

# 不同佐剂对含 S+PreS1 融合抗原的乙型肝炎病毒颗粒疫苗免疫原性的影响

陈红\*, 邓瑶\*, 谭文杰, 王文, 殷霄, 管洁, 王文玲, 阮力

中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 病毒病应急技术中心, 北京 100052

**摘要:** 本研究在前期工作基础上, 用 CHO 细胞表达的含 PreS1+S 融合抗原的新型基因工程 HBV 颗粒疫苗 (HBSS1) 与 Al(OH)<sub>3</sub>、CpG 及 CpG+Al(OH)<sub>3</sub> 等佐剂配伍, 在 Balb/C 小鼠模型上研究不同佐剂对 HBV 颗粒疫苗肌肉注射后免疫应答的影响, 主要包括抗体滴度、抗体亚型分类及特异性细胞免疫 ( $\gamma$ -IFN ELISpot 检测)。结果表明: CpG 佐剂结合 HBSS1 颗粒疫苗可快速诱导 (单针免疫) 高水平的抗 PreS1 及 S 抗体, IgG2a/IgG1 比率 > 1, 同时可诱导较高抗原特异的细胞免疫应答; Al(OH)<sub>3</sub>+CpG 双佐剂组一次免疫后可诱导产生最高的抗 S 抗体滴度 ( $1:10^5$ ), 其产生的抗体亚类包括 IgG1、IgG2a 与 IgG2b; 在 S 抗原 N 端 (13~49 aa) 存在优势 CTL 表位。结论: CpG 佐剂结合 HBSS1 颗粒疫苗应是发展新型治疗性乙肝疫苗的较佳选项。

**关键词:** 乙型肝炎病毒, 病毒颗粒, 疫苗, CpG 佐剂

## Impact of different adjuvants on immunogenicity of the HBV particle vaccine containing the S + PreS1 fusion antigen in Balb/C mice

Hong Chen\*, Yao Deng\*, Wenjie Tan, Wen Wang, Xiao Yin, Jie Guan, Wenling Wang, and Li Ruan

Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

**Abstract:** We previously reported the development of novel hepatitis B virus (HBV) vaccine containing the surface antigen (S) plus PreS1 fusion derived from Chinese hamster ovary (CHO) cells system. In this study, we analyzed the impact of different adjuvants on immunogenicity of the HBV particle vaccine in Balb/C mice, including alum alone, CpG oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) alone and CpG-ODN in combination with alum adjuvant. We first detected the antigen specific humoral response in mice, including total IgG antibody and IgG subtyping. Then, we characterized the specific cell-mediated immune (CMI) response by detection of  $\gamma$ -interferon secreting splenocytes after stimulating with S or PreS1 peptide pool. Our results showed that: CpG-ODN adjuvanted vaccine could rapidly induce higher level of anti-PreS1 and anti-S antibodies, and a higher ratio of IgG2a/IgG1 antibody than that of alum adjuvanted vaccine. At the same time, CpG-ODN adjuvanted vaccine induced robust antigen-specific cellular immune responses in mice, which was superior to that of alum adjuvanted vaccine and CpG-ODN in combination with alum adjuvanted

**Received:** August 16, 2009; **Accepted:** October 9, 2009

**Supported by:** National Major Special Program of New Drug Research and Development (No. 2009ZX09102-237).

**Corresponding author:** Wenjie Tan. Tel: +86-10-63552140; Fax: +86-10-63552140; E-mail: tanwj28@yahoo.com

Li Ruan. Tel: +86-10-63552140; Fax: +86-10-63552140; E-mail: ruanl@public3.bta.net.cn

\* These authors contributed equally to this study.

重大新药创制科技重大专项 (No. 2009ZX09102-237) 资助。

vaccine; however, the vaccine candidate with CpG-ODN in combination with alum adjuvant induced highest anti-S antibody and mixed IgG subclasses in mice after twice immunization. There exists dominant HBV CMI epitopes in the N-terminal of S antigen. These results provided important evidence that CpG-ODN adjuvanted HBSS1 particles vaccine may serve as a novel candidate in the development of new preventive and therapeutic agents against hepatitis B infection.

