

脂蛋白在登革疫苗的應用與發展

江貞儀¹ 冷治湘^{1,2} 劉士任^{1,2} 莊再成^{1,2} 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

摘 要

理想的登革疫苗必須具有安全性、長效性、穩定性和單一施打劑量，且能同時對抗四型登革病毒的感染。首先，在病毒抗原篩選，須去除會引發有害宿主免疫反應的部份，及選取誘發保護性免疫力的抗原作為候選疫苗。另外，抗原或配合佐劑後的構型 (immuno composition) 是否可增強免疫反應，也是發展疫苗所考量挑戰。本篇介紹登革疫苗開發上，利用脂質化重組蛋白技術，開發出有潛力的登革疫苗，希望未來可應用於預防登革病毒的感染。

簡 介

登革病毒 (Dengue virus) 屬於黃熱病毒科 (Flaviviridae) 黃熱病毒屬 (Flavivirus)，在血清學分類上可分為四種血清型 (登革病毒-1 到 -4) [1]。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]。從 1940 年代便開始投入大量資源進行許多研究，目前仍然沒有有效的藥物或疫苗被核可用來對抗登革病毒的感染[4-6]。雖然應用許多先進生物技術於登革疫苗的研發，目前有一些已經在臨床試驗階段，其中包括有活的嵌合病毒疫苗 (live chimeric virus vaccines)、減毒活疫苗、DNA 疫苗與重組次單位疫苗等[4-7]。目前進展最快的登革疫苗為活的嵌合病毒疫苗，此疫苗是以 17D 黃熱病毒疫苗株 (yellow fever vaccine strain) 為骨架，放入前驅膜蛋白 (precursor membrane protein, prM) 及分別置換成四種血清型之膜套蛋白 (envelope protein, E) 基因。在泰國進行的第 2b 期臨床試驗，結果顯示此疫苗整體有效性約只有 30.2%，且對第二血清型的登革病

毒並沒有保護效果，而第二血清型登革病毒正是臨床試驗期間當地主要流行之型別[8]，這樣的結果並不令人滿意。除此之外，此疫苗需要施打三次，若無法於特定時間內進行施打，可能無法得到預期之效果。因此，開發新登革病毒疫苗技術，仍刻不容緩。

相對地，登革重組次單位(subunit)或合成勝?疫苗，無需接觸活病毒，安全性相對於其他疫苗為高。但是，所引發的免疫性不高，需藉由適當的佐劑或形成類病毒顆粒才能引發較佳的免疫反應[9]。鋁鹽是目前臨床上被廣泛應用於疫苗的佐劑，但與登革免疫原結合後的免疫效果並不好[10,11]，所以運用新佐劑是登革次單位疫苗發展的一個重要課題。

脂化蛋白結合免疫原與免疫 激活因子增進次單位疫苗效力

為了克服次單位疫苗低免疫生成性的主要缺點，因此結合免疫原與免疫激活因子應可誘發健全之免疫反應。先前研究發現，細菌的外膜脂蛋白可誘發先天的(innate)及被動性(adaptive)免疫反應機制，以達到免疫保護特性[12,13]，例如利用螺旋菌(*Borrelia burgdorferi*)外膜脂蛋白，OspA，發展萊姆病(Lyme disease)的疫苗[14,15]及利用B群奈瑟氏腦膜炎雙球菌(*Neisseria meningitidis* serogroup B) LP2086脂蛋白開發疫苗[16,17]。可

見脂化蛋白可有效產生免疫反應，但重組脂化蛋白無法大量表現，所以將脂化蛋白應用於次單位疫苗仍有瓶頸存在。研究發現利用大腸桿菌 BL21 (DE3) 的改良株 C43 (DE3)，可大量表現脂化蛋白，同時將B群奈瑟氏腦膜炎雙球菌脂化蛋白 Ag473 之基因片段與非脂化蛋白結合，也可將非脂化蛋白轉變成脂化蛋白[18]。此一技術不但突破產量限制，更可以將非脂化免疫原轉變成脂化免疫原，顯著改善次單位疫苗的缺點並增加此技術之應用性。

重組脂化登革病毒膜套 第三區域蛋白有效誘發 免疫反應對抗登革病毒

登革病毒為單股 RNA 病毒，參與病毒顆粒形成的有三個結構蛋白，分別是核心蛋白(core protein)、膜蛋白(membrane protein, M)及膜套蛋白；還有七個非結構性蛋白，分別為 NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 及 NS5。其中膜套第三區域蛋白(envelope domain III)是次單位疫苗最佳的標的物之一，因為它是登革病毒與細胞上接受器(receptor)結合的重要位置，且含有許多中和性抗體表位(epitope)。利用膜套第三區域蛋白發展登革次單位疫苗，其免疫性不高，若將膜套第三區域蛋白表達成脂化蛋白，將有機會獲得安全且又可引發有效免疫反應的疫苗，能有效阻礙病毒

的感染。

實驗證實脂化膜套第三區域蛋白可藉由類 Toll 蛋白接受器-2 (Toll-like receptor-2) [19] 刺激抗原呈現細胞增加 MHC-II、CD40、CD80 及 CD86 等分子之表現，以及促進細胞激素之分泌，而沒有脂化膜套第三區域蛋白則無此效應[20-22]。因此在不外加佐劑的情況下，以脂化膜套第三區域蛋白免疫小鼠即可以誘發 T 細胞反應，而沒有脂化膜套第三區域蛋白則無法有效引發免疫反應[20,21]。除此之外，脂化膜套第三區域蛋白所誘發抗體效價、親和力與中和病毒效價皆明顯比沒有脂化膜套第三區域蛋白來得高，且脂化膜套第三區域蛋白可引發持久性之中和抗體反應[20,22,23]。免疫後小鼠經過攻毒試驗，以脂化膜套第三區域蛋白免疫小鼠可有效抑制病毒在血液中的量，而沒有脂化膜套第三區域蛋白免疫之小鼠則無此效應[23]。這些結果顯示脂化膜套第三區域蛋白是有潛力的登革候選疫苗，值得進一步進行臨床研究。

