

# EV71疫苗研究进展

刘刚, 姚昕, 李凤祥

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

**摘要:** 肠道病毒 71 型 (EV71), 可引起手足口病 (HFMD) 和严重神经系统疾病。近年来, 在世界多个国家和地区报道了 EV71 的爆发。由于目前缺乏有效的抗病毒药物, 因此研制有效的疫苗是控制 EV71 流行最为有效的策略。近年来很多报道显示在 EV71 疫苗研究上取得了重要进展, 本文以此为重点概括了 EV71 灭活疫苗、重组疫苗、DNA 疫苗、多肽疫苗、减毒活疫苗等以及动物模型方面的研究进展。

**关键词:** Enterovirus71 (EV71); 疫苗; 手足口病

中国分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)11-1973-03

## Progress of reaseach on vaccine of Enterovirus 71

LU Gang YAO X in, LI Fengxiang

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products Beijing 100050)

**Abstract** Enterovirus 71 (EV71) is known to be a causative agent of hand-foot-mouth disease (HFMD) and severe neurological complications. Many EV71 outbreaks have been reported in different regions of the world. Due to the lack of an effective antiviral agent, primary prevention of the disease, including the development of effective vaccines, has been the top priority in terms of control strategies. Recently, many reports indicated that important progression is acquired. In this article, we reviewed the progression of EV71 animal model and vaccines which included inactivation vaccine, recombinant vaccine, DNA vaccine, polypeptide vaccine and live attenuated vaccine.

**Key words** Enterovirus 71; vaccine; Hand, foot and mouth disease

Enterovirus71 (EV71) 属小 RNA 病毒科肠道病毒属, 引起手足口病 (Hand, Foot and Mouth Disease, HFMD) 和中枢神经系统疾病, 为危害程度仅次于脊髓灰质炎病毒的嗜神经性肠道病毒。EV71 病毒颗粒呈球形, 无包膜, 衣壳为正 20 面体对称, 由 60 个相同的亚单位构成, 每个亚单位均包含 VP1~VP4 四种结构蛋白, 其中 VP1~VP3 暴露在病毒颗粒表面。EV71 所致的中枢神经系统疾病多发于 5 岁以下儿童, 引起中枢神经系统感染合并心肺衰竭, 易导致患儿神经系统发育迟缓和认知功能减退。自台湾地区 1998 年 HFMD 大流行后 EV71 疫苗的研究受到人们重视, 但到目前为止的研究均处于临床前研究阶段, 本文针对疫苗研制的进展以及需考虑的要点进行综述。

### 1 毒株和细胞基质的选择

选择适宜的毒株对开发成功的疫苗十分重要。

自 1974 年 Schmitt 等确认 EV71 病毒为一种新的肠道病毒 (A 型: B1Cr) 后, 研究发现, 除中国大陆地区外, 同一地区不同时间流行的 EV71 均出现基因型转换, 如美国由 1969 流行的 A 型转换为 1970~1988 年间的 B 型; 马来西亚由 1997 年间流行的 B3 和 B4 型, 转换为 2000 年的 C1 和 B4 型; 而台湾地区则 1998 年流行 C2/B4/C4 型, 1999~2003 年为 B4 型、2004~2005 年 C4 型、2006 年 C5 型、2007 年的 C5/B5 型, 到 2008 年流行 B5 型。我国自 1998~2008 年间流行的毒株为 C4 型, 是否在今后的流行中发生基因转化, 对研制疫苗具有重要意义。

研究表明, EV71 和 CA16 间呈现部分交叉反应<sup>[1]</sup>, EV71 除与 CA16 的膜蛋白序列具有高度同源性外, 与肠道病毒 A 种的其它病毒间也存在较高的氨基酸同源性。不同毒株的 EV71 间也呈现部分交叉反应<sup>[2]</sup>, 但目前缺乏系统的研究报道。EV71 疫苗免

