

基于流感病毒血凝素茎部结构域的通用疫苗研究进展

杨新燕 沃恩康 张儒轩 方 迪 刘亚辉 郭潮潭

摘 要 流感病毒因其变异快、传播速度快、感染性和致病性强等特点严重威胁着人类健康,通用流感疫苗的制备迫在眉睫,流感病毒血凝素茎部结构域因其保守性和诱导广泛保护性免疫的潜能,成为通用疫苗的研究重点,本文就流感病毒血凝素茎部通用疫苗的最新研究进展进行综述。

关键词 甲型流感病毒 血凝素 茎部结构域 通用疫苗

中图分类号 R373.1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.03.038

流行性感是由流感病毒引起的急性呼吸道传染疾病,严重危害人类的健康。疫苗接种是预防流感病毒感染的最有效方法,现今流感疫苗的主要目的是引发对病毒表面蛋白血凝素(hemagglutinin, HA)的球状头部域的体液免疫反应,以阻断病毒与宿主细胞受体的结合,但这个结构域是跨毒株高度可变的,并且经常发生抗原漂移,因此每年必须及时更新流感疫苗,才能预防当前流行的病毒株,给流感的防控带来极大的困难。因此通用疫苗的制备刻不容缓,通用流感疫苗可以对不同流感病毒毒株和亚型提供广泛的保护,从而省去疫苗的季节性修订,可以有效的防御具有大流行潜力的病毒。流感病毒 HA 茎部结构域在各个亚型中高度保守,具有诱导广泛保护性免疫的潜能,成为通用疫苗的研究热点。

一、HA 茎部

血凝素(hemagglutinin, HA)是构成流感病毒囊膜纤突的主要成分之一,是病毒表面的主要抗原,病毒感染时,HA 与宿主的细胞膜结合,脱掉信号肽成为 HA 前体(HA0),在宿主蛋白酶的作用下裂解为 HA1 和 HA2 两个亚单位。从空间构象来看,流感病毒 HA 可以分为头部和茎部两部分,头部结构域由 HA1 构成,含有受体结合位点和抗原决定簇,具有高度的变异性;茎部由 HA2 及部分 HA1 片段构成,锚定在病毒囊膜脂质双层中,引起病毒囊膜与细胞膜的

融合和病毒衣壳的释放,在各个亚型中高度保守。相比之下,主要由 HA2 结构域构成的 HA 茎部结构域在 HA 各亚型中高度保守,并且包含较大比例的、可结合广泛中和抗体的抗原表位^[1]。目前已经从小鼠和人中分离出了多种针对该结构域的抗体,并且具有广泛的中和作用,比靶向头部的抗体具有更强的特异性和广谱性^[2-6]。部分抗体既可以中和甲型流感内 group1 的病毒(H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13、H16、H17)如 CR6261、F10、C179 等,和(或)中和 group 2 的病毒(H3、H4、H7、H10、H14 和 H15)如 CR8020、CR8043、12D1 等^[2-5]。这些抗体主要通过抑制 HA 的膜融合,从而阻断流感病毒基因组进入细胞,因此能有效抑制流感病毒的感染,为研发诱导产生此类抗体的通用疫苗提供理论与实验基础。

二、HA 茎部作为通用疫苗的研究策略

随着针对 HA 茎部广谱抗体的发现,围绕如何诱导机体产生针对 HA 茎部抗体的通用疫苗研究不断涌现。研究主要集中在如何能够增强免疫亚显性 HA 茎部结构域的暴露,同时有效的避开头部抗原簇的干扰,从而有效地刺激机体产生针对该靶点的抗体。迄今为止茎部通用疫苗的研究主要有两种策略^[7,8]。

1. 基于无头 HA 的通用疫苗:无头 HA,即删除免疫显性的头部结构域,只含有茎部的 HA。早在 20 世纪 80 年代 Graves 等^[9]就有对无头 HA 构建方法的报道。他们用酸和还原剂处理流感病毒颗粒,从而去除 HA1 亚基,暴露更保守的 HA2 亚基。但这个化学处理方法使得茎部结构域不能正确折叠,从而破坏了可诱导中和抗茎部抗体结合需要的构象表位,同时也去除了 HA1 的 N 和 C 末端部分(其属于茎部结构域的一部分),使得茎表位构象的结构完整性不佳。最近

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30872163、81071849、81272551);国家卫生和计划生育委员会科研项目(WKJ-ZJ-1508);国家中医药管理局科研项目(JDZX2012174);浙江省科技计划项目(2017F10002);浙江省医药卫生科技计划项目(2016KYB072、2016KYB075);浙江省医学科学院青年基金资助项目(2015Y003)

