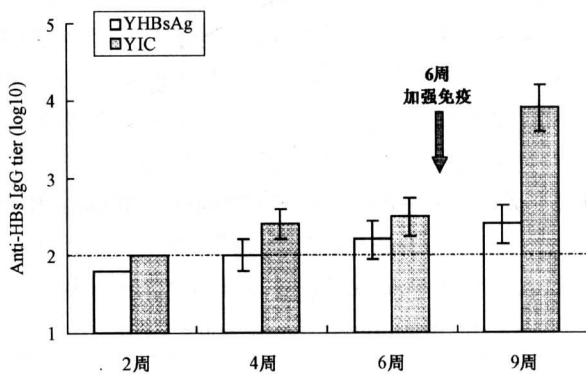
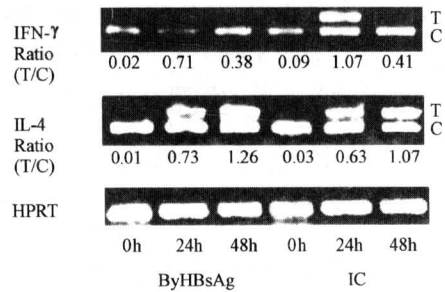


图 1 YHBsAg 与 YIC 免疫小鼠血清抗-HBs 动态

Fig.1 Anti-HBs response induced by YHBsAg and YIC with alum

4 YIC 在对 HBsAg 低应答鼠中的免疫原性

应用现有的乙肝预防性疫苗发现, 约有 3%~5% 被免疫者仅出现低效价的抗-HBs, 或不产生抗-HBs, 难以达到有效预防的效果, 被称为低反应者或无反应者。由于 YIC 可增强机体的免疫应答, 进一步研究了 YIC 是否可在低免疫应答机体中诱生有效的抗体。与国外合作应用了对 HBsAg 正常反应鼠 B10 品系及低反应鼠 B10.S 品系, 分别用 HBsAg 及 YIC 进行了免疫对比研究。结果见图 3。实验结果显示, 用 YIC 免疫 B10.S 鼠加或不加氢氧化铝佐剂均可诱生与 B10 鼠相似效价的抗 HBs, 而单用 HBsAg 则无此作用, 说明 YIC 可有效地提高低免疫应答鼠对 HBsAg 的免疫应答。



T-IFN- γ 或 IL-4 mRNA RT-PCR 扩增产物; C-设计的内对照扩增产物; T/C-细胞因子与内对照之比; HPRT-次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (a house keeping gene)

图 2 YHBsAg 及 YIC 免疫小鼠脾细胞特异诱生 IFN- γ 及 IL-4 mRNA 半定量研究

Fig.2 Semi-quantification of IFN- γ and IL-4 mRNA in splenocytes of YHBsAg and YIC immunized mice

5 IC 在 HBsAg 转基因鼠中的治疗效果

为研究 IC 的疗效, 与国外合作应用了 HBsAg 转基因鼠 (TgE), 共分为 3 组每组 10 只鼠, 按雌雄各 5 只再分成两小组。三组所用的免疫原如下: 同源 IC 免疫组, 每只鼠肌肉注射含 $2\mu\text{g}$ HBsAg 与鼠抗-HBs 组装的 IC 及佐剂氢氧化铝; 非同源 IC 免疫对照组, 每只鼠肌肉注射含 $2\mu\text{g}$ HBsAg 与人抗-HBs 组装的 IC 及佐剂氢氧化铝; 不注射的对照

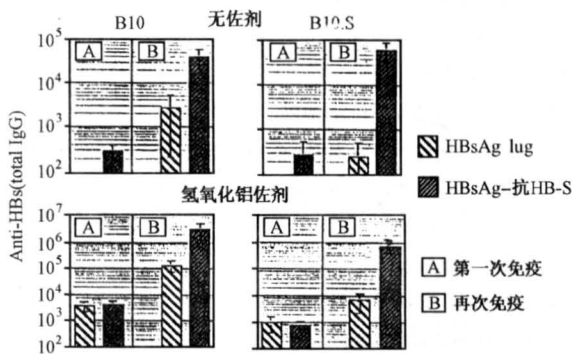


图 3 正常应答鼠 (B10) 与低应答鼠 (B10.S) 中 HBsAg 与 IC 免疫后抗 - HBs 应答

Fig. 3 Anit - HBs response in normal responder mice (B10) and low responder mice (B10.S) immunized with HBsAg and IC

