

[文章编号] 1007-385X(2005)01-0080-04

人乳头状瘤病毒(HPV)疫苗的研究进展

王小兵¹综述; 张伟¹, 张叔人²审阅(1. 中国协和医科大学 中国医学科学院 肿瘤研究所 生物检测中心, 北京 100021; 2. 中国协和医科大学 中国医学科学院 肿瘤研究所 免疫学研究室, 北京 100021)

[摘要] 人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染是宫颈癌的主要病因。清除 HPV 感染和阻断由 HPV 感染所引发的宫颈癌前病变的进展尚缺乏理想的方法。目前,国际上已有 20 多种 HPV 相关疫苗已进入动物和临床试验阶段,主要分为预防性疫苗和治疗性疫苗,主要制剂形式是蛋白质、核酸。动物实验和临床试验结果显示 HPV 疫苗将在预防 HPV 感染及治疗由感染所引起的相关疾病方面有重要作用。

[关键词] 人乳头状瘤病毒; 疫苗; 宫颈癌

[中图分类号] R730.7 **[文献标识码]** A

人乳头状病毒是一种无包膜的 DNA 病毒,目前已发现 100 多种型别,主要感染生殖道黏膜和口腔、咽部上皮黏膜细胞等,是宫颈癌的主要病因,在我国妇女宫颈癌组织中 HPV 感染率大于 95%,其中高危型 HPV 如 16、18 型占 90% 以上,世界范围内每年有 40 万新发宫颈癌病例,20 万人死于该病^[1]。HPV 感染与宫颈上皮不典型增生及黏膜生殖道尖锐湿疣发病关系密切。因此,研制 HPV 疫苗对于预防和治疗由 HPV 感染引起的相关疾病具有重要价值。

1 HPV 疫苗的分型

1.1 HPV 预防性疫苗

可阻断 HPV 感染皮肤和黏膜,一般由病毒衣壳蛋白 L1 或 L1 + L2 组成,在细胞内可自我组装成空心病毒样颗粒(VLPs)^[2]。它具有与完整病毒相同的抗原空间表位,可激发机体的 CD4⁺ 淋巴细胞介导的体液免疫反应,刺激机体产生保护性中和抗体。预防型疫苗种类较少,主要以 HPV 病毒的结构蛋白质形式存在。

1.2 HPV 治疗性疫苗

可清除由 HPV 感染所引起的肿瘤残存病灶、宫颈不典型增生(CIN)及生殖器尖锐湿疣,阻断低危型病变向高危型及癌症的转变过程,主要分为蛋白质疫苗和基因疫苗。HPV 引发上皮细胞的转化并最终导致癌变主要由于 HPV 转化基因 E6、E7 造成,E6 可诱发 P53 的降解,E7 可抑制 Rb 的抑癌功能。实验证实,在宫颈上皮细胞发生癌变的整个过程中必须有 E6、E7 基因的持续表达。故 E6、E7 已成为 HPV 治疗性疫苗研究焦点。另外,由于 HPV 基因组已整合于基底层细胞染色体中,病毒复制需要 E1、E2 的表达,因此国际上有用 E1、E2 来设计治疗性疫苗研究的报道。

1.2.1 HPV 治疗性蛋白疫苗

该疫苗的抗原部分一般采用 E6 或(和)E7,E7 免疫原性优于 E6,E6/E7 融合后可提高免疫效果,在使用或不使用佐剂的情况下均可产生细胞免疫反应。由于 E6、E7 蛋白

本身的免疫原性较弱以及具有潜在的致癌性,而且野生型的 E6、E7 不易被降解,不利于抗原的递呈,因此 HPV E6、E7 疫苗多经修改或融合其它蛋白以提高其免疫效果。蛋白质疫苗又分为多肽疫苗、融合蛋白疫苗、嵌合疫苗等。

多肽疫苗: E6、E7 与人 HLA 型相配的多肽片段,使用佐剂诱导机体产生 CTL 反应来治疗 HPV 感染。如 E7 肽段疫苗。

嵌合蛋白疫苗: HPV 晚期蛋白 L1 和 L2 的末端与早期蛋白相融合,以激发对早期蛋白的免疫。如 L1-E7、L2E7(TA-GW)、L2E7E6(TA-CIN)等。

融合蛋白疫苗: 由 HPV 早期蛋白相互融合或早期蛋白融合有其它蛋白,能更好的激发对机体免疫系统的免疫功能。如 E6/E7、HSP/E7、PD-E7 融合蛋白等。

