

登革重組次單位疫苗的發展與挑戰

江貞儀¹ 陳信偉^{1,2}

¹國家衛生研究院 感染症與疫苗研究所

²中國醫藥大學 免疫學研究所

前 言

登革病毒的威脅，涵蓋整個熱帶與亞熱帶區域，但是目前並沒有對抗登革病毒感染的疫苗可供使用。現在已有一些登革候選疫苗正在進行臨床試驗，本文主要針對登革次單位疫苗之開發與所面臨之問題加以說明。

簡 介

登革病毒 (Dengue virus) 屬於黃病毒科 (Flaviviridae) 黃病毒屬 (Flavivirus)，在血清學分類上可分為四種血清型 (登革病毒 -1 到 -4) [1]。登革病毒主要是靠埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 或白線斑蚊 (*Aedes albopictus*) 傳播，感染登革病毒可能無明顯症狀、或引起輕微發燒到嚴重的登革出血熱 (Dengue hemorrhagic fever, DHF) 或登革休克症候群 (Dengue shock syndrome, DSS) [2,3]。隨著旅遊的盛

行、交通便利與環境氣候變遷的影響，病媒蚊快速散播，全球有超過 100 多個國家 (20 億以上人口) 會受登革病毒感染威脅。據估計，全球每年約有 5,000 萬人以上被感染，其中 2 百萬多人會出現嚴重性的登革出血熱或登革休克症候群及 2 萬人死亡 [4,5]。接種疫苗被認為是對抗感染性疾病威脅有效且具經濟效益的方法之一，然而，從 1940 年代開始，投入許多的資源與極大的努力，但截至目前為止，並沒有有效的藥物或疫苗被核可用來對抗登革病毒的感染 [6-8]。

許多先進生物技術已被應用到登革疫苗的研發，而這些技術所發展的疫苗目前已有一些已經在臨床試驗階段。其中包括有減毒活疫苗、DNA 疫苗與重組次單位疫苗等 (表一) [6-9]，而利用不同方法所發展的登革疫苗各有其優缺點。減毒活疫苗通常可產生強免疫力且持久反應，不過依舊存在致病型病毒株恢復與其他安全之

表一 主要在臨床試驗的登革候選疫苗

疫苗型態	候選疫苗	策略	臨床試驗 ^a
次單位疫苗	DEN-80E	在昆蟲細胞表現重組膜套蛋白[14]。	第一期
減毒活疫苗	ChimeriVax	黃熱病毒 17D 疫苗株骨幹，將 prM 及 E 基因分別置換成四種血清型登革病毒所產生的嵌合新病毒株[8]。	第三期
	DENVax	以 DEN-2 PDK-53 為骨幹，將 prM 及 E 基因分別置換成其他三種血清型登革病毒[26]。 以特定突變或去除一段基因為骨幹組合之減毒疫苗株 [27]。	第二期 第一期
DNA 疫苗	DIME	DNA 疫苗包含 prM 與 E 基因[9]。	第一期

^a參考臨床試驗網頁 <http://clinicaltrials.gov/>

考量，且同時施打四型減毒病毒其抗體的產生時間速度不同，並會發生互相競爭干擾現象，所以有些臨床研究已暫緩。目前進展最快的減毒活疫苗是已進入第三期臨床試驗的 ChimeriVax [6,10-12]，此疫苗是利用黃熱病毒 17D 疫苗株的骨幹，將黃熱病毒 17D 疫苗株的 prM 及 E 基因分別置換成四種血清型登革病毒所產生的嵌合新病毒株，其毒性會降低，並可引發免疫反應，安全性較高。但 ChimeriVax 的挑戰在於四價疫苗需施打 3 劑，且施打疫苗期長，可能有無法於既定時間內施打問題。若施打不完整，或在較長的施打期間具有不完整免疫保護力，可能讓接種者面臨疾病加劇的風險。相反地，登革重組次單位疫苗的優點為它們是由已知分子成份組成，且無需接觸活病毒，安全性相對於其他疫苗為高。但是重組次單位疫苗通常需要輔以佐劑，以增強其免疫反應[13]。以下本文將針對重

組次單位疫苗的發展及其所面臨的問題進行探討。

膜套蛋白次單位登革疫苗

登革病毒為單股 RNA 病毒，有三個結構蛋白，分別是核心蛋白 (core protein)、膜蛋白 (membrane protein, M) 及膜套蛋白 (envelope protein, E)，參與病毒顆粒的形成；另外還有七個非結構性蛋白，分別為 NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 及 NS5。在次單位疫苗用的標的物選擇上，不容置疑的，膜套蛋白是廣泛被應用到登革重組次單位疫苗的研發，因為它是登革病毒與細胞上接受器 (receptor) 結合的重要位置。利用膜套蛋白來發展登革次單位疫苗，將有機會引發中和性抗體能有效阻礙病毒的感染。