作者单位:310013 杭州,浙江省医学科学院生物工程研究所

通讯作者:郭潮潭,研究员,电子信箱:gchaotan@163.com

已经公开了多种方法来增强茎部结构域的免疫原性。

(1)病毒样颗粒:通过细胞表达系统(植物、哺乳动物或昆虫细胞等)共表达 HA 茎部和病毒核心蛋白,组装成病毒样颗粒(virus-like particles, VLP),模拟天然病毒的构象,可以提高疫苗的免疫原性及其交叉保护作用。Steel 等^[10]构建了包含保守的流感 HA 茎部结构域(缺乏球形头)的新型免疫原,即将编码两个甘氨酸(2G),4 个甘氨酸(4G)或脯氨酸和甘氨酸(PG)的接头肽的序列插入到 A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)(PR8)和 A/Hong Kong/1968(H3N2)(HK68)血凝素的开放阅读框中,代替编码 53~276 氨基酸的核苷酸序列,与 HIV 的 Gag 基因在哺乳细胞内共表达形成 VLP,使用该无头 HA 构建体接种的小鼠相对于用全长 HA 免疫的小鼠产生的免疫血清具有更广泛的反应性。用 PR8 无头 HA 接种的小鼠的血清可以引起 H1N1 流感病毒(A/New Caledonia/20/1999)、2009 年大流行性 H1N1 流感病毒(A/California/04/2009)和对于 A/Singapore/1/1957(H2N2)与 A/Vietnam/1203/2004(H5N1)嵌合 HA 蛋白的抗血清交叉反应。此外,PR8 无头 HA 和 HK68 无头 HA 疫苗可以完全保护致死剂量同源病毒的攻击。Chen 等^[11]选取 A/Puerto Rico/8/1934(PR8)(H1N1)中 HA2 的 α 螺旋中的保守序列作为疫苗候选序列,将其插入乙型肝炎病毒核心蛋白的主要免疫显性区域,并通过使用大肠杆菌表达系统,制备了病毒样颗粒形式的重组蛋白疫苗 LAH-HBc,使用 LAH-HBc 鼻内免疫小鼠,可以有效地引发体液和细胞免疫应答,并保护小鼠抵抗同源流感病毒 PR8 及 2009 年大流行 H1N1 流感病毒或禽类 H9N2 病毒的致命攻击,并可部分保护小鼠免受禽流感 H5N1 流感病毒的致死攻击。

(2)构建表达载体:Bommakanti 等^[12]利用大肠杆菌表达无头的 HA,即根据流感 A/PR/8/34 病毒(H1N1 病毒)设计免疫原 H1HA0HA6-PR8 和 H1HA6-PR8。在大肠杆菌中重组表达,纯化用作免疫原,用 H1HA6-PR8、H1HA0HA6-PR8 和 PR8 病毒免疫的动物的血清可与 H5N1 Vietnam/1203/04(Viet/04)、H1N1 New Caledonia/20/99(NC/99)和大流行 H1N1 California/4/09(Cal/09)菌株的 HA 蛋白结合。免疫小鼠显示其提供了对致死性同源病毒攻击的保护,并且来自免疫动物的血清与来自多种亚型的 HA 蛋白产生交叉反应。随后基于相似的设计理念,运用包括昆虫细胞、哺乳动物细胞等在内的

几种表达载体,表达无头的 HA 蛋白,发现其在小鼠模型中可以保护病毒的攻击。Wohlbold 等^[13]将四糖连接体取代 HA 的球状头域,然后将跨膜结构域置换为凝血酶切割位点,T4 折叠三聚体结构域和 C 末端 6 组氨酸标签,以表达可溶性三聚体。将该构建体克隆到杆状病毒转移载体中,生成重组杆状病毒,并用 BTI-TN5B1-4 昆虫细胞表达可溶性 PR8 无头 HA,其成功诱导了对 H1N1、H5N1 和 H6N1 攻击菌株的保护。该免疫原可以部分保护接种小鼠免受致死剂量 H5N1 诱导的发病和死亡,存活率为 60%。在 H6N1 攻击后,无头 HA 接种的小鼠被完全保护免于死亡。然而,这些构建体相对复杂,并且除去球状头部结构域后最有可能导致所得无头的 HA 免疫原的错误折叠和伴随着重要中和表位的破坏。Lu 等^[14]使用迭代设计过程与无细胞表达平台结合技术,构建了正确折叠广谱中和抗体的构象表位的表达载体,然而,这种无头 HA 免疫原的体内效力尚未公开。Valkenburg 等^[15]利用大肠杆菌表达了 H5 的 HA 茎,将与抗体反应的表位集中表达在 HA 茎多肽中,多肽折叠成三聚体,模仿 HA 的构象,能以高亲和力和结合特异性靶向 HA 茎部广泛中和抗体,可以保护免疫小鼠免受致死性 H5N1 的攻击。