1.2.2 HPV 治疗性基因疫苗

基因疫苗可分为 DNA 和 RNA 2 种。采用基因载体携带 E6 或 E7 基因进入抗原呈递细胞,并持续表达抗原蛋白分子,免疫系统识别抗原后被激活清除感染 HPV 的细胞。基因疫苗可持续表达抗原,并易于构建和改造,具有易于制成多价疫苗,不需要佐剂,热稳定性好,成本低廉等特点,但同时存在免疫效果弱和重组复活等安全性问题。

基因疫苗一般分为 DNA 疫苗和 RNA 疫苗。DNA 疫苗常采用病毒载体或其他载体携带 HPV 早期基序,如重组有 E7 的牛痘病毒疫苗、腺病毒疫苗、腺相关病毒疫苗,一些疫苗还混合有 APC 的表面受体的相应配体、化学激活剂等;还有学者将 DNA 疫苗中融合有可引导抗原至细胞内降解的序列、致细胞死亡的序列等。RNA 疫苗具有 RNA 复制子可自我复制^[3]。采用 α 病毒 SINrep5 作为复制子,融合有早期基因片段和其他基因片段,如单纯疱疹病毒外壳蛋白基因(VP22)、结核杆菌热休克蛋白基因(HSP70)和定位到内体、溶酶体的信号蛋白基因(LAMP-1)。RNA 疫苗常采用肌肉注射,疫苗 RNA 可在肌肉细胞中大量复制导致细胞裂解,大量的 RNA 被 APC 获得,或在肌肉细胞中翻译成蛋

白后分泌到细胞外被 APC 获得,通过 MHC I 途径激发抗 HPV 早期蛋白的细胞免疫。另外, RNA 疫苗还能激活 NK 细胞,增强免疫激活功能。

2 HPV 疫苗的临床试验结果

目前,已有二十多种疫苗处于动物实验和临床研究中。HPV 疫苗的临床试验报道为数不多,此类研究主要集中在发达国家。

2.1 预防性疫苗

有报道英国使用昆虫表达体系表达重组的 HPV16 L1 VLPs,分别在 2 种剂量下,用或不用佐剂,多次肌肉注射,经人体试验证实可激发机体产生抗原特异性的 IgG 抗体,最常见的副作用是注射区的疼痛感,但大多数受试者的疼痛温和而短暂,说明 VLPs 疫苗在安全性和有效性方面取得了进展。VLPs 作为预防性疫苗在美国和拉丁美洲已开展临床 III 期实验,但是由于 HPV 感染到患病的周期较长,实验获得的数据有限,计划在亚洲进行相应的 IV 期实验^[4]。专家预测 5 年内该产品可上市,可能为 VLPs 四价疫苗。另外,HPV6 型预防型疫苗 VLPs 在一项针对尖锐湿疣的临床试验中证实能起到一定的治疗作用^[5]。此外,也有部分预防型疫苗采用 DNA 疫苗,如 Merck 公司的痘病毒载体融合 L1 基因片段^[6]。

2.2 治疗性疫苗

治疗性疫苗较预防性疫苗种类要多,蛋白质型和基因型在临床试验中都获得了一定的治疗效果。

2.2.1 肽段疫苗

肽段疫苗最主要的代表为 E7 肽段疫苗,采用 HLA-A0201 结合肽,主要是 E7 蛋白第 11~20 和 86~93 氨基酸 2 段分子肽段,动物实验证明其能引发细胞毒性 T 淋巴细胞免疫反应(CTL),在一项针对宫颈和外阴重度不典型增生的 I 期临床实验中^[7],18 名受试者中有 3 名不典型增生消失,在可评价的 16 人中有 10 人检测到针对抗原的 CTL 反应,宫颈刮片有 12 人没有检测到 HPV DNA。另外,在芬兰曾进行 I、II 期临床试验治疗一些用常规方法无效的晚期宫颈癌患者,结果在 19 名治疗对象中没有发现严重的副作用,其中一名患者病情得以稳定,2 名患者肿瘤得以抑制^[8]。

临床试验证实多肽疫苗对癌前病变及宫颈癌有一定的治疗效果。多肽疫苗具有易于生产、价廉等优点,但多肽疫苗抗原性弱,一般采用结合佐剂的方法,但佐剂是临床副作用的一个重要原因,且目前被 FDA 批准的唯一佐剂是 Al(OH)₃,该佐剂能促进体液免疫,但对治疗起重要作用的细胞免疫无促进作用。目前已有公司致力于新型佐剂的研究,希望能突破肽段疫苗功能上的不足。多肽疫苗的另一问题是需要符合特定的 HLA 型,给应用带来一定局限性。