疫后产生的抗体可对 CA16 等肠道病毒的感染提供保护, 但该类肠道病毒抗体在机体内的重组也同样可能干扰 EV71 疫苗预防 EV71 病毒感染的效果。

Vero 细胞和人 2BSKM P<sub>17</sub> 细胞为多种商品化人用疫苗的细胞基质, 可用于 EV71 疫苗的研究和生产。由于该种疫苗应用的主要目标人群为 5 岁以下儿童, 加强对 Vero 细胞的残留 DNA 和杂蛋白的控制尤为重要, 应在建立经验证的敏感方法的基础上, 制定严格的限量标准。

## 2 疫苗种类选择

**2.1 灭活疫苗** 2001 年 Wu 等<sup>[3]</sup> 比较了 10<sup>μ</sup>g 剂的热灭活疫苗、100<sup>μ</sup>g 剂的 VP1 DNA 疫苗和 10<sup>μ</sup>g 剂的 VP1 重组疫苗免疫怀孕前的小鼠, 母传抗体均具有保护 EV71 攻击的效果, 但灭活疫苗的效力最好, 灭活疫苗组的新生小鼠对 2300LD<sub>50</sub> 量病毒攻击的保护效果为 80%, 亚单位疫苗和 DNA 疫苗组的新生小鼠对 230LD<sub>50</sub> 量病毒攻击的保护效果分别为 80% 和 40%。

**2.2 重组疫苗** 重组 VP1 蛋白疫苗 (10<sup>μ</sup>g/剂) 可以诱导产生四个亚型的 IgG 抗体和 T 辅助细胞反应, 抗体被动免疫新生小鼠中和活性, 但保护效果低于灭活疫苗<sup>[3]</sup>。利用应用昆虫细胞 SF-9 共同表达 EV71 的 P1 和 3CD 蛋白, 可形成病毒样颗粒 (VLP) 疫苗<sup>[5]</sup>, 免疫效果优于经变性处理的 VLP 和热灭活的 EV71 病毒, 对新生小鼠保护效果更好, 产生的中和抗体滴度更高<sup>[6]</sup>, 表明保持病毒的空间结构对提高疫苗的免疫效力具有至关重要的作用, 但其纯化和收率是研制的瓶颈。

**2.3 DNA 疫苗** 构建 pVAX1 重组 VP1 的 DNA 疫苗免疫小鼠, 第一针即可诱导产生抗 - VP1 抗体, 抗体在体外 Vero 细胞上具有中和 EV71 的作用, 但第二针出现抗体水平下降<sup>[7]</sup>。与灭活疫苗和 VP1 亚单位疫苗相比 DNA 疫苗的免疫效果稍差<sup>[3]</sup>, 应该在提高 DNA 疫苗的体内表达水平和疫苗免疫原性方面进行更多尝试。

**2.4 多肽疫苗** VP1 蛋白的 SP55 (163-177) 和 SP70 (208-222) 多肽与全病毒免疫小鼠可产生同样滴度特异的 IgG 抗体, 且在细胞培养中表现中和活性<sup>[2]</sup>, 进一步的研究表明<sup>[8]</sup>, 来自 B4 亚型 SP70 诱生的抗 - SP70 抗血清 1:32 滴度被动免疫 1 日龄新生小鼠, 可保护 1000TCID<sub>50</sub> 致死剂量同亚型和不同亚型病毒 (B2、B5、C2、C4) 的攻击, 保护率为 70% 以上, 但低于全病毒免疫小鼠产生的抗 EV71 抗血清的保护水平和保护率。1:16 和 1:8 滴度的抗

SP70 抗血清的保护率分别下降至 50% 和 20%。多肽诱导产生的主要是针对 B 细胞表位的 Th2 类免疫应答, 如联合新型佐剂, 或增加 T 细胞表位可能会更有发展前景。

**2.5 减毒活疫苗** 将脊髓灰质炎病毒 Sabin 疫苗株的温度敏感突变位点引入 EV71 B1Cr 株基因组, 构建的减毒株感染猕猴后仅出现轻度的神经系统症状<sup>[9]</sup>。其后研究显示, EV71 (S1-3') 接种的猕猴血清对 EV71 不同基因型具有广谱的中和作用<sup>[10]</sup>, 对同 A 基因型病毒的中和活性最高, 对 C2 亚型最低。在转基因鼠模型的研究同样标明了引入 Sabin 的减毒疫苗的基因变异可以降低毒力<sup>[11]</sup>, 但减毒效果仍需进行深入研究。

