

特邀综述

刘文军 博士, 研究员, 博士生导师。中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室副主任, 分子病毒中心主任, 中关村科技园区分子病毒及生物制药开放实验室主任。1982年毕业于北京农业大学兽医系, 1985年获该校硕士学位, 1996年获美国佛罗里达大学分子生物学和细胞生物学博士学位。先后在Oklahoma大学医学中心从事博士后研究, 在美国农业部国家动物病研究中心、哈佛休斯医学研究所 (HHMI) 和 GENZMYE 生物技术制药公司工作。2004年中国科学院“百人计划”获得者, 2007年获 Thomson Scientific 论文卓越奖, 2008年获中国科学院教学成果二等奖, 2012年获中国科学院微生物研究所所长奖教金优秀奖等。近几年来在 *Science*、*Journal of Virology*、*Cellular Microbiology*、*Journal of Clinical Virology* 等国际期刊发表多篇论文。主要承担了国家科技部 973 项目、“十二五”科技支撑计划项目、国家自然科学基金面上项目; 农业部公益性行业科研专项; 卫生部重大传染病防治专项等。



埃博拉病毒疫苗研究进展

杨利敏¹, 李晶¹, 高福^{1,2}, 刘文军¹

1 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 中国疾病预防控制中心, 北京 102206

杨利敏, 李晶, 高福, 等. 埃博拉病毒疫苗研究进展. 生物工程学报, 2015, 31(1): 1-23.

Yang LM, Li J, Gao GF, et al. Overview of Ebola virus vaccine. Chin J Biotech, 2015, 31(1): 1-23.

摘要: 埃博拉病毒是一种可引起人和非人灵长类动物出血热传染病的最为致命的烈性病毒, 致死率可达90%。2014年在西非爆发的埃博拉疫情引起了全世界的关注。疫苗接种是预防和控制传染病最为常规和有效的方法, 尽管目前还没有正式获得批准上市的埃博拉病毒疫苗, 但是已有多个尚处于研究阶段的疫苗在非人灵长类动物上取得了很好的保护效果, 并有几个已进入临床 I 期试验阶段, 有望尽快用于本次埃博拉疫情的防控。本文对目前处于研究阶段的多个类型的埃博拉病毒疫苗进行了综述, 为相关研究人员提供参考。

关键词: 埃博拉病毒, 疫苗, 腺病毒, 水疱性口炎病毒, 病毒样颗粒

Received: October 27, 2014; **Accepted:** December 2, 2014

Supported by: National Key Technologies Research and Development Program of China (No. 2013ZX10004-610), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31100644, 31402216, 81101253), Key Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSZD-EW-Z-005-001).

Corresponding author: Wenjun Liu. Tel: +86-10-64807497; E-mail: liuwj@im.ac.cn

“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项 (No. 2013ZX10004-610), 国家自然科学基金 (Nos. 31100644, 31402216, 81101253), 中国科学院重点部署项目 (No. KSZD-EW-Z-005-001) 资助。

网络出版时间: 2014-12-04

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140514.html>

Overview of Ebola virus vaccine

Limin Yang¹, Jing Li¹, George Fu Gao^{1,2}, and Wenjun Liu¹

1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Abstract: Ebola virus (EBOV) causes hemorrhagic fever, resulting in mortality rates as high as 90% among infected humans and non-human primates (NHPs). The 2014 Ebola epidemic in West Africa is the severest in history, leading to WHO taking all control measures to stop any possibility of cross-border outbreaks. Because no licensed vaccines or effective therapeutics against EBOV are available, the current outbreak management has been limited to palliative care and barrier methods to prevent transmission. Several promising experimental EBOV vaccines have demonstrated protection in NHPs against lethal EBOV challenge, and some progresses have been made through clinical trials of EBOV vaccine candidates. It is believed there will be some licensed vaccine available in the near future to control EBOV outbreaks. In this review we provide some insights for further development of EBOV vaccines.

Keywords: Ebola virus, vaccine, adenovirus, vesicular stomatitis virus, virus-like particles

埃博拉出血热 (Ebola hemorrhagic fever, EHF) 是由埃博拉病毒 (Ebola virus, EBOV) 引起的一种高传染性、高致死率的烈性疾病。由于埃博拉病毒的极高危险性和尚无有效的治疗手段, 因此该病毒与马尔堡病毒 (Marburg virus, MARV) 和拉沙病毒 (Lassa virus) 同被列为生物安全等级四级 (BSL-4) 病毒, 属于最为危险的病原微生物。该病毒于 1976 年首次被发现, 1995 年在刚果民主共和国爆发后才被人们所认知。由于疫情只局限于非洲, 零星发病而且持续时间较短, 因此均未受到普遍重视。直至 2014 年在西非的爆发, 截至目前, 感染人数已达 17 290 人, 其中 6 128 人死亡, 受到了全世界前所未有的关注。由于埃博拉出血热的潜伏期为 2-21 d, 因此在未出现症状前, 随着被感染人员的流动, 疫情逐渐被带到其他国家, 目前出现感染病例的国家已由最初的几内亚、利比里亚和塞拉利昂扩散到尼日利亚、塞内加尔、美国、西班牙和马里。传统的隔离、检疫措施无法抑制疫情, 蔓延速度激增, 有可能成为全球威