2.2.2 嵌合蛋白

嵌合蛋白的研究是目前治疗型疫苗的另一重要方面,

文献报道主要有 L1-E7, L2E7 (TA-GW), L2E7E6 (TA-CIN) 3 种。其中 L1-E7 疫苗有多家公司研制,有多种存在形式,如 MediGene 的 L1-E7 采用 L1 融合了 E7 N 端 60 个氨基酸的形式,动物实验表明能很好的激发针对 L1 的体液免疫和 E7 的细胞免疫,2000 年进入 I/II 临床试验阶段,受试者为 HPV16 阳性的 CIN 患者,临床结果尚未公布; L2E7^[9]为 HPV6 型 L2 羧基端缺失部分片段并结合完整 E7 片段,是 Cantab 公司产品,主要用于治疗尖锐湿疣,1996 年已完成 II a 期临床,实验对象为由 16 名复发和 11 新发的尖锐湿疣病例组成,结果 6 名完全清除,另 15 名患者继续接受治疗,有 13 名完全清除,并且都没有复发,临床实验后研究方向主要集中在佐剂的选择之中,但至今没有文献报导; L2E7E6^[10]是由 HPV16 型早期蛋白和晚期蛋白组成,用于治疗宫颈癌,动物实验显示其能有效的抑制肿瘤的形成,且接种 L2E7E6 后结合 TA-HPV 疫苗能取得更好的效果。在一项针对 40 例健康个体的临床 I 期试验中显示其具有激发细胞免疫的功能,目前一项针对女性外阴高度不典型增生的临床 II 期试验正在验证此疫苗与 DNA 疫苗 TA-HPV 的联合免疫效果。嵌合蛋白既可刺激机体产生体液免疫,起到预防作用,也能激发细胞免疫,起治疗作用,但是对于感染者来说,血清中经常存在抗晚期蛋白的抗体,这些抗体对嵌合蛋白的治疗可能具有抑制作用,这也是嵌合疫苗的主要缺陷目前对此类疫苗的进一步优化还没有报道。

2.2.3 融合蛋白

融合蛋白 E6/E7 的研究国内外进行较早,但治疗效果不理想并且表达水平较低,随着新的免疫佐剂或增强剂的出现,目前国内已有人研究 E6/E7 融合蛋白,且对其进行改造,消除早期蛋白的潜在致癌潜能,并实现高表达。动物实验结果理想,尚未进入临床阶段。

HSP65-E7^[11]是 HPV16 型 E7 蛋白与牛的分枝杆菌热休克蛋白 65(HSP65)融合而成,利用热休克蛋白可将抗原导入树突状细胞的特性,从而激活抗早期蛋白 E7 的细胞免疫。该疫苗由加拿大 STRESSGEN 公司研制,现已进行了大量的临床实验,针对不同的适应症,临床实验进度不同:肛门不典型增生已完成临床 III 期;尖锐湿疣已完成临床 II 期试验;复发性呼吸道乳头状瘤病(RRP)已完成临床 II 期试验;宫颈不典型增生已完成临床 II 期试验,宫颈癌已完成临床 II 期试验。临床结果表明该疫苗对由 HPV 引起的相关疾病确有明显的治疗作用,但具体数据不祥。此疫苗具有无 HLA 限制、CTL 反应无需 CD4⁺T 细胞诱导的特点,这对已扩散或 HIV 感染等免疫抑制患者具有优势。这种疫苗有望成为治疗 HPV 感染的疫苗。

2.2.4 基因疫苗

DNA 疫苗的临床研究较 RNA 疫苗成熟,大多进行到临床试验阶段。DNA 疫苗的主要问题是 HPV 基因整合后具有潜在危险,而且不具有内在的扩增能力,以及不能在体内扩散而影响其效用的发挥。RNA 疫苗不整合入基因组,并且不含有病毒结构基因,不能形成有活性的病毒,且被感染

的细胞将发生凋亡,故无致癌潜能,有利于人体的应用。其缺陷为注射部位有逐渐增强的坏死和炎症反应,并且活化的NK细胞和抗原特异性的T淋巴细胞可能会产生的自体免疫,最终损伤组织和器官。

DNA疫苗多使用病毒作为载体,如牛痘病毒、腺病毒和腺相关病毒,他们在对免疫系统的刺激上比单纯的E7基因疫苗有明显的优势。腺病毒作为载体并混合抗CD40双特异性抗体,可增强DCs对抗原基因的获得,用这种疫苗在小鼠实验中获得抗原特异性和CD8⁺T细胞依赖的免疫反应^[12]。