**Keywords:** hepatitis B virus (HBV), viral particles, vaccine, CpG-ODN

乙型肝炎病毒 (HBV) 不仅可引起慢性肝炎, 而且与肝硬化、肝癌的发生密切相关, 尽管乙肝疫苗的使用已逾 20 年, 目前 HBV 仍是传播最为广泛的病原之一<sup>[1]</sup>。据 WHO 分析, 全世界每年仍有 50~120 万人死于 HBV 感染<sup>[1]</sup>。HBV 疫苗在中国已纳入计划免疫, 使用最为广泛的为酵母或 CHO 细胞表达含 S 全长的颗粒亚单位疫苗<sup>[2]</sup>。HBV 疫苗长期使用的效果表明, 该疫苗加 Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂后三针免疫可有效保护人群 HBV 感染与传播, 但仍有 5%~10% 的人群不能产生保护性 anti-HBS 抗体, 且近年来, S 变异流行株呈增长趋势<sup>[2]</sup>。因此, 为进一步提高现有乙肝疫苗的保护效果, 许多学者从新型抗原设计及新的佐剂配伍方面进行了有益的探索<sup>[2-10]</sup>。本研究组前期研发了含 PreS1+S 融合抗原的 HBV 颗粒疫苗<sup>[3]</sup>, 对其纯化工艺、生物学性状及安全性等进行了系统研究<sup>[3]</sup>; 同时采用 Al(OH)<sub>3</sub>、CpG 及 CpG+Al(OH)<sub>3</sub> 等佐剂配伍, 在小鼠模型上探讨了不同佐剂对现有市售乙肝疫苗 (CHO 表达 S 抗原) 免疫效果的影响<sup>[4]</sup>。

本研究在前期工作基础上<sup>[3-4]</sup>, 着重研究不同佐剂配伍对 CHO 表达的含 PreS1+S 融合抗原的新型基因工程 HBV 颗粒疫苗免疫效果的影响, 主要包括抗体滴度、抗体亚型分类及细胞免疫。

## 1 材料和方法

### 1.1 疫苗与佐剂

CHO 表达的含 S+PreS1 融合抗原的颗粒疫苗 (HBSS1) 的制备及生物学性状参见文献<sup>[3]</sup>。疫苗纯度>95%, 抗原含量为 100 μg/mL。Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂为北京华尔盾科技服务公司提供, 浓度为 2 mg/mL, CpG-ODN 1826<sup>[4-6]</sup>由 NEB 公司合成, 全链硫代修饰纯度>95%, 由上述抗原与佐剂分别配伍成 3 种免疫制剂, 即 HBSS1+Al(OH)<sub>3</sub>、HBSS1+CpG、HBSS1+Al(OH)<sub>3</sub>+CpG, 其中每剂中抗原含量皆为 2 μg, Al(OH)<sub>3</sub> 含量为 1 mg/mL, CpG 含量为 10 μg。

### 1.2 动物与试剂

Balb/C 小鼠, 雌性, 6~8 周龄, 购自中国医学科学院实验动物繁殖中心, HPR 标记的羊抗小鼠 IgG1, 羊抗小鼠 IgG2a 与羊抗小鼠 IgG2b 均购自 Sigma 公司, HBV S 抗体与 PreS1 抗体检测 ELISA 试剂盒购自上海科华公司。用于 HBV ELISpot 检测用合成肽由 NEB 公司合成, 序列见表 1, 纯度皆大于 90%; γ-IFN ELISpot 检测用试剂盒购自 BD 公司。

### 1.3 动物免疫

按 3 种免疫制剂分成 4 个组, 每组 6 只, 即生理盐水对照组 (A)、HBSS1+Al(OH)<sub>3</sub> 组 (B)、HBSS1+CpG 组 (C) 与 HBSS1+Al(OH)<sub>3</sub>+CpG 组 (D), 免疫及检测时间参见图 1, 免疫途径采用肌肉注射<sup>[4]</sup>, 每只抗原注射量均为 2 μg/200 μL。

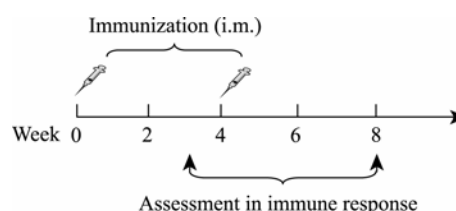


图 1 免疫及检测时间

Fig. 1 Schedule for immunization and detection in mice.