胁性疾病。目前还没有正式获批的疫苗和治疗性药物, 因此这次埃博拉疫情的防控是全球公共卫生机构的一个巨大挑战。

疫苗的接种为传染病常规的防控手段, 但目前没有上市的埃博拉病毒疫苗, 其原因是该病发病稀少且受地域局限, 研发疫苗缺少经济价值而无法引起疫苗研发企业的重视。但多个实验室已在前期研究中取得了较好的进展, 尤其在非人灵长类动物上可以获得快速、有效的保护, 为此次防控奠定了基础。世界各地的科学家们采用多种途径进行埃博拉病毒疫苗的研发, 其中包括灭活疫苗、反向遗传改造的复制缺陷型疫苗、病毒样颗粒疫苗、牛痘病毒载体疫苗、人 3 型副流感病毒载体疫苗、新城疫载体疫苗、狂犬病毒载体疫苗、委内瑞拉马脑炎病毒载体疫苗、DNA 疫苗、水疱性口炎病毒载体疫苗、腺病毒载体疫苗 (表 1)。其中 DNA 疫苗和人 5 型腺病毒载体 (rAd5) 疫苗已完成了 I 期临床试验证明了其安全性, 但尚存一些不足需要完善。目前进展较好的为美国国

表 1 不同埃博拉病毒疫苗平台比较

Table 1 Comparison of Ebola virus vaccine candidates

Vaccine candidates	Inoculated route	Animal model	Protection/challenge manner	References
ChAd3	I.M.	NHPs	100%/ I.M.	[15]
ChAd63	I.M.	NHPs	25%/ I.M.	[14]
Ad26+Ad35	I.M.+ PEI	NHPs	100%/ I.M.	[14]
	SL + PEI	Mice	33%–100%/ I.M.	[37]
Ad5	I.M.	Mice	100%/ I.P.	[20-23]
	I.N. + PEI	Mice	100%/ I.P.	[21-20]
	P.O.	Mice	100%/ I.P.	[20]
	I.N. + PEI	Guinea pig	100%/ I.P.	[24]
	I.M.	NHPs	100%/ I.M.	[13-11]
CAdVax	I.N.+ PEI	NHPs	75%/ I.M.	[26]
	I.M.	NHPs	100%/ aerosol	[35]
	I.M.	NHPs	100%/ I.P.	[35]
ChAdC7	I.M. + PEI	Mice/ Guinea pig	100%/ I.P.	[17]
Ad C5/C1	I.M.	Mice	100%/ I.P.	[36]
DNA+Ad5	I.M.	NHPs	100%/ I.P.	[10]
	I.P.	Mice	100%/ I.P.	[51]
VSV	I.M./ I.N./ P.O.	NHPs	100%/ I.M.	[52-56]
	I.M.	NHPs	100%/ aerosol	[58]
DNA	Gene gun/ I.M.	Mice	100%/ I.P.	[71-68]
	I.M.	Guinea pig	100%/ I.P.	[67]
HPIV3	I.N.	Guinea pig	100%/ I.P.	[78-73]
	I.N./ I.T.	NHPs	100%/ I.P.	[74]
Rabies vector	I.M.	Mice	100%/ I.P.	[88]
	I.M.	NHPs	100%/ I.P.	[91]
VEEV	S.C	Mice	100%/ I.P.	[95]
	S.C	Guinea pig	100%/S.C.	[95-96]
Vaccinia	I.M.	NHPs	100%/ I.M., aerosol	[97]
	I.M.	Guinea pig	60%/ I.P.	[93]
VLPs	I.M./ I.P.	Mice	100%/ I.P.	[110]
	I.M.	Guinea pig	100%/ I.P.	[111]
Replication-deficient	I.M.	NHPs	100%/ I.M.	[117]
	I.P.	Mice/ Guinea pig	100%/ I.P.	[123]
Inactivated vaccine	I.V.	Mice	100%/ I.P.	[120]

pre-existing immunity (PEI), nonhuman primates (NHPs), intramuscular (I.M.), nasal (I.N.), oral (P.O.), intraperitoneally (I.P.), sublingual (SL), intratracheal (I.T.), subcutaneously (S.C.), intravenous (I.V.).