登革病毒與宿主之間複雜的交互作用，引發致病性免疫反應是開發登革疫苗的另一個難題。研究顯示登革病毒感染會引發抗膜蛋白抗體，這些抗體通常不具有好的中和病毒能力，相反，會具有抗體依賴性增強作用 (antibody-dependent enhancement) 增加病毒感染[24,25]。另外在登革病毒膜套蛋白第二區域或非結構性蛋白-1 (NS-1) 也被證實會引發抗體可與宿主

抗原交互作用[26,27]。這些抗體與宿主抗原結合後，可誘發細胞凋亡效應與組織損害進而導致登革出血熱或登革休克症候群發生。重組脂化登革病毒膜套第三區蛋白所誘發之抗體可減低抗體依賴性增強作用[28]，同時不包含其他登革病毒抗原，可避免引發有害之免疫反應發生。因此，重組脂化登革病毒膜套第三區蛋白是一安全性高的登革候選疫苗。

重組脂蛋白具有內生性佐劑，可經由 TLR-2 的訊號傳遞過程活化抗原呈現細胞，增強對免疫原的免疫反應。未來可進一步結合四種血清型的重組脂化膜套第三區域蛋白成為四價 (tertravalent) 登革候選疫苗，進行登革疫苗開發。

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. Halstead SB: Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988;239:476-81.
3. Gubler DJ, Clark GG: Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1995;1:55-7.
4. Collier BA, Clements DE: Dengue vaccines: progress and challenges. *Curr Opin Immunol* 2011;23:391-8.
5. Schmitz J, Roehrig J, Barrett A, et al: Next generation dengue vaccines: a review of candidates in preclinical development. *Vaccine* 2011;29:7276-84.
6. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, et al: Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:518-28.
7. Beckett C, 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.
8. Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, et al: Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet*. 2012;380:1559-67.
 9. Pardoll DM: Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2002;2:227-38.
 10. Bernardo L, Pavon A, Hermida L, et al: The two component adjuvant IC31 (R) potentiates the protective immunity induced by a dengue 2 recombinant fusion protein in mice. *Vaccine* 2011;29:4256-63.
 11. Bernardo L, Izquierdo A, Alvarez M, et al: Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue 1 envelope protein in non-human primates. *Antiviral Res* 2008;80:194-9.
 12. Parker TS, Levine DM, Chang JC, et al: Reconstituted high-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolysaccharides in human whole blood. *Infect Immun* 1995;63:253-8.
 13. Infante-Duarte C, Kamradt T: Lipopeptides of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins induce Th1 phenotype development in alphabeta T-cell receptor transgenic mice. *Infect Immun* 1997;65:4094-9.
 14. Philipp MT, Lobet Y, Bohm RP, et al: The outer surface protein A (OspA) vaccine against Lyme disease: efficacy in the rhesus monkey. *Vaccine* 1997;15:1872-87.
 15. Fikrig E, Barthold SW, Kantor FS, et al: Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA. *Science* 1990;250:553-6.
 16. Fletcher LD, Bernfield L, Barniak V, et al: Vaccine potential of the *Neisseria meningitidis* 2086 lipoprotein. *Infect Immun* 2004;72:2088-100.
 17. Nissen MD, HS Marshall, PC Richmond, et al: A randomized, controlled, phase 1/2 trial of a *Neisseria meningitidis* serogroup B bivalent rLP2086 vaccine in healthy children and adolescents. *Ped Infect Dis J* 2013;32:364-71.
 18. Hsu CA, Lin WR, Li JC, et al: Immunoproteomic identification of the hypothetical protein NMB1468 as a novel lipoprotein ubiquitous in *Neisseria meningitidis* with vaccine potential. *Proteomics* 2008;8:2115-25.
 19. 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.
 20. Chiang CY, Liu SJ, Tsai JP, et al: A novel single-dose dengue subunit vaccine induces memory immune responses. *PloS one* 2011;6:e23319.
 21. Chiang CY, Huang MH, Pan CH, et al: Induction of robust immunity by the emulsification of recombinant lipidated dengue-1 envelope protein domain III. *Microbes Infect* 2013;15:719-28.
 22. 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.
 23. Chiang CY, Hsieh CH, Chen MY, et al: Recombinant lipidated dengue-4 envelope protein domain III elicits protective immunity. *Vaccine* 2014;32:1346-53.
 24. Mady BJ, Erbe DV, Kurane I, et al: Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection mediated by bispecific antibodies against cell surface molecules other than Fc gamma receptors. *J Immunol* 1991;147:3139-44.
 25. Huang KJ, YC Yang, YS Lin, et al: The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol* 2006;176:2825-32.
 26. Chuang YC, Lei HY, Lin YS, et al: Dengue virus-induced autoantibodies bind to plasminogen and enhance its activation. *J Immunol* 2011;187:6483-90.
 27. Lin C, Lei H, Shiau A, et al: Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol* 2002;169:657-64.
 28. Chiang CY, Pan CH, Hsieh CH, et al: Lipidated dengue-2 envelope protein domain III independently stimulates long-lasting neutralizing antibodies and reduces the risk of antibody-dependent enhancement. *PLoS One* 2013;7:e2432.