(3)设计稳定无头茎部结构域:Yassine 等^[16]报告一个以 H1 的 HA 茎的免疫原为结构基础,使用六迭代结构化设计产生缺乏免疫头部的 H1 HA 稳定茎(HA-SS),并结合铁蛋白纳米颗粒抗原展示平台,将构建体与细菌铁蛋白融合,形成纳米颗粒,生成 HA 茎-纳米颗粒疫苗免疫原,进一步稳定茎部及增强构建体的免疫原性,可以在小鼠和雪貂体内引发抗 H5N1 的抗体介导的保护性免疫。研究人员根据 A/Brisbane/59/2007(H1N1)亚型的 HA 序列,应用突变重新排列茎的亚基设计产生了稳定的可溶性三聚体 HA 茎部抗原(mini-HAs)^[17]。其结构和抗原结合能力与 HA 全长的相差无几,可以在致死的多种亚型流感病毒的挑战模式中完全保护小鼠。这种 mini-HA 具有高度免疫原性,在动物模型实验中可以诱导产生高效价的抗茎补反应性抗体,产生的抗体可以在小鼠和灵长类动物中提供广泛的保护。

2. 基于嵌合 HA 的通用疫苗:嵌合 HA(chimeric HA, cHA)疫苗接种是另外一种茎部通用疫苗的研究策略,嵌合 HA 主要由相同的 H1、H3 或 B 型流感病毒的茎部结构域与从其他甲型流感病毒亚型来源的“外源的”球状头部结构域组合而成,旨在通过相

同茎部结构域但含有不同头部结构域的嵌合 HA 连续刺激免疫系统,将免疫应答重新聚焦到亚优势茎部区域上,从而破坏头部结构域的免疫显性^[18-20]。这些结构使我们能够特异性诱导产生广泛中和茎部的特异性抗体。Krammer 等^[18]使用嵌合 HA 结构连续免疫小鼠,发现这些抗茎部多克隆在体外起中和作用,并且能够保护小鼠和雪貂抵抗 H5N1、H6N1 或 H7N9 等多种流感病毒的挑战。Ermler 等将乙型流感病毒 B/Yamagata/16/88 的 HA 茎部结构域分别与甲型流感病毒的 H5 (来自 A/Vietnam/1203/2004)、H7 (来自 A/mallard/Alberta/24/2001) 和 H8 (来自 A/mallard/Sweden/24/2002) 的头部结构域嵌合,分别命名为 cH5/B、cH7/B 和 cH8/B,将这些 A/BHA 嵌合体顺序接种小鼠。结果显示这些疫苗结构可以保护小鼠免受 B 型流感病毒 B/Malaysia/2506/04 和 B/Florida/04/06 的致死性攻击,可以诱导产生 1940 ~ 2014 年中不同 B 型流感病毒株的广泛反应性抗体。Nachbagauer 等^[19]表达嵌合型的 HA,可以保护雪貂免受气雾剂传播的 H1N1 流感病毒感染,减少鼻涕从鼻腔脱落的程度和持续时间,并能够降低白鼬模型中大流行 H1N1 病毒的传播。

目前,人类已经具有对茎部表位特异性结合的抗体及低水平的 B 细胞,这种预先存在的免疫最有可能是由流感病毒和(或)流感疫苗的自然感染引起的^[20]。因此,施用一种或两种基于 cHA 的疫苗可能会诱导高效价的茎反应性抗体。这一假设已在临床研究中得以证实,当在临床研究大流行前禽流感病毒疫苗时,施用与这些亚型头部结构域不同的 H5 或 H7 亚型的疫苗可以显著提高疫苗抗茎效价^[21]。在 2009 年 H1N1 大流行期间也出现了相似的增强茎的现象^[20](图 1)。