家卫生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 与葛兰素史克公司共同研发的基于复制缺陷型黑猩猩 3 型腺病毒载体的埃博拉疫苗“cAd3-EBOV”和加拿大公共卫生局 (Public Health Agency of Canada) 国家微生物实验室研发的基于减毒水疱性口炎病毒载体的埃博拉疫苗“rVSVΔG-EBOV-GP”, 这两个候选疫苗已通过快速通道进行 I 期临床试验, 试验证明“cAd3-EBOV”具有很好的安全性及免疫原性。下一步将于 2014 年底或 2015 年初在西非等国进行 II 期和 III 期临床试验, 一旦证明疫苗能够实现有效的保护力, 将最快于 2015 年用于西非的疫情防控 (图 1)。本次埃博拉疫情受到了各国政府的高度重视, 美国国家卫生研究院协助多个公司开展埃博拉疫苗的研发, 包括强

生公司的荷兰子公司 Crucell 公司和丹麦的 Bavarian Nordic 公司, 同时对美国国防部下属的生物医药高级研发部和美国生物技术公司 Profectus 进行资助以帮助他们进行相关研究。世界几大制药巨头也加入了埃博拉疫苗的研发和生产, 葛兰素史克公司获得了“cAd3-EBOV”的授权, 默克公司获得了“rVSVΔG-EBOV-GP”的授权, Bavarian Nordic 公司已将研发的埃博拉疫苗“MVA-BN filo/AdVac”授权给了强生公司, 他们的加入将会加快疫苗的研发生产进程。我国也对埃博拉病毒的检测、疫苗和治疗性药物的研发进行了重要部署, 以期满足我国对该病的防控需求。本文阐述了埃博拉病毒疫苗国内外的研究进展, 旨在为前期研发和防控理念提供理论依据。

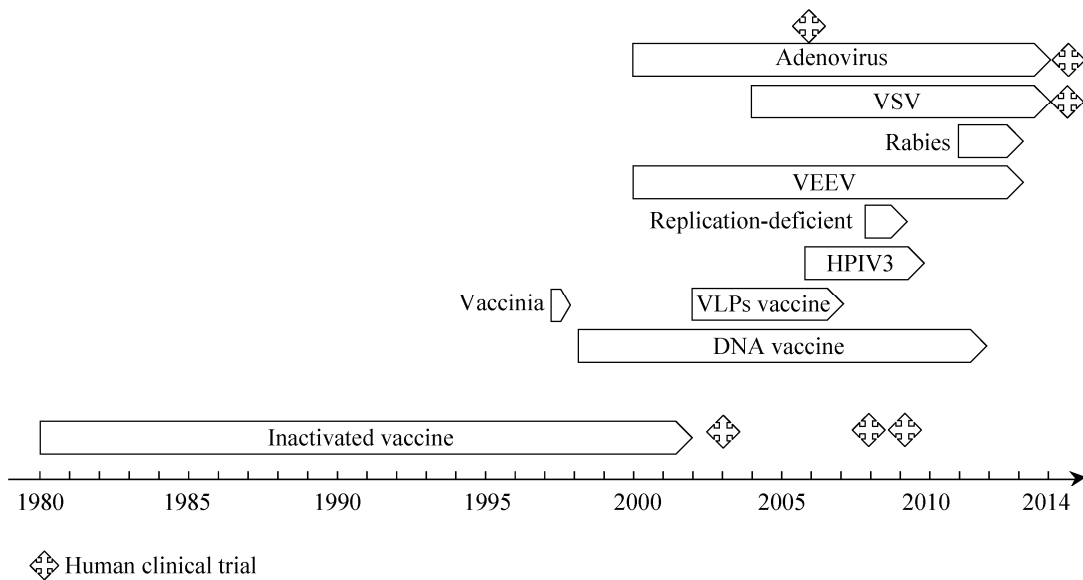


图 1 埃博拉病毒疫苗研究进程

Fig. 1 Research process of different Ebola virus vaccine candidates.

1 埃博拉病毒疫苗的国外研究进展

1.1 腺病毒载体疫苗

腺病毒 (Adenovirus) 载体疫苗由于其具有

低毒性、高效表达外源基因、可特异诱导体液免疫和细胞免疫反应、可通过肌肉和粘膜免疫接种等优点^[1], 被广泛应用于多种病原体疫苗研究, 而且已有多个疫苗进入到了 I 期临床或 II 期临床,

包括埃博拉^[2]、HIV^[3]、疟疾^[4]、结核^[5]和流感^[6-7]。然而,腺病毒载体疫苗也存在一定的缺陷,主要是由于人群中普遍存在预存免疫现象(Preexisting immunity, PEI),即体内含有针对人腺病毒的抗体。据统计我国广州地区健康人群人5型腺病毒(Ad5)抗体阳性率达77.34%^[8],美国的Ad5抗体阳性率达35%,南非的Ad5抗体阳性率甚至达到90%^[9],预存免疫现象会直接削弱腺病毒疫苗载体的免疫效力,导致HIV腺病毒疫苗Ⅱ期临床失败的一个重要原因就是预存免疫现象,因此预存免疫是腺病毒载体疫苗研究人员需要重点考虑的问题。