一种重组牛痘病毒疫苗TA-HPV,融合有HPV16、18型E6和E7基因,在欧洲已开展了临床II期试验^[13],临床实验结果表明TA-HPV是安全有效的,在患有宫颈癌的29名受试者中,接种一次就有4名患者产生了特异性的细胞毒性T淋巴细胞反应,8名患者有特异性的血清反应。在TA-HPV的另一项针对外阴和肛门上皮内不典型增生的临床II期试验^[14]中,12例试验对象治疗24周后,5例损伤直径缩小了50%,1例完全缓解,所有个体的抗体水平和T细胞反应性都有所提高。

基因疫苗在诱导免疫效应上还不理想。为进一步提高其免疫及保护效率,以下方面均有所研究:改善免疫途径和方式;选择优化免疫刺激序列及载体;表达嵌合抗原或多重抗原;共表达抗原与细胞因子或协同刺激分子,如LAMP-1, HSP70^[15-16]等。Chen等^[17]研究发现,利用结核分枝杆菌HSP70融合肿瘤抗原基因HPV E7构建基因疫苗,可显著增强抗原特异性的CTL反应和提高抗肿瘤效力。另外,在剂型方面的改变也有报道,如美国研发的一种基因疫苗药物ZYC101^[18],由可降解的生物大分子多聚体包裹质粒DNA形成,质粒DNA中表达抗原部分为编码HLA-A2限制性表位的E7片段,它主要用于治疗HPV16型引起的肛门的不典型增生,治疗对象的HLA是A2型,在进行的临床I期试验中,12名患者在所有剂量组的实验中均有很好的耐受,其中3名在接种后的12~24周后出现部分的病变部位组织学上的变化,有10名患者显示免疫能力有所提高。

另有报道使用E5作为抗原的DNA疫苗-rAd-E5^[19],在动物实验中,一次肌肉注射rAd-E5即可产生CD8⁺介导的细胞免疫反应,抑制肿瘤的发生。

RNA疫苗的临床研究目前还未见报道,但在理论上分析其可能具有较大的应用价值,并且动物实验也证实了其具有激发CD8⁺T介导的免疫反应能力和明显的抗肿瘤作用,是基因疫苗发展的一个重要方向。

3 展望

HPV疫苗的研究在近10年中取得了长足进展,许多疫苗已完成I/II期临床试验,准备进行更深入的研究。但临床应用尚有诸多问题,如临床副作用和对环境的安全性,HPV病毒的严格种属特异性,无法建立动物模型评价疫苗的免疫效果以及疫苗自身的安全性问题等,另外,如何选择

最佳的疫苗策略,如载体的优化,临床应用疫苗条件的合理选择等,这些都应该是研发HPV疫苗和治疗时应考虑的内容。由于以上种种原因,现已开发的疫苗还没有一种是十分有效,安全性好,能被普遍接受的。因此,要研制出一种理想的HPV治疗疫苗并在人群大规模推广尚需时日。开发对尖锐湿疣和不典型增生以及宫颈癌都有效的HPV疫苗将有重要应用价值和前途。

[参考文献]

- [1] Pisani P, Parkin DM, Bray F, *et al.* Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990 [J]. *Int J Cancer*, 1999, 83(1): 870-873.
- [2] Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, *et al.* Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles [J]. *J Virol*, 1993, 67(12): 6929-6936.
- [3] Ying H, Zaks TZ, Wang RF, *et al.* Cancer therapy using a self-replicating RNA vaccine [J]. *Nat Med*, 1999, 5(7): 823-827.
- [4] Franceschi S. Human papillomavirus: A vaccine against cervical carcinoma uterine [J]. *Epidemiol Prev*, 2002, 26(3): 140-144.
- [5] Zhang LF, Zhou J, Chen S, *et al.* HPV6b virus like particles are potent immunogens without adjuvant in man [J]. *Vaccine*, 2000, 18(11-12): 1051-1058.
- [6] Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, *et al.* Expression of vaccinia recombinant HPV16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV viron-like particles [J]. *Virology*, 1991, 185(1): 251-257.
- [7] Muderspach L, Wilczynski S, Roman L, *et al.* A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV 16 positive [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(9): 3406-3416.
- [8] Steller MA, Gurski KJ, Murakami M, *et al.* Cell-mediated immunological responses in cervical and vaginal cancer patients immunized with a lipidated epitope of human papillomavirus type 16 E7 [J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(9): 2103-2109.
- [9] Lacey CJ, Thompson HS, Monteiro EF, *et al.* Phase II a safety and immunogenicity of a therapeutic vaccine, TA-GW, in persons with genital warts [J]. *J Infect Dis*, 1999, 179(3): 612-618.
- [10] de Jong A, O'Neill T, Khan AY, *et al.* Enhancement of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7-specific T-cell immunity in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV 16 L2E7E6 fusion protein vaccine [J]. *Vaccine*, 2002, 20(29-30): 3456-3464.
- [11] Chu NR, Wu HB, Wu T, *et al.* Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guerin (BCG) hsp65 and HPV 16 E7 [J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 121(2): 216-225.
- [12] Tillman BW, Hayes TL, GeGruilj TD, *et al.* Adenoviral Vectors Targeted to CD40 Enhance the Efficacy of Dendritic Cell-based Vaccination against Human Papillomavirus 16-induced Tumor Cells in a Murine Model [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(19): 5456-5463.