组。共免疫 4 次，每次免疫间隔 3 周。每组动物于免疫前及免疫后第 3、6、9、12 周分别检测 HBsAg 量及抗 - HBs 效价，各组动物的 HBsAg 转阴率及血清抗 - HBs 的平均效价见表 3。结果显示在转基因鼠中 IC 可使部分小鼠 HBsAg 转为阴性并出现抗体。同源 IC 组显然有疗效，但不同源 IC 免疫组则几乎未见疗效，更进一步证明 IC 是通过抗体的 Fc 段而发挥作用。结果还显示 IC 在雌性鼠中的疗效较雄性鼠为好。理论上转基因鼠所表达的抗原应相当稳定，但在本实验过程中部分转基因鼠出现自发 HBsAg 消失，反映转基因鼠作为疗效动物模型的不足之处。根据对照组小鼠中始终未出现抗 - HBs，而 IC 治疗组中可诱生抗 - HBs，说明治疗组鼠是通过特异性免疫应答，清除了持续存在的 HBsAg。

6 总结与讨论

本课题组经过十余年研究，以消除对乙肝表面抗原的免疫耐受性为治疗目标，首先建立了鸭乙肝免疫耐受动物模型，设计了多种候选的治疗性疫苗，经过实验证明 IC 是有效又可行的乙肝治疗性疫苗。通过小鼠的实验研究，揭示了这一疫苗的作用机理是以 IC 中抗体 Fc 段与 APC 表面的受体结合，促进 APC 摄取 IC，通过改变抗原的呈递方式，有效地激活 T 细胞，释放更高水平的 IFN - γ

等 TH1 型细胞因子。IC 不仅可在 HBsAg 低反应鼠中诱生抗 - HBs，还可在 HBsAg 转基因鼠中清除部分鼠的 HBsAg 及诱生抗 - HBs。本研究结果显示 IC 可用于治疗乙肝患者，并有可能获得较好的疗效。

本课题组还完成了用 YHBsAg 和人高效价抗 - HBs 免疫球蛋白 (简称 HBIG) 制备供人体应用治疗性疫苗的实验室工艺，产品标化及参比的效力实验。现已由北京生物制品所进行中试及申报临床研究。

表 3 IC 在 HBsAg 转基因鼠 (TgE) 中免疫效果

Table 3 Results of IC immunization in HBsAg transgenic mice (TgE)

免疫组分	注射后周数	雌鼠		雄鼠	
		HBsAg 转阴率 %	抗 - HBs 效价	HBsAg 转阴率 %	抗 - HBs 效价
HBsAg - 鼠 - 抗 HBs	注射前		< 10		< 10
	3	20	< 10	16	< 10
	6	40	233	20	191
	9	60	433	50	186
	12	72	1070	54	455
HBsAg - 人 - 抗 HBs	注射前		< 10		< 10
	3	18	< 10	8	< 10
	6	17	100	5	40
	9	41	204	41	51
	12	38	514	22	143
不注射对照	注射前		< 10		< 10
	3	11	10	18	10
	6	6	10	7	10
	9	30	10	36	10
	12	40	10	38	10

由于本课题立项早，十余年来得到“863”计划的持续支持与资助，在研究中对理论研究与开发产品并重，因此当前在国际乙肝治疗性疫苗中得到了国际学术界的重视，并已占有一席之地。本项目的临床研究如能尽早进行，将使我国在乙肝治疗性疫苗的领域中处于国际领先地位。

面对开发和应用治疗性乙肝疫苗的大好前景，我们必须看到治愈乙肝的艰巨性。任何新的治疗制品都有一个逐步认识与完善过程。只有通过临床联系基础，不懈地进行临床研究与科学实验才会取得

我国所特有的成就。

参考文献

- [1] Wen Y M, Liu H J, Chen H Z, et al. Studies on intrahepatic hepatitis B virus DNA in 98 viral hepatitis B patients. *Chinese Medical Journal*, 1986, 99: 861~865
- [2] Wen Y M, Zhang W, Xu Y Y, et al. Elimination of immune tolerance to hepatitis virus in an animal model. *Chinese Medical Journal*, 1992, 103: 199~203
- [3] Wen Y M, Xu Y Y. Pathogenesis and immune responses in hepatitis B patients and carriers. In Y M Wen, Z Z Xu, J L Melnick Eds. *Viral Hepatitis in China: problems and control strategies*. Basel Karger, 1992, 19: 31~39
- [4] Wen Y M, Xiong S D, Zhang W. Solid matrix - antibody - antigen complex can clear viraemia and antigenaemia in persistent duck hepatitis B virus infection. *Journal of General Virology*, 1994, 75: 335~339
- [5] Wen Y M, Guo S Q, Xiong S D, Therapeutic vaccine studies of viral hepatitis B in animal models. In Jameel S and E K Wagner Eds. *Current developments in animal virology*, Oxford and IBH publishing Co. New Delhi, India and Science publisher Lebanon, NH, USA 1996, 375~382
- [6] Mancini M, Hadchoual M, Tiollais P. Induction of anti - hepatitis B surface antigen (HBsAg) antibodies in HBsAg producing transgenic mice: A possible way of circumventing nonresponse to HBsAg. *Journal of Medical Virology*, 1993, 29: 67~72
- [7] Pol S, Driss F, Michel M-L, et al. Specific vaccine therapy in chronic hepatitis B infection, *Lancet*, 1994, 344: 342
- [8] Mancini M, Hadchoual M, Davis H L, et al. DNA-mediated immunization breaks tolerance in a transgenic mouse model of hepatitis B surface antigen chronic carriers. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 1996, 93: 12496~12501
- [9] 周生华, 瞿涤, 闻玉梅, 等. 抗 HBs - HBsAg 复合物诱生体液免疫应答的研究 [J]. *中华微生物和免疫学杂志*, 1998, 18: 331~335
- [10] Wen Y M, Qu D, Zhou S H. Antigen-antibody complex as therapeutic vaccine for viral hepatitis B. *International Review of Immunology*, 1999, 18: 251~258