## 3 抗原性、免疫性

研究认为 VP1 区域是为 EV71 病毒的主要保护性中和位点区域<sup>[3,6]</sup>, 为 EV71 病毒的分型<sup>[12,13]</sup>, 重组和 DNA 疫苗的设计以及诊断试剂主要关注的区域<sup>[3,5,7,8,14,15]</sup>。除有研究应用覆盖 VP1 区域的 95 条合成多肽, 免疫小鼠获得血清, 得到具有中和效果的 SP55 和 SP70 多肽<sup>[2,8]</sup>, SP31-SP33 (91-111) 为 EV71 病毒特异性多肽<sup>[15]</sup> 等研究外, 目前尚无 VP1 以及 VP2/VP3 区域体液免疫抗原谱的研究报道, 而 VP2 和 VP3 作为病毒的表面抗原在诱导免疫应答中的作用也不容忽视; 在细胞免疫位点方面, 有研究首先利用 ProPred 运算模型预测了 VP1 的 3 个可能的 CD4<sup>+</sup> T 细胞表位, 经过试验证实 145-159 为 CD4<sup>+</sup> T 细胞表位<sup>[16]</sup>。应开展对不同种类 EV71 疫苗诱导动物单核淋巴细胞 (MNC) 和 CD8 细胞的研究, 探讨 EV71 结构蛋白不同区段的抗原性和免疫原性, 为疫苗的研发提供基础。

## 4 动物模型

**新生小鼠模型:** 用 1000TCID<sub>50</sub> 剂量腹腔注射 1 日龄新生小鼠, 感染后 11 天内小鼠死亡, 攻击 4 日龄小鼠感染后 16 天死亡, 攻击 7 和 10 日龄小鼠, 在感染后 21 天的存活率为 60% 和 90%, 攻击 14 日龄小鼠, 观察期内未见死亡<sup>[8]</sup>。可见新生小鼠模型, 用于疫苗效力评价的时间在 7 日内最为显著, 时间较短。利用新生小鼠可感染 EV71 致死, 通过接种疫苗之后受孕的方式, 使新生小鼠获得保护性母传抗体, 再进行病毒攻击, 可作为评价疫苗的保护效果一种方式, 是否可类推尚需进一步研究, 国内已有一家单位正采用该方法进行评价。有研究经腹腔攻毒, 然后从脑组织分离 1 代病毒, 经过 4 次反复传代的病毒 MP4 具有更强的毒力<sup>[17]</sup>, 经口服途径感染

小鼠可以模仿自然感染过程, 早期感染小鼠出现皮疹, 晚期出现后肢瘫痪等神经系统症状<sup>[18]</sup>。

**转基因鼠模型:** 日本学者研究<sup>[11]</sup>建立的非肥胖型糖尿病 重度联合免疫缺陷转基因鼠 (NOD/SCID)模型用来评价减毒毒株的毒力, 因其抗-EV71体产生缺陷, 可将小鼠的感染时间延长至1月以上, 而且具有更广泛的组织特异性, 可用来研究PV1(Sabin)的减毒决定因素在EV71病毒的协同减毒作用。VP1 G145E点突变是NOD/SCID小鼠适应必需的。

**猕猴:** 可通过皮下或脊髓接种的方式感染EV71病毒并出现典型的神经系统症状, 用于安评和保护效果验证, 但应用受限, 适应于毒种研究<sup>[9, 10]</sup>。

### 5 展望

由于EV71病毒的病原学、流行病学、致病机制和免疫机制等基础研究较为薄弱, 且缺乏可靠的动物模型, 长期以来EV71疫苗的研制进展缓慢。2008年我国将FMHD列入丙类传染病管理后, 疫苗的研制得到了国家和研发部门的重视, 多家单位在加速研制疫苗, 其中灭活疫苗可望几年内进入临床。在疫苗研发中, 应重点考虑以下几点:

(1) 加强分子流行病学和血清流行病学的调查和疾病的监测, 明确我国流行的毒株和转化趋势, 阐明不同毒株间及与CA16等肠道病毒的交叉保护反应, 获得高免疫原性、且遗传稳定性好的疫苗生产株;