### 1.4 体液免疫应答检测

眼眶采血检测抗体, 参照试剂盒说明进行, 其中总抗体检测中酶标二抗改为 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG+M+A 多价抗体。抗体亚型分析中则采用相应的酶标二抗, 采用 S 抗体检测试剂盒, 每组血清混合后皆从 1:10 稀释到 1:10<sup>6</sup>。

### 1.5 IFN-γ ELISpot 检测

将合成肽分别分成 S1(PreS1) 组, S-1, S-2 组 (表 1), 分别与小鼠脾细胞 (5×10<sup>5</sup>) 孵育, 具体操作按试剂盒说明书进行<sup>[5-6]</sup>, 反应终止后在 ELISpot 读数仪上计数分析, 每组小鼠以 10<sup>6</sup> 脾细胞中 Spots (减去无关肽孔) 计数求均值。

2 结果

2.1 不同疫苗制剂所引起的体液免疫应答

单针免疫后，颗粒疫苗+铝佐剂 (B) 中有 2 只 (2/6) 抗 PreS1 与抗 S 抗体阳转，而颗粒疫苗+CpG 组 (C) 与颗粒疫苗+铝佐剂+CpG 组 (D) 抗 PreS1 皆阳转 (6/6)，其中 C 组 (6/6) 抗 S 抗体全阳转，但 D 组抗 S 抗体仅有 2 只 (2/6) 阳转 (表 2)。

表 1 用于 ELISpot 检测的合成肽序列  
Table 1 Peptide sequences used for IFN-γ ELISpot assay

Group	Sequence	Location
S1	DPAFRANTA	20-28(PreS1 Ag: aa)
	RANTANPDW	24-32
	NPDWDFNPN	29-37
	NPNKDTWPD	35-43
S-1	VLQAGFFL	13-21(S Ag: aa)
	IPQSLDSWWTSL	28-39
	FLGGTPVCL	41-49
	LLDYQGMLP	97-105
S-2	GLSPTVWLS	184-193
	SILSPFIPL	206-215
HBC	TPPATRPPNAPLL	128-140(Core: aa)

二针免疫后，B、C、D 组抗 S1 与抗 S 抗体皆 100% 阳转，其抗体滴度见表 2，其中抗 PreS1 抗体

滴度在 3 组间无明显差异，皆为 1:10<sup>4</sup>，而抗 S 抗体滴度则存在差异，以 HBSS1+CpG+Al(OH)<sub>3</sub> 组最高，可达到 1:10<sup>5</sup>。

2.2 不同疫苗制剂所引起的细胞免疫应答及抗体亚型

二针免疫后，不同疫苗制剂所诱导的 γ-IFN ELISpot 计数如图 2 所示，以 HBSS1+CpG 组 (C 组) 诱导的细胞免疫应答最强，Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂的加入 (D 组) 减少了免疫小鼠脾细胞中特异的 IFN-γ 的分泌，降低了细胞免疫应答水平。此外，如图 2 所示，S-1 肽库刺激可产生较高的 γ-IFN 分泌，明显高于 S-2 肽库刺激与 S1(PreS1) 肽库刺激所产生的 γ-IFN 分泌，表明在 S 抗原 N 端 (13~49 aa) 存在优势的 CTL 表位，同时我们也注意到含 Al(OH)<sub>3</sub> 或 CpG 佐剂的 HBSS1 颗粒疫苗也能产生较弱的针对 PreS1 的细胞免疫应答。