美国国家卫生研究院过敏与传染病研究所(National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIAID)疫苗研究中心的Sullivan研究团队在埃博拉腺病毒载体疫苗研究领域做得非常出色。该团队于2000年证明了采用prime-boost免疫策略,即首先用包含埃博拉病毒GP蛋白和NP蛋白编码基因的DNA疫苗进行免疫,然后用包含埃博拉病毒GP蛋白的复制缺陷型Ad5腺病毒载体疫苗进行加强免疫,可以使非人灵长类动物食蟹猴获得针对扎伊尔型埃博拉病毒攻击的100%保护^[10]。该研究成果奠定了埃博拉腺病毒载体疫苗的基础。然而,该免疫策略需要耗时6个月,如此长的免疫周期显然无法满足埃博拉疫情快速爆发的需求。该研究团队又于2003年证明了采用分别包含埃博拉病毒GP蛋白和NP蛋白编码基因的复制缺陷型Ad5腺病毒载体疫苗免疫非人灵长类动物食蟹猴,只需免疫一次,就可以使其在免疫后28d抵御扎伊尔型埃博拉病毒的攻击,实现100%的保护。而且证明疫苗保护力与病毒特异性CD8⁺T细胞免疫反应和抗体直接相关^[11]。该研究成果大大缩短了疫苗的免疫周期,使其应用于埃博拉疫情防控成为可能,然而该疫苗在非人灵长

类动物的免疫剂量较高,需要 10^{12} 病毒颗粒(VPs),而且需要同时免疫两种腺病毒。于是,Sullivan研究团队进一步对该疫苗进行改进,并于2006年发表论文,他们在研究中发现体外过表达埃博拉病毒GP蛋白存在细胞致病性,因此他们尝试去除GP蛋白跨膜区,然而发现去除跨膜区的疫苗免疫保护力下降,于是他们将GP蛋白跨膜区第71位的天冬氨酸突变成谷氨酸,该位点也是GP蛋白的受体结合区^[12],突变后的GP蛋白不再具有细胞致病性。由于扎伊尔型和苏丹型是致死率最高的两个埃博拉病毒亚型,因此他们分别构建了表达这两个亚型的GP突变蛋白(E71D)的腺病毒,通过非人灵长类动物攻毒试验证明,只需 10^{10} VPs的免疫剂量即可100%保护针对食蟹猴的扎伊尔型埃博拉病毒的攻击,而且不需要NP蛋白的辅助^[13]。该研究成果将疫苗免疫剂量降低两个数量级,而且更加简洁,因此也更具有实用性。该疫苗很快进行了Ⅰ期临床试验,验证了其安全性和免疫原性,证明其可有效诱导机体产生针对埃博拉病毒的特异细胞免疫和体液免疫^[2]。一系列有利的实验数据证明了该疫苗的有效性,似乎该研究团队的埃博拉病毒疫苗已经接近成功,然而一个无法回避的问题摆在了他们面前,那就是他们所用的腺病毒载体是Ad5,预存免疫直接影响了该载体在人体上的应用,也就在2007年默克公司艾滋病腺病毒疫苗由于该原因导致Ⅱ期临床试验宣告失败。如何解决预存免疫现象,成为了该团队下一步需要解决的问题。2011年该团队发表论文说明他们选取了人群中血清阳性率较低的人腺病毒Ad26和Ad35作为载体制备埃博拉病毒疫苗,Ad5的预存免疫现象没有影响到该疫苗的免疫效力,但是Ad26单独免疫无法使非人灵长类动物获得完全保护,需要Ad35加强免疫才能获得完全保护^[14]。因此该疫苗策略不算完全成功,但是提示