進展最快的登革重組次單位疫苗是由 Hawaii Biotech, Inc. (已被 Merck 併購) 研發，利用昆蟲細胞

(*Drosophila* S2) 表現全長之膜蛋白與 80% 膜套蛋白 (80E, 登革病毒 -1, 2, 4 從第 395 胺基酸, 登革病毒 -3 從第 393 胺基酸剔除的膜套蛋白)。在昆蟲細胞製造膜套蛋白會分泌到培養液中, 四種血清型的 80E 其表現量可達到每公升 10~50 毫克, 最後可分別純化得到四種血清型的 80E 作為候選疫苗。由於一般重組蛋白通常免疫原性 (Immunogenicity) 低, 需要配合佐劑才能誘發較強之免疫反應。所以在臨床前小鼠動物試驗中, 80E 候選疫苗分別混合鋁鹽、MF59、MF75+ThrMDP、Ribi 及 ISCOMATRIX® 佐劑進行免疫。在所測試的佐劑中, ISCOMATRIX® 佐劑可以誘發最強的中和性抗體反應。因為鋁鹽是目前臨床上最被廣泛使用之佐劑, 較無安全之疑慮, 因此以登革病毒 -1-80E 輔以鋁鹽佐劑的單價疫苗已經完成第一期的臨床試驗, 初步結果顯示登革病毒 -1-80E 輔以鋁鹽佐劑目前並無重大安全問題, 且可誘發中和性抗體反應, 而利用 ISCOMATRIX® 為佐劑的四價登革次單位疫苗臨床試驗則正在進行中 [14]。

膜套蛋白根據其構造可分為三個區塊 (domain), 其中區塊三 (domain III) 是病毒與細胞受器重要接合位置, 同時也是許多中和性抗體辨識之區域, 所以膜套蛋白區塊三是登革次單位疫苗的潛在標的之一 [15]。目前也有許多研究分別利用大腸桿菌或酵

母菌表達系統, 生產重組膜套蛋白區塊三作為登革後選疫苗, 但這些研究都還在臨床前實驗階段。由於有效的登革疫苗必須能同時對抗四種血清型的登革病毒, 所以我們比對四種血清型登革病毒膜套蛋白區塊三的胺基酸序列, 開發出 consensus 膜套蛋白區塊三 (consensus envelope protein domain III)。以 consensus 膜套蛋白區塊三混和鋁鹽免疫小鼠, 可同時誘發中和性抗體, 對抗四種血清型登革病毒。此結果顯示 consensus 膜套蛋白區塊三有機會成為單一重組蛋白的四價登革疫苗 [16]。同時為克服重組次單位疫苗不容易誘發免疫反應, 我們建立一個脂質化蛋白表現技術, 除可大量表現脂質化重組蛋白, 並可將非脂質化蛋白以脂質化蛋白形式表現 [17]。實驗證實脂質化蛋白可藉由 toll-like receptor 2 活化抗原呈獻細胞, 增強免疫反應 [18]。小鼠免疫一劑的脂質化 consensus 膜套蛋白區塊三, 就可以誘發中和性抗體, 且此中和性抗體具有免疫記憶性 [19]。未來這些重組膜套蛋白區塊三或是脂質化的候選疫苗仍須進一步經臨床試驗, 證明其安全性與效力。

NS1 次單位登革疫苗

研發登革疫苗的另一個挑戰是抗體依賴增強效應 (antibody-dependent enhancement, ADE)。所謂抗體依賴增強效應是指當宿主體內存有非中和性

抗體或中和性抗體不足時，反而會增強登革病毒的感染。此一結果可能會使登革病毒感染者，引發更嚴重的疾病。相較於辨識結構性蛋白的抗體，辨識非結構性蛋白的抗體則無此顧慮。早期研究發現小鼠免疫 NS1 重組蛋白[20]或 DNA[21,22] 可以誘發保護性免疫力對抗登革病毒感染，或者給予抗 NS1 抗體也可以提供保護力。這些結果證明 NS1 是一個潛在登革疫苗標的。但是在其他研究中發現抗 NS1 抗體會與血小板或內皮細胞 (endothelial cells) 交叉反應 (cross reaction)，促使細胞凋亡 (apoptosis)，增加血管洩漏，此現象可能是造成登革出血熱的機制之一[23]。最近的研究亦證實 NS1 至少有兩個表位 (epitope)，會誘發自體抗體[24,25]。所以如何避免 NS1 引起自體抗體，但仍保留引發保護性免疫力，是未來發展 NS1 次單位疫苗無可避免的問題。