- [13] Kaufmann AM, Stern PL, Rankin EM, *et al.* Safety and immunogenicity of TA-HPV, a recombinant vaccinia virus expressing modified human papillomavirus(HPV)-16 and HPV-18 E6 and E7 genes, in women with progressive cervical cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(12): 3676-3685.
- [14] Baldwin PJ, van der Burg SH, Boswell CM, *et al.* Vaccinia-expressed human papillomavirus 16 and 18 e6 and e7 as a therapeutic vaccination for vulval and vaginal intraepithelial neoplasia[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(14): 5205-5213.
- [15] Ji H, Wang TL, Chen CH, *et al.* Targeting human papillomavirus type 16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA vaccines against murine human papillomavirus type 16 E7-expressing tumors[J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(17): 2727-2740.
- [16] Hauser H, Shen L, Gu QL, *et al.* Secretory heat-shock protein as a dendritic cell-targeting molecule: A new strategy to enhance the potency of genetic vaccines[J]. *Gene Ther*, 2004, 11(11): 924-932.
- [17] Chen CH, Wang TL, Hung CF, *et al.* Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(4): 1035-1042.
- [18] Klencke B, Matijevic M, Urban RG, *et al.* Encapsulated plasmid DNA treatment for human papillomavirus 16-associated anal dysplasia: A Phase I study of ZYC101[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(5): 1028-1037.
- [19] Liu DW, Tsao XP, Hsieh CH, *et al.* Induction of CD8 T cell by vaccination with recombinant adenovirus expressing human papillomavirus type 16 E5 gene reduces tumor growth[J]. *J Virol*, 2000, 74(19): 9083-9089.
- [收稿日期] 2004 - 07 - 05 [修回日期] 2004 - 10 - 05
[本文编辑] 王莹, 韩丹

第四届海峡两岸肿瘤学术会议征文通知

由中国抗癌协会与台湾临床肿瘤医学会共同主办的第四届海峡两岸肿瘤学术会议将于 2005 年 10 月 20 ~ 23 日在云南省昆明市召开。

海峡两岸肿瘤学术会议的目的旨在加强两岸从事肿瘤研究与临床医务工作者的学术交流,促进大陆与台湾肿瘤预防和诊治水平的整体发展。海峡两岸肿瘤学术会议自 1999 年在哈尔滨召开第一届会议以来,已先后在两岸成功地举办了三届。会议已经成为两岸肿瘤学者进行临床和科研学术交流的重要平台,两岸达成了每年一次分别在大陆和台湾召开学术会议的共识。现将论文注意事项通知如下:

一、征文内容

有关肿瘤的基础与临床应用研究的新成果和新进展。

1、肿瘤靶向治疗;2、蛋白质组学在肿瘤诊断治疗中的应用;3、肿瘤治疗中的新理论、新技术、新方法。

二、征文要求:

1、论文必须未在国内公开发表;2、论文摘要用中文书写,字数 < 800 字;应包括目的、方法、结果、结论四方面内容;3、请务必注明拟参加交流的论文分类代码(口头、张贴、大会交流);4、论文提交方式:(1)建议用 MS-Word 附件形式发送电子邮件至 wenyngz@caca.sina.net;(2)论文摘要和软盘邮寄至北京海淀区新洲商务大厦 8 层,中国抗癌协会张文英收(100036);软盘上请注明论文题目、作者姓名;(3)会议恕不接受传真件文稿。

三、联系地址及论文截稿时间

北京海淀区新洲商务大厦 8 层,中国抗癌协会 张文英收(100036)

联系电话:010-88152121 转 805

E-mail: wenyngz@caca.sina.net

论文截稿日期 2005 年 7 月 31 日(以邮戳或电子邮件日期为准)。