了选取低血清阳性率的腺病毒载体开发疫苗是一个解决预存免疫的可选方案。该团队继续对疫苗进行改进,他们选取来源于黑猩猩的腺病毒 ChAd3 和 ChAd63 作为疫苗载体,实验证明 ChAd3 较 ChAd63 能产生更强的体液免疫和细胞免疫,而且采用 10^{10} VPs 的免疫剂量,免疫后 5 周即可使非人灵长类动物获得完全保护,与 Ad5 的结果相近,而 ChAd63 载体疫苗的存活率只有 25%。而且,将单独表达扎伊尔型埃博拉病毒 GP 蛋白的 ChAd3 和共同表达扎伊尔型和苏丹型埃博拉病毒 GP 蛋白的 ChAd3 免疫非人灵长类动物,获得了一致的保护效果,提示可以制备二价疫苗以获得更广谱的免疫保护。基于 ChAd3 的埃博拉病毒疫苗可以有效避免预存免疫的影响,而且能够实现快速保护,可用于疫情快速爆发期的防控。然而,研究发现基于 ChAd3 的埃博拉病毒疫苗免疫后其抗体和细胞免疫水平随着时间推移逐渐下降,在免疫后 10 个月再进行攻毒,已无法保护动物抵御致死剂量埃博拉病毒的攻击,即使将免疫剂量提高到 10^{11} VPs,保护力也只有 50%。于是他们再次尝试了 prime-boost 免疫策略,初免采用 ChAd3 疫苗,8 周后加强免疫分别采用 ChAd3、ChAd63 和一种基于牛痘病毒的埃博拉疫苗 MVA,免疫 10 个月后进行攻毒,只有 ChAd3/MVA 实现了完全保护。因此通过该免疫策略实现了埃博拉疫苗的长期保护^[15]。至此,该研究团队研制的基于 ChAd3 的埃博拉病毒疫苗可以同时实现快速和长期保护,而且能够有效避免人腺病毒预存免疫的影响,成为一个非常有潜力的埃博拉疫苗候选方案。该疫苗也已于 2014 年 9 月开始了 I 期临床试验,用于评价其安全性和免疫效力,临床试验分别评价了扎伊尔型和苏丹型双价疫苗 (Clinical Trials.gov number, NCT02231866) 和扎伊尔型单价疫苗 (Clinical Trials.gov number, NCT02240875)。I 期

临床试验结果显示该双价疫苗是安全的,而且可以诱导人体产生针对埃博拉病毒 GP 蛋白的特异性抗体以及 $CD4^+T$ 和 $CD8^+T$ 细胞免疫反应。免疫反应呈剂量依赖性, 10^{11} VPs 免疫剂量所引起的体液免疫和细胞免疫反应要优于 10^{10} VPs,提示该疫苗的有效免疫剂量需要 10^{11} VPs,高于前期研究中非人灵长类动物所需剂量^[16]。该疫苗将于 2014 年底或 2015 年初进行 II 期和 III 临床试验以评估其保护效力。葛兰素史克公司已获得授权生产该候选疫苗,用于西非疫情的防控。

加拿大公共卫生局国家微生物实验室的 Kobinger 研究团队在埃博拉腺病毒载体疫苗研究领域同样做出了重大的成绩。该团队早期就比较重视腺病毒预存免疫的问题,他们于 2006 年证明了采用基于黑猩猩 AdC7 腺病毒载体的埃博拉疫苗可以使小鼠和豚鼠获得扎伊尔型埃博拉病毒攻击的完全保护,而且可以避免 Ad5 腺病毒预存免疫的影响,而基于 Ad5 腺病毒载体埃博拉疫苗无法在含有 Ad5 抗体的小鼠中实现有效保护^[17]。该研究成果虽然没有进行非人灵长类动物实验,但为埃博拉腺病毒载体疫苗有效解决预存免疫问题提供了重要启示。前期埃博拉腺病毒载体疫苗的接种途径都是肌肉注射,是否可以通过其他途径来回避预存免疫现象呢?前期研究证明 HIV、狂犬病、结核病和单纯疱疹病毒的腺病毒载体疫苗可以通过粘膜免疫途径实现有效的保护^[18-19],那么埃博拉腺病毒载体疫苗是否也可以采取粘膜免疫途径呢?该团队在 2007 年证明了埃博拉腺病毒载体疫苗通过粘膜免疫途径是可行的,他们通过口服和鼻腔接种基于 Ad5 腺病毒载体的埃博拉疫苗,可以使小鼠被致死剂量的鼠适应埃博拉病毒攻击后获得完全保护,而且能诱导较好的体液免疫和细胞免疫反应^[20],2008 年他们继续证明了通过鼻腔接种是可以使疫苗免疫效果不受预存免疫

影响的,而肌肉注射和口服无法使被攻毒的小鼠获得完全保护^[21]。该研究成果为埃博拉腺病毒载体疫苗回避预存免疫提供了一个新方向,而且通过鼻腔接种,较传统的肌肉注射更为方便和安全,除诱导全身免疫反应外还能诱导呼吸道粘膜免疫。然而,高剂量的腺病毒免疫对机体是有毒性的^[22],如何能够降低腺病毒载体疫苗的免疫剂量?该团队于2009年发表论文提出了解决方案,他们将以前构建的基于Ad5腺病毒载体的埃博拉疫苗的启动子替换为CAG启动子(包含一个鸡 β -actin启动子和一个巨细胞病毒早期增强子元件),引入一个Kozak序列,并对GP蛋白编码序列进行了优化,改进后的腺病毒载体疫苗只需使用原始疫苗的1/100免疫剂量即可使小鼠获得完全保护,甚至该疫苗使暴露30 min后的小鼠获得了完全保护,提示该疫苗存在治疗暴露后感染的可能^[23]。该团队前期的研究一直采用的小鼠模型,他们于2011年在豚鼠模型上进行了验证,结果表明采用改进的腺病毒载体疫苗通过鼻腔接种可以使存在预存免疫的豚鼠获得完全保护,而未改进的疫苗通过鼻腔接种未获得完全保护,通过肌肉注射接种的疫苗保护力则更弱^[24]。该研究结论进一步在豚鼠上证明了鼻腔接种埃博拉腺病毒载体疫苗的可行性。同年,该团队证明了将改进的疫苗与表达 α 型干扰素的腺病毒同时接种,可以使小鼠和豚鼠在暴露30–60 min后依然获得完全保护,提示该方案可用于暴露后感染的紧急预防^[25]。该团队已经在小鼠和豚鼠模型上验证了他们的疫苗方案,下一步需要进一步在非人灵长类动物上进行验证。终于,在2013年该团队发表论文,验证了通过呼吸道接种改进的腺病毒载体疫苗与表达 α 型干扰素的腺病毒,可以使食蟹猴在预存免疫的情况下获得75%的保护,而肌肉接种未达到保护效果。而且他们发现呼吸道接种所诱导的细