不同佐剂对 HBSS1 抗原引起的抗体亚型应答见图 3，单纯使用 Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂时，以 IgG1 类抗体占优势，为 10<sup>5</sup>，IgG2b 抗体为 10<sup>2</sup>，无 IgG2a 抗体存在；单纯使用 CpG 佐剂时，则 IgG1 与 IgG2a 抗体皆显著存在，以 IgG2a 抗体为主 (IgG2a/IgG1>1)，

表 2 单针及二针免疫后的总抗体 IgG 阳转率及滴度  
Table 2 Total antibody positive rate and titer of different groups after single or twice immunization

Groups	After single immunization		After twice immunization	
	Anti-S	Anti-S1	Anti-S	Anti-S1
Al(OH) <sub>3</sub> +HBSS1	2/6(1:10)	2/6(1:10)	6/6(1:10 <sup>4</sup> )	6/6(1:10 <sup>4</sup> )
CpG+HBSS1	6/6(1:100)	6/6(>1:100)	6/6(1:10 <sup>4</sup> )	6/6(1:10 <sup>4</sup> )
CpG+Al(OH) <sub>3</sub> +HBSS1	2/6(1:10)	6/6(>1:100)	6/6(1:10 <sup>5</sup> )	6/6(1:10 <sup>4</sup> )

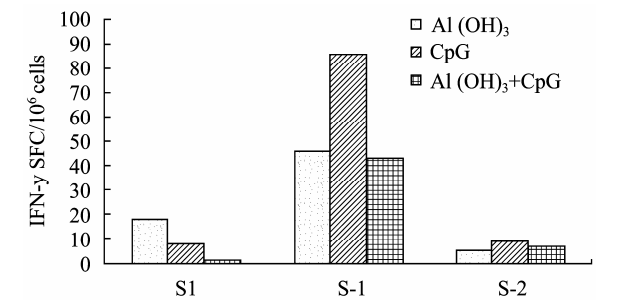


图 2 含不同佐剂的 HBSS1 颗粒疫苗所诱导的细胞免疫应答  
Fig. 2 Characterization of cellular immune responses induced by HBSS1 particle vaccines with different adjuvant by IFN-γ ELISpot assay.

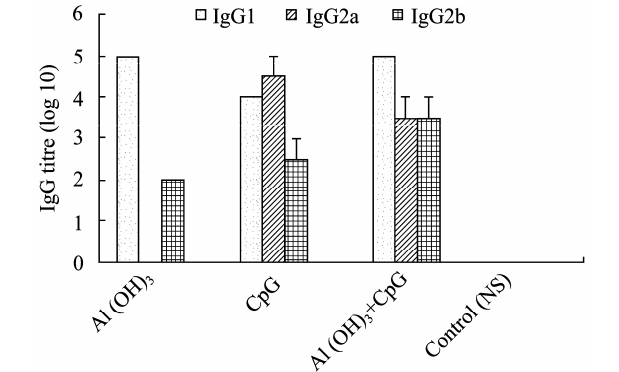


图 3 含不同佐剂的 HBSS1 颗粒疫苗所诱导的 IgG 抗体亚型  
Fig. 3 The subtype class of IgG antibody induced by HBSS1 particle vaccines with different adjuvant by ELISA.

IgG2b 抗体检出较低; 若 CpG 与  $\text{Al}(\text{OH})_3$  佐剂共同使用, 则 IgG1 抗体变化与单纯使用 CpG 佐剂相近, IgG2a 抗体滴度低于单纯使用 CpG 佐剂组, 但 IgG2b 抗体增高。

### 3 讨论

接种乙肝疫苗是目前预防乙肝的有效措施<sup>[1,2]</sup>, 从 2002 年起我国将乙肝疫苗纳入计划免疫。乙肝疫苗的大量使用已经明显降低了我国儿童乙肝病毒的感染率, 但是现有疫苗仍存在两个比较突出的问题<sup>[2]</sup>: 1) 大约 5%~10% 的接种者完成全程免疫后对疫苗无反应或低反应, 不能产生有效的免疫保护。2) 部分接种者虽然能够产生高水平的抗体, 但仍然会感染乙肝病毒。对这些个体中的乙肝病毒基因序列分析发现, HBsAg 主要保护性抗原决定簇“a”决定簇发生变异可能为其主要原因。而且中国疾病预防控制中心的大规模流行病学调查结果也表明, 在我国乙肝疫苗纳入计划免疫后的强大免疫选择压力之下, 这种免疫逃逸变异株的检出率有增加的趋势 (内部资料)。因此, 进一步优化疫苗组分, 研制免疫效果更好的新一代乙肝疫苗制剂十分必要。