結論與展望

理想的登革疫苗必須是安全、長效性、穩定、單一施打劑量且能同時對抗四型登革病毒的感染。由於缺乏適當的小鼠動物模式，使得登革病毒感染所引發嚴重的登革出血熱或登革休克症候群之病理機制並不完全清楚，因此也增加登革疫苗開發的困難度。雖然相較於減毒活疫苗，生產登革次單位疫苗不需要培養大量活病毒以及四型間不易互相干擾免疫反應等

優勢。同時，次單位疫苗可藉由疫苗標的的篩選，去除引發有害宿主免疫反應的病毒抗原，只選取誘發保護性免疫力的抗原作為候選疫苗。但是次單位疫苗必須要能保有適當的構型 (conformation) 並配合佐劑，增強免疫反應，則是另一挑戰。所以未來若能配合適當的佐劑或是利用脂質化重組蛋白技術，將有機會開發出核可的登革次單位疫苗。

參考文獻

1. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, et al: Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 1990;44:649-88.
2. Gubler DJ, Clark GG: Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1995;1:55-7.
3. Halstead SB: Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988;239:476-81.
4. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, et al: Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:S7-16.
5. Halstead SB: Dengue. *Lancet* 2007;370:1644-52.
6. Collier BA, Clements DE: Dengue vaccines: progress and challenges. *Curr Opin Immunol* 2011;23:391-8.
7. Schmitz J, Roehrig J, Barrett A, et al: Next generation dengue vaccines: a review of candidates in preclinical development. *Vaccine* 2011;29:7276-84.
8. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, et al: Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:518-28.
9. Beckett CG, Tjaden J, Burgess T, et al: Evaluation of a prototype dengue-1 DNA vaccine in a Phase 1 clinical trial. *Vaccine* 2011;29:960-8.
10. Guirakhoo F, Pugachev K, Zhang Z, et al: Safety and efficacy of chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine formulations in nonhuman primates. *J Virol* 2004;78:4761-75.

11. Morrison D, Legg TJ, Billings CW, et al: A novel tetravalent dengue vaccine is well tolerated and immunogenic against all 4 serotypes in flavivirus-naïve adults. *J Infect Dis* 2010;201:370-7.
12. Guy B, Barrere B, Malinowski C, et al: From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* 2011;29:7229-41.
13. Collier BA, Clements DE, Bett AJ, et al: The development of recombinant subunit envelope-based vaccines to protect against dengue virus induced disease. *Vaccine* 2011;29:7267-75.
14. Clements DE, Collier BA, Lieberman MM, et al: Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. *Vaccine* 2010;28:2705-15.
15. Guzman MG, Hermida L, Bernardo L, et al: Domain III of the envelope protein as a dengue vaccine target. *Expert Rev Vaccines* 2010;9:137-47.
16. Leng CH, Liu SJ, Tsai JP, et al: A novel dengue vaccine candidate that induces cross-neutralizing antibodies and memory immunity. *Microbes Infect* 2009;11:288-95.
17. Chen HW, Liu SJ, Liu HH, et al: A novel technology for the production of a heterologous lipoprotein immunogen in high yield has implications for the field of vaccine design. *Vaccine* 2009;27:1400-9.
18. Leng CH, Chen HW, Chang LS, et al: A recombinant lipoprotein containing an unsaturated fatty acid activates NF-kappaB through the TLR2 signaling pathway and induces a differential gene profile from a synthetic lipopeptide. *Mol Immunol* 2010;47:2015-21.
19. Chiang CY, Liu SJ, Tsai JP, et al: A novel single-dose dengue subunit vaccine induces memory immune responses. *PLoS One* 2011;6:e23319.
20. Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh EE: Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol* 1987;68 (Pt 3):853-7.
21. Costa SM, Paes MV, Barreto DF, et al: Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused to the tissue plasminogen activator signal sequence. *Vaccine* 2006;24:195-205.
22. Wu SF, Liao CL, Lin YL, et al: Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. *Vaccine* 2003;21:3919-29.
23. Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS (2006) Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol* 19:127-32.
24. Chen MC, Lin CF, Lei HY, et al: Deletion of the C-terminal region of dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) abolishes anti-NS1-mediated platelet dysfunction and bleeding tendency. *J Immunol* 2009;183:1797-803.
25. Liu IJ, Chiu CY, Chen YC, et al: Molecular mimicry of human endothelial cell antigen by autoantibodies to nonstructural protein 1 of dengue virus. *J Biol Chem* 2011;286:9726-36.
26. Osorio JE, Huang CY, Kinney RM, et al: Development of DENVax: a chimeric dengue-2 PDK-53-based tetravalent vaccine for protection against dengue fever. *Vaccine* 2011;29:7251-60.
27. Durbin AP, Kirkpatrick BD, Pierce KK, et al: Development and clinical evaluation of multiple investigational monovalent DENV vaccines to identify components for inclusion in a live attenuated tetravalent DENV vaccine. *Vaccine* 2011;29:7242-50.