胞免疫反应并不受预存免疫影响,而肌肉接种却受到明显影响,这也许是呼吸道接种成功的原因^[26]。该结果证明了在非人灵长类动物上,呼吸道接种是可以有效避免预存免疫问题的,但是与Sullivan研究团队的完全保护相比,其保护效力并不尽如人意。后来该团队与德克萨斯大学奥斯汀分校药学院的Choi等合作将疫苗与3-二甲氨基丙胺混合后通过呼吸道接种食蟹猴,在免疫后150 d攻毒竟然依然获得了完全保护^[27],提示通过改进疫苗配方,只需一次免疫即可获得长期保护,该研究结果很有意义,但是考虑到3-二甲氨基丙胺具有毒性,因此该免疫方案的安全性尚需进一步评估。

美国陆军传染病医学研究所也进行了埃博拉病毒腺病毒载体疫苗的相关研究,然而他们的侧重点是制备多价疫苗。考虑到埃博拉病毒的扎伊尔型和苏丹型对人的致死率最高,马尔堡病毒(与埃博拉病毒同属丝状病毒科)尽管只分一个型,但不同毒株之间的抗体结合区差能达到50%^[28],导致不同毒株间的抗体无法实现交叉保护。这些高致死率的丝状病毒可以被用于生物恐怖袭击,因此一旦受到恐怖袭击或疫情爆发,在病源不能马上被确定的情况下,一种可以覆盖大部分丝状病毒的多价疫苗是必不可少的。该研究所研制了一种基于Ad5sub360腺病毒的复杂腺病毒载体(cAdVax),与传统的腺病毒载体相比,可以同时表达多个基因,因此更适合用于多价疫苗的研究^[29–31]。他们利用该载体制备了苏丹型和扎伊尔型埃博拉病毒的二价疫苗,可以使C57BL/6和BALB/c小鼠获得完全保护^[32]。另外他们将马尔堡病毒Musoke和Ci67毒株制备了二价疫苗,发现可以使小鼠和豚鼠被3种马尔堡病毒Musoke、Ci67和Ravn毒株攻毒,均获得完全保护^[33]。于是他们进一步将包含苏丹型、扎伊尔型埃博拉病毒以及马

尔堡病毒 Musoke、Ci67 和 Ravn 毒株的 GP 蛋白和扎伊尔型埃博拉病毒以及马尔堡病毒 Musoke 的 NP 蛋白两两组合, 构建了 4 个载体疫苗, 两次免疫食蟹猴后进行攻毒, 实验结果表明免疫组可以实现对两种埃博拉病毒和 3 种马尔堡病毒的完全保护^[34]。该研究成果为埃博拉病毒和马尔堡病毒多价疫苗的研究奠定了基础。但是该疫苗需要免疫两次, 在 15 周后才能产生保护力, 如此长的免疫周期限制了该疫苗的应用。该研究团队又尝试了苏丹型和扎伊尔型埃博拉病毒的二价疫苗对气溶胶的攻毒保护力, 发现只需一次免疫即可产生对扎伊尔型病毒的完全保护, 两次免疫可以产生对苏丹型病毒的完全保护, 甚至加强免疫还可以避免预存免疫的影响^[35]。该研究成果对于防止以气溶胶形式的生物恐怖袭击具有较大的意义, 而且也提出了加强免疫是一种可以在紧急情况有效避免预存免疫影响的策略。