(2) 按新药申报的相关规范进行毒种、细胞3级种子库建立和检定;

(3) 建立经验证的疫苗制备工艺, 在疫苗生产工艺的各个环节和步骤中的产品均应建立相应的监控标准, 并应制备参考品保证产品的质量稳定性;

(4) 建立EV71疫苗的病毒鉴别、效力检验等项目的检验方法和标准, 并提供验证数据;

(5) 疫苗的生产过程中, 不应添加抗生素和防腐剂。

### 参考文献

- 1 Wu TC, Wang YF, Lee YP, et al. Immunity to avirulent enterovirus 71 and coxsackievirus A16 virus protects against enterovirus 71 infection in mice. *J Virol* 2007, 81: 10310
- 2 Foo DG, Alonso S, Phoon MC, et al. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of Enterovirus 71 using synthetic peptides. *Virus Res* 2007, 125: 61
- 3 Wu CN, Lin YC, Fann C, et al. Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with sub-

- unit VP1 vaccines and inactivated virus. *Vaccine*, 2001, 20: 895
- 4 Liu CC, Lian WC, Butler M, et al. High immunogenic enterovirus 71 strain and its production using serum-free microcarrier Vero cell culture. *Vaccine*, 2007, 25: 19
- 5 Chung YC, Huang JH, Lai CW, et al. Expression, purification and characterization of enterovirus-71 virus-like particles. *World J Gastroenterol*, 2006, 12: 921
- 6 Chung YC, Ho MS, Wu JC, et al. Immunization with virus-like particles of enterovirus 71 elicits potent immune responses and protects mice against lethal challenge. *Vaccine*, 2008, 26: 1855
- 7 Tung WS, Bakar SA, Sekawi Z, et al. DNA vaccine constructs against enterovirus 71 elicit immune response in mice. *Genet Vaccines Ther* 2007, 5: 6
- 8 Foo DG, Alonso S, Chow VT, et al. Passive protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by neutralizing antibodies elicited by a synthetic peptide. *Microbes Infect* 2007, 9: 1299
- 9 Arita M, Shimizu H, Nagata N, et al. Temperature-sensitive mutants of enterovirus 71 show attenuation in cynomolgus monkeys. *J Gen Virol*, 2005, 86: 1391
- 10 Arita M, Nagata N, Iwata N, et al. An attenuated strain of enterovirus 71 belonging to genotype a showed a broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in cynomolgus monkeys. *J Virol* 2007, 81: 9386
- 11 Arita M, Amiy Y, Wakita T, et al. Cooperative effect of the attenuation determinants derived from poliovirus sabin 1 strain is essential for attenuation of enterovirus 71 in the NOD/SCID mouse infection model. *J Virol*, 2008, 82: 1787
- 12 Brown BA, Oberste MS, Alexander JP Jr, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol*, 1999, 73: 9969
- 13 Bible JM, Iturriza-Gomara M, Megson R, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 in the United Kingdom from 1998 to 2006. *J Clin Microbiol*, 2008, 46: 3192
- 14 Shih SR, Li YS, Chiou CC, et al. Expression of capsid [correction of capsid] protein VP1 for use as antigen for the diagnosis of enterovirus 71 infection. *J Mol Virol* 2000, 61: 228
- 15 Foo DG, Ang RX, Alonso S, et al. Identification of immunodominant VP1 linear epitope of enterovirus 71 (EV71) using synthetic peptides for detecting human anti-EV71 IgG antibodies in Western blots. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14: 286
- 16 Foo DG, Macary PA, Alonso S, Poh CL. Identification of human CD4 T-cell epitopes on the VP1 capsid protein of enterovirus 71. *Viral Immunol* 2008 Jun; 21(2): 215
- 17 Wang YF, Chou CT, Lei HY, et al. A mouse-adapted enterovirus 71 strain causes neurological disease in mice after oral infection. *J Virol* 2004, 78: 7916
- 18 Chen YC, Yu CK, Wang YF, et al. A murine oral enterovirus 71 infection model with central nervous system involvement. *J Gen Virol* 2004, 85: 69

(本文于2009年3月10日收到)