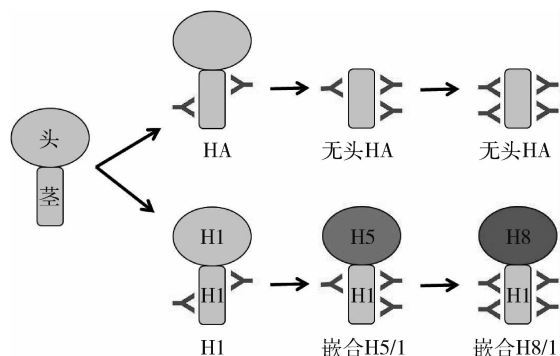


图 1 茎部通用疫苗的研究策略

已经提出了许多增强 HA 茎部暴露的措施,其中包括异源初免-加强(prime-boost)策略、病毒样颗粒的表位移植和使 HA 头部结构域免受免疫系统识别的策略等,除外也可以通过使用免疫佐剂等增强其免疫效果。异源初免-加强策略是指结合不同疫苗模式来增强疫苗的免疫原性和保护功效的疫苗接种方案,目的是通过使用不同的表达和(或)递送抗原来刺激免疫应答,已经在动物模型和早期临床试验中评估了灭活疫苗与其他大流行性流感疫苗平台结合的几种方案^[22]。它们包括许可用于季节性流感疫苗的疫苗,例如灭活病毒疫苗,重组 HA 和活减毒流感疫苗,以及基于尚未许可的平台的研究疫苗,包括 DNA 疫苗和腺病毒疫苗。Wei 等^[23]用编码 H1N1 流感血凝素(HA)的质粒 DNA 进行疫苗接种,并用编码 HA 的季节性疫苗或复制缺陷型腺病毒 5 载体进行加强刺激产生了广泛中和和流感抗体。这种初免/加强组合与单独的组分相比,可以中和从 1934 ~ 2007 年的不同 H1N1 菌株,并赋予小鼠和雪貂对不同的 H1N1 病毒的保护。

三、流感 HA 茎部通用疫苗的体内交叉保护机制

许多研究表明 HA 茎结构域是相对保守的,保守的 HA 茎部疫苗产生的特异性抗体能够中和广谱的流感病毒亚型,是通用疫苗的良好候选者。流感 HA 茎部通用疫苗产生的抗体在体内的保护作用最有可能是由 Fc 介导的机制如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)或抗体依赖性补体介导的裂解和补体依赖性细胞毒性(CDC)引起。

最近已报道,广泛中和 HA 茎部抗体对小鼠的流感保护作用,依赖于抗体的 Fc 结构域的相互作用,也报道了在和猕猴的血浆中发现在缺乏中和作用时针对 HA 茎部的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)^[24,25]。Lu 等^[26]鉴定 HA 茎部特异性 CD4 T 细胞表位,确定了针对流感病毒的保护性细胞免疫应答。除了 ADCC 和 CDC 外,更复杂的机制,如肺泡巨噬细胞、CD8⁺ T 细胞和抗体之间的相互作用也可能发挥作用。最后,不能排除抗茎抗体的中和活性可能通过尚待描述的作用机制而增强,如在体内与宿主防御蛋白、特定细胞类型或肺结构的微环境的相互作用等。

四、展望

随着季节性流感耐药株及新型流感病毒的不断涌现,人们急需一种广谱性的通用疫苗,可以有效的预防现在和将来即将流行的流感病毒株。HA 茎部因其高度保守的特性成为人们的研究重点。HA 茎

3. 其他策略:除了无头 HA 和 cHA 免疫原之外,

部通用疫苗的研究最近已取得较大的进展,自 C179 第 1 株鼠源单克隆抗体发现以后,至今已经分离出了近百个广谱性茎部抗体,已有几种进入临床研究后期。随着对流感病毒血凝素茎部知识的不断深入,人们对如何更好地产生有效的广谱性茎部抗体及抗体的作用机制有了更进一步的探讨。除此之外,广谱流感疫苗的安全性也值得进一步研究。这种疫苗将潜在地提供对季节性流感的保护,而不需要频繁更新菌株组分,以及可以作用于新出现的潜在大流行性流感病毒甚至尚未出现的流感大流行性感冒病毒。