另外还有一些实验室也进行了埃博拉腺病毒载体疫苗的研究, 美国宾夕法尼亚大学医学院的 Roy 等与加拿大公共卫生局的 Kobinger 研究团队合作, 利用一个猴腺病毒 22 型和 21 型嵌合体载体表达扎伊尔型埃博拉病毒 GP 蛋白, 制备的疫苗可以使致死剂量埃博拉病毒攻击的小鼠获得完全保护^[36]。德克萨斯大学奥斯汀分校药学院的 Choi 等尝试将基于 Ad5 的埃博拉疫苗舌下接种, 这样可以不用像口服那样进入胃肠道, 但是实验结果表明其小鼠攻毒保护率只有 80%, 在预存免疫的情况下保护率为 33.3%, 尽管高于肌肉注射组的 20%, 但显然其保护率无法满足需要, 不过如果降低诱导预存免疫的 Ad5 剂量至 1/5, 舌下接种还是可以实现完全保护的^[37]。该团队后来研究证明腺病毒预存免疫可以通过降低疫苗的特异性 CD8⁺T 细胞反应和抗体水平以削弱疫苗的保护效力^[38]。腺病毒载体疫苗可以保护非人灵长类动物抵御埃

博拉病毒的攻击, 其具体免疫保护机制是什么? 美国国家卫生研究院疫苗研究中心的 Sullivan 研究团队给出了他们的答案。他们认为 CD8⁺T 细胞反应在基于 Ad5 腺病毒的埃博拉疫苗的免疫保护上起到决定作用, 而非 CD4⁺T 细胞反应和体液免疫^[39]。然而, 加拿大公共卫生局国家微生物实验室给出了不同的答案, 他们评价了小鼠、豚鼠和食蟹猴接种埃博拉腺病毒载体疫苗和 VSV 载体疫苗的体液免疫反应和细胞免疫反应, 实验结果表明体液免疫在埃博拉疫苗的免疫保护中起关键作用, 而细胞免疫只起到辅助作用, 只有在疫苗诱导的抗体水平不高时, 细胞免疫才会发挥更重要的作用^[40]。尽管两个实验室在腺病毒载体埃博拉病毒疫苗的免疫保护机理上的观点不一致, 但依然对于埃博拉腺病毒载体疫苗的研究具有一定的指导意义。

1.2 水疱性口炎病毒载体疫苗

水疱性口炎病毒 (Vesicular stomatitis virus, VSV) 载体是近年发展较快的一种 RNA 病毒载体, 其具有可高效表达外源基因、安全性高、易于操作、可粘膜免疫和不受预存免疫影响的优点, 已被应用于 HIV^[41-43]、SARS^[44]、流感^[45-47]、乙肝^[48-49]和丙肝^[50]等疾病的疫苗研究, 是除腺病毒载体以为应用最为广泛的疫苗载体。与复制缺陷型腺病毒载体相比, VSV 载体具有复制能力, 因此免疫剂量较腺病毒载体疫苗少, 不过有些研究人员认为作为一种活病毒载体, 其具有潜在的生物安全风险。

加拿大公共卫生局国家微生物实验室除进行埃博拉腺病毒载体疫苗的研究外, 也进行了基于 VSV 载体的埃博拉病毒疫苗研究, 并于 2004 年就将 VSV 的 GP 蛋白基因替换为扎伊尔型埃博拉病毒的 GP 蛋白基因, 制备了 VSV 载体埃博拉病毒疫苗, 免疫小鼠后用扎伊尔型埃博拉病毒小鼠适

应株进行攻毒，小鼠获得了完全保护^[51]，而且由于去除了 VSV 的 GP 蛋白基因，降低其复制能力，因此相应提高了安全性。该研究成果为基于 VSV 载体的埃博拉病毒疫苗研究奠定了基础。该实验室 Jones 等在 2005 年将该疫苗免疫食蟹猴并于 28 d 后攻毒，发现食蟹猴获得了完全保护，而且疫苗诱导了明显的体液和细胞免疫反应。同时他们也验证了马尔堡病毒并获得了相似的结果^[52]。该研究成果首次在非人灵长类动物上验证了基于 VSV 载体的埃博拉病毒疫苗的可行性，而且只需免疫一次即可获得快速完全保护，具有很好的实用价值。由于该疫苗可以迅速诱导机体免疫反应，那么它是否可用于暴露后的紧急预防和治疗呢？该实验室进一步的研究结果给出了答案，Feldmann 等发现在豚鼠和小鼠被攻毒 24 h 后接种基于 VSV 载体的埃博拉病毒疫苗，可以实现 50% 和 100% 的保护，远超腺病毒载体疫苗 30–60 min 的保护期，甚至在恒河猴被扎伊尔型埃博拉病毒暴露后 20–30 min 内接种也实现了 50% 的保护^[53]，而采用苏丹型埃博拉病毒攻毒后 20–30 min 内接种可实现 100% 的保护^[54]，提示该疫苗有作为暴露后紧急预防的潜在应用价值。德国一名女科学家在实验操作中被含有扎伊尔型埃博拉病毒的针头扎伤，及时接种了 VSV 载体埃博拉病毒疫苗，未出现出血热症状，这也是首例暴露后用该疫苗进行紧急接种的案例^[55]。VSV 具有可以自然感染机体粘膜的特点，因此基于它的埃博拉病毒载体疫苗是否可以通过鼻腔或口服接种？该实验室于 2009 年证明了这一点，他们分别通过鼻腔、口服和肌肉给食蟹猴接种基于 VSV 载体的埃博拉病毒疫苗，28 d 后用扎伊尔型埃博拉病毒进行攻毒，3 种接种方式均获得了完全保护，该结果优于腺病毒载体疫苗 75% 的保护率，说明 VSV 载体疫苗更适合进行粘膜免疫。另外，他们还检测了接种后