现有市售基因工程乙肝疫苗除法国巴斯德公司的基因工程乙肝疫苗含有 PreS2 和 S 以外<sup>[7]</sup>, 其余的只含 S, 但含 PreS2 的基因工程乙肝疫苗并未显示出更强的免疫效果<sup>[7]</sup>。随着对乙肝病毒表面抗原的结构与功能的深入研究发现, HBV 的前 S1 区抗原决定簇比 S 区域更为丰富, 相应的特异性抗体能中和乙肝病毒, 保护机体免受病毒攻击<sup>[8]</sup>。HBV 与肝细胞受体结合的位点位于 PreS1(21~47)<sup>[8]</sup>, 针对这一区域的抗体能阻断 HBV 与肝细胞的结合, 从而阻止病毒进入肝细胞。同时 PreS1 抗体出现早, 可能对阻断 HBV 母婴传播十分有利<sup>[3]</sup>。本实验室前期应用 Adr 亚型乙肝表面抗原 S+PreS1 融合基因研制了新型 HBV 颗粒疫苗<sup>[3]</sup>, 对其生物学活性进行了全面检定。动物免疫结果表明该疫苗既产生 S 抗体, 又能产生 PreS1 抗体, PreS1 抗体的产生早于 S 抗体, 这对母婴阻断更为有益<sup>[3]</sup>。含有 PreS1 的乙肝疫苗能使对 S 不反应的小鼠重新对 S 产生抗体反应, 这对于现有乙肝疫苗不应答的人群 (约 5%~10%) 来说很

有意义。这反映出 HBSS1Ag 免疫效果要优于单纯含乙肝表面 S 抗原的疫苗。面对我国大约 1 亿人口为乙肝表面抗原携带者, 发展治疗性乙肝疫苗, 将疫苗的使用从预防乙肝扩展到治疗乙肝病毒携带者, 也应是基因工程乙肝疫苗研究的另一个重要发展趋势<sup>[2]</sup>, 在这方面含 PreS1 的乙肝疫苗和增强细胞免疫佐剂 (CpG ODN) 的结合使用将是这类疫苗研究开发的重要途径。

本实验结果表明: 含单纯  $\text{Al}(\text{OH})_3$  佐剂的 HBSS1 颗粒疫苗二针免疫后即可诱导较强的 S 抗体与 S1 抗体, 其抗体亚类主要为 IgG1 型, 即 Th2 型反应, 而含单纯 CpG 佐剂的 HBSS1 颗粒疫苗则可加速 S 抗体的阳转 (表 2), 单次免疫后其抗 S1 抗体的阳转率亦高于含单纯  $\text{Al}(\text{OH})_3$  佐剂疫苗组, 同时, 抗体亚型除 IgG1 外, 还产生了 IgG2a 且  $\text{IgG2a/IgG1} > 1$ , 表明以 Th1 应答为主, Th1 型应答有利于机体对胞内病原体的清除避免持续性感染的发生, 平衡的 Th1/Th2 应答有利于克服机体对抗原的不应答性。 $\gamma$ -IFN ELISpot 结果亦表明: 含单纯  $\text{Al}(\text{OH})_3$  佐剂疫苗组虽可诱导特异性细胞免疫应答, 但含单纯 CpG 组佐剂组所诱导的细胞免疫应答明显高于含单纯  $\text{Al}(\text{OH})_3$  佐剂疫苗组, 亦明显高于含 CpG+ $\text{Al}(\text{OH})_3$  混合佐剂疫苗组, 表明 CpG 佐剂可增强 HBSS1 颗粒疫苗的细胞免疫应答水平, 含  $\text{Al}(\text{OH})_3$ +CpG 混合佐剂的 HBSS1 颗粒疫苗二针肌肉注射后可产生最强的抗 S 抗体应答, 但其细胞免疫应答强度较含 CpG 佐剂疫苗低, IgG2a 类抗体高于含  $\text{Al}(\text{OH})_3$  佐剂疫苗, 低于含 CpG 佐剂疫苗组, 同时产生了较高 IgG2b 类抗体, 是较平衡的 Th1/Th2 类应答。