参考文献

- Ellebedy A, Ahmed R. Re - engaging cross - reactive memory B cells: the influenza puzzle[J]. *Front Immunol*, 2012, 3:53
- Okuno Y, Isegawa Y, Sasao F, *et al*. A common neutralizing epitope conserved between the hemagglutinins of influenza A virus H1 and H2 strains [J]. *J Virol*, 1993, 67: 2552 - 2558
- Ekiert D, Bhabha G, Elsliger MA, *et al*. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope [J]. *Science*, 2009, 324: 246 - 251
- Ekiert D, Friesen R, Bhabha G, *et al*. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses[J]. *Science*, 2011, 333 (6044): 843 - 850
- Friesen RH, Lee PS, Stoop EJ, *et al*. A common solution to group 2 influenza virus neutralization[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 445 - 450
- Nachbagauer R, Krammer F. Universal influenza virus vaccines and therapeutic antibodies [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2017, 23 (4): 222 - 228
- Krammer F. Novel universal influenza virus vaccine approaches[J]. *Curr Opin Virol*, 2016, 17: 95 - 103
- Krammer F. The quest for a universal flu vaccine: headless HA 2.0 [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 18(4): 395 - 397
- Graves P, Schulman J, Young J, *et al*. Preparation of influenza virus subviral particles lacking the HA1 subunit of hemagglutinin: unmasking of cross - reactive HA2 determinants[J]. *Virology*, 1983, 126: 106 - 116
- Steel J, Lowen A, Yondola T, *et al*. Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain[J]. *MBio*, 2010, 1(1): 1 - 9
- Chen S, Zheng D, Li C, *et al*. Protection against multiple subtypes of influenza viruses by virus - like particle vaccines based on a hemagglutinin conserved epitope [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 901817
- Bommakanti G, Lu X, Citron M, *et al*. Design of Escherichia coli - expressed stalk domain immunogens of H1N1 hemagglutinin that protect mice from lethal challenge[J]. *J Virol*, 2012, 86: 13434 - 13444
- Wohlbald T, Nachbagauer R, Margine I, *et al*. Vaccination with soluble headless hemagglutinin protects mice from challenge with divergent influenza viruses[J]. *Vaccine*, 2015, 33:3314 - 3321
- Lu Y, Welsh J, Swartz J. Production and stabilization of the trimeric influenza hemagglutinin stem domain for potentially broadly protective influenza vaccines[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(1): 125 - 130
- Valkenburg S, Mallajosyula V, Li O, *et al*. Stalking influenza by vaccination with pre - fusion headless HA mini - stem [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:22666
- Yassine H, Boyington J, McTamney P, *et al*. Hemagglutinin - stem nanoparticles generate heterosubtypic influenza protection [J]. *Nat Med*, 2015, 21(9): 1065 - 1070
- Impagliazzo A, Milder F, Kuipers H, *et al*. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen [J]. *Science*, 2015, 349(6254): 1301 - 1306
- Krammer F, Pica N, Hai R, *et al*. Chimeric hemagglutinin influenza virus vaccine constructs elicit broadly protective stalk - specific antibodies[J]. *J Virol*, 2013, 87:6542 - 6550
- Nachbagauer R, Miller M, Hai R, *et al*. Hemagglutinin stalk immunity reduces influenza virus replication and transmission in ferrets[J]. *J Virol*, 2015, 90(6): 3268 - 3273
- Pica N, Hai R, Krammer F, *et al*. Hemagglutinin stalk antibodies elicited by the 2009 pandemic influenza virus as a mechanism for the extinction of seasonal H1N1 viruses[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109:2573 - 2578
- Ellebedy A, Krammer F, Li G, *et al*. Induction of broadly cross - reactive antibody responses to the influenza HA stem region following H5N1 vaccination in humans[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111:13133 - 13138
- Luke C, Subbarao K. Improving pandemic H5N1 influenza vaccines by combining different vaccine platforms[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2014, 13: 873 - 883
- Wei C, Boyington J, McTamney PM, *et al*. Induction of broadly neutralizing H1N1 influenza antibodies by vaccination [J]. *Science*, 2010, 329:1060 - 1064
- DiLillo D, Tan G, Palese P, *et al*. Broadly neutralizing hemagglutinin stalk - specific antibodies require FcγR interactions for protection against influenza virus *in vivo* [J]. *Nat Med*, 2014, 20:143 - 151
- Jegaskanda S, Job E, Kramski M, *et al*. Cross - reactive influenza - specific antibody - dependent cellular cytotoxicity antibodies in the absence of neutralizing antibodies[J]. *J Immunol*, 2013, 190(4), 1837 - 1848
- Lu IN, Farinelle S, Sausy A, *et al*. Identification of a CD4 T - cell epitope in the hemagglutinin stalk domain of pandemic H1N1 influenza virus and its antigen - driven TCR usage signature in BALB/c mice [J]. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14(6):511 - 520

(收稿日期:2017 - 06 - 13)

(修回日期:2017 - 06 - 21)