Experimental Studies on Recombinant Hepatitis B Immunogenic Complex Therapeutic Vaccine (YIC)

Wen Yumei, He Lifang, Qu Di, Ma Zhangmei, Yao Xin

(Department of Molecular Virology, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

[Abstract] A therapeutic vaccine composed of HBsAg complexed to anti-HBs (IC) has been developed for viral hepatitis B. Enhanced immune response was induced in hosts immunized with this complex, and the mechanisms of this vaccine was studied in mice. It was shown that the Fc fragment of anti-HBs in the complex was critical for induction of potent immune responses. The Fc fragment of the anti-HBs in the complex could attach to the Fc receptors on the antigen presenting cells (APC), increasing the uptake of HBsAg into these cells. After being ingested, the antigen complexed to antibody could be more effectively processed and presented to T cells. After incubation with macrophages previously treated with IC, T cells showed higher proliferation rate, and higher level of interferon- γ mRNA was detected. Enhanced immune response in host has also been shown by comparing anti-HBs titer in mice immunized with antigen-antibody complex versus the anti-HBs titer in mice immunized only with HBsAg. More than tenfold increase in anti-HBs was observed in the latter group. In addition, this complex was used to immunize an HBsAg low-responder mouse strain (B10.S). Compared to the normal responsive counterpart mouse strain (B10), immunization with HBsAg induced (cont. on. p. 57)

利；而且实用性强、投资省、效益高，即根治了两个行业的污染，调整了产业结构，保护环境和生态平衡，并将推动燃煤电力、水泥、新材料、煤炭、建筑、环保等行业的发展，可以说本发明开辟了生态效益型的经济增长之路。

参 考 文 献

[1] Phillip O, Schrader R. 第六届国际水泥化学会议论

- 文集 [C]: 第一卷. 北京: 中国建工出版社, 1980
- [2] 硅酸盐岩相学 [M]. 北京: 中国建工出版社, 1997. 298, 300
- [3] Альбац В С, Лебедева Е Г. 水泥, 1985, (10): 16 ~ 18
- [4] 朱雪芳. 水泥熟料速烧技术 [M]. 1987
- [5] 国家环境保护“九五”计划和 2010 年远景目标 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1996

Clean Burning Process of Coal Which Converts Pollutants into Value-added Products

Zhu Xuefang

(Chinese Academy of Sciences, Beijing 100864, China)

[Abstract] The new technology of clean burning of coal and simultaneously converting the resultants into value-added products is to add a special admixture in coal and grind them together to form affinity granules, which are sprayed into the boiler of the power plant for affinity calcination. The technology, while ensuring power and heat supply, decreases the contents of carbon residue, NO_x and CO_2 raises the activity of pulverized coal ashes, conducts solid desulfurization, and turns all the solid resultants into quality cement clinkers in the quick burning and quick cooling boiler, thus eliminating gas and solid pollution without producing secondary pollution, and realizing clean production.

[Key words] clean burning; turning resultants into value-added products; quick burning and quick cooling; solid desulfurization; affinity granules; affinity calcination

(cont. from. p. 42) low titer of antibody, whereas, immunization using HBsAg-anti-HBs complex, B10.S mice responded by producing similar level of anti-HBs as that induced in the B10 mice. When the complex was used to immunize HBsAg positive transgenic mice (TgE), after four injections, in the female mice, 72% cleared HBsAg and developed anti-HBs (mean titer 1:1070 by EIA); while in the male mice, 54% cleared HBsAg and developed anti-HBs (mean titer 1:455 by EIA). Though some of non-immunized mice lost their HBsAg spontaneously during the experiment, none developed anti-HBs. Data showed that this immunogenic complex has promising potential to be used for the treatment of hepatitis B patients. For human use, a therapeutic vaccine composed of yeast-derived recombinant HBsAg complexed to human high-titer anti-HBs immunoglobulin (HBIG) has been developed. Standard procedure for manufacturing this complex, as well as in vitro assay for monitoring its effect were also established. This complex will be further optimized for mass production and application for clinical trial will be submitted.

[Key words] hepatitis B; therapeutic vaccine; antigen-antibody complex; immune responses