$\gamma$ -IFN ELISpot 实验表明, 3 类佐剂结合 HBSS1 颗粒亚单位疫苗肌肉注射皆可诱导小鼠产生明显的细胞免疫应答, 且在 S 抗原 N 端 (13~49 aa) 存在优势 CTL 表位。

通过比较含 3 类佐剂的 HBSS1 颗粒疫苗的免疫应答特点, 可以得知 CpG 佐剂结合 HBSS1 颗粒疫苗可快速产生高水平的抗 S1 及 S 抗体及较高的  $\text{IgG2a/IgG1}$  比率, 同时可诱导较高抗原特异的细胞免疫应答, 该类疫苗免疫应答特点明显优于含

Al(OH)<sub>3</sub>佐剂疫苗组。而含混合佐剂疫苗组二针免疫后可产生最强的体液免疫应答及混合的 IgG 亚类。

## REFERENCES

- [1] Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. *J Clin Virol*, 2005, **34**(S1): S1-3.
- [2] TanWJ, Ruan L. Progress on combination strategies of therapeutic vaccine approaches for the treatment of chronic HBV infection. *Chin J Virol*, 2006, **22**(5): 407-411.  
谭文杰, 阮力. HBV 病毒慢性感染疫苗治疗的组合策略及研究进展. 病毒学报, 2006, **22**(5): 407-411.
- [3] Tian SF, Zong F, Chen H, *et al.* The physicochemical and biological properties of SS1 fusion antigen of HBsAg secreted by mammalian cells. *Chin J Virol*, 2002, **18**(4): 312-316.  
田淑芳, 宗芳, 陈红, 等. 哺乳动物细胞分泌的乙型肝炎病毒表面 S+PreS1 融合抗原的理化和生物学性状. 病毒学报, 2002, **18**(4): 312-316.
- [4] Wang SQ, Xu HL, Ruan L, *et al.* Effects of CpG on the immune response to recombinant hepatitis B virus vaccine. *Chin J Virol*, 2002, **18**(2): 108-112.  
王四清, 许洪林, 阮力, 等. CpG 对乙型肝炎基因重组 (CHO 细胞)疫苗免疫效果的影响. 病毒学报, 2002, **18**(2): 108-112.
- [5] Davis HL, Weeratna R, Waldschmidt TJ, *et al.* CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol*, 1998, **160**(2): 870-876.
- [6] Xu HL, Wang SF, Guo F, *et al.* CpG-ODN is a potential candidate adjuvant for human vaccines. *Chin J Med*, 2002, **82**(8): 553-556.  
许洪林, 王世峰, 郭斐, 等. CpG 寡脱氧核苷酸作为人用疫苗佐剂的初步研究. 中华医学杂志, 2002, **82**(8): 553-556.
- [7] Kuroda S, Fujisawa Y, Iino S, *et al.* Induction of protection lever of anti-preS antibodies in humans immunized with a novel hepatitis B vaccine consisting of M (preS2+S) protein particles (a third generation vaccine). *Vaccine*, 1991, **9**(3): 163-169.
- [8] Dash S, Rao KV, Panda SK. Receptor for pre-S1 (21-47) component of hepatitis B virus on the liver cell: role in virus cell interaction. *J Med Virol*, 1992, **37**(2): 116-121.
- [9] Halperin SA, Van Nest G, Smith B, *et al.* A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant. *Vaccine*, 2003, **21**(19/20): 2461-2467.
- [10] Zhang W, Du X, Zhao G, *et al.* Levamisole is a potential facilitator for the activation of Th1 responses of the subunit HBV vaccination. *Vaccine*, 2009, **27**(36): 4938-4946.