的体液免疫和细胞免疫反应，粘膜接种的体液免疫反应要强于肌肉注射，鼻腔接种后 IgG 抗体水平是肌肉注射的 9 倍；肌肉注射的细胞免疫反应要强于粘膜接种，但在攻毒后被粘膜接种反超^[56]。这些结果表明，基于 VSV 载体的埃博拉病毒疫苗比腺病毒载体埃博拉病毒疫苗更适合进行粘膜接种，而且有可能比肌肉接种效果更好，因此该疫苗也更安全，使用更方便。前面的研究结果已经证明了该疫苗可以诱导动物产生快速保护，那么它是否也能诱导产生长期保护呢？该实验室进一步在小鼠和豚鼠上进行了验证，实验结果表明小鼠免疫后 6.5 和 9 个月均能实现完全保护，直到 12 个月也能达到 80% 的保护率，豚鼠在免疫后 12 和 18 个月均能达到完全保护^[57]，提示该疫苗在啮齿动物上具有很好的长期保护效果，但是在非人灵长类动物上如何，还需进一步验证。

波士顿大学医学院的 Geisbert 等也进行了基于 VSV 载体的埃博拉病毒疫苗研究，他们于 2008 年在食蟹猴上证明了基于 VSV 载体的埃博拉病毒疫苗可以使其被扎伊尔型埃博拉病毒以气溶胶形式攻毒后获得完全保护，而且马尔堡病毒疫苗也能获得一致的结果^[58]。该研究成果提示 VSV 载体疫苗可用于气溶胶形式的埃博拉病毒生物恐怖袭击的防控。该研究团队还进行了埃博拉病毒和马尔堡病毒多价疫苗的研究，他们将分别包含扎伊尔型、苏丹型埃博拉病毒和马尔堡病毒 GP 蛋白的 VSV 载体疫苗混合后免疫食蟹猴，然后分别用扎伊尔型、苏丹型、科特迪瓦型埃博拉病毒和马尔堡病毒进行攻毒，发现食蟹猴获得了完全保护^[59]。该研究成果提示了制备多价 VSV 载体疫苗的可能，而且只需免疫一次，即可获得对多个丝状病毒的保护。另外，由于埃博拉疫情主要在非洲爆发，而非洲的 HIV 感染率较高，HIV 会导致人体免疫功能缺陷，VSV 载体疫苗作为一种具有复制

能力的活病毒疫苗在 HIV 感染人群中是否存在潜在危险呢? 该研究团队给感染猴-人免疫缺陷病毒 (SHIV) 的恒河猴接种 VSV 载体埃博拉病毒疫苗, 结果表明实验组未出现任何发病迹象, 提示了 VSV 载体疫苗在 HIV 感染人群中应该还是比较安全的^[60]。该研究团队也进行了马尔堡病毒 VSV 载体疫苗的研究, 并证明了该疫苗可以使恒河猴暴露后 24 h 接种依然能够获得 5/6 的存活率^[61], 而且使食蟹猴在免疫后 14 个月攻毒依然能够获得完全保护^[62]。美国国家卫生研究院与加拿大公共卫生局国家微生物实验室合作进行了埃博拉病毒和安第斯病毒 (Andes virus, ANDV) 二价 VSV 载体疫苗的研究, 他们将埃博拉病毒和安第斯病毒的 GP 蛋白在一个 VSV 载体上同时表达, 免疫叙利亚仓鼠上使其获得了针对两种病毒的完全保护, 证明了 VSV 二价载体疫苗的可行性^[63]。

基于 VSV 载体的埃博拉疫苗可以使啮齿动物和非人灵长类动物获得针对埃博拉病毒的完全保护, 其具体的免疫保护机制是什么? 美国国家卫生研究院过敏与传染病研究所病毒学实验室的 Marzi 等给出了答案, 他将食蟹猴的 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞通过单克隆抗体分别去除掉, 然后接种疫苗并于免疫后 28 d 进行攻毒。结果显示去除 CD4⁺T 细胞导致动物无法生成针对埃博拉病毒 GP 蛋白的特异性抗体, 进而攻毒后未出现有效保护, 而去除 CD8⁺T 细胞的动物依然产生了针对 GP 蛋白的特异性抗体 IgG, 获得了完全保护。为了进一步证明是抗体在动物获得保护中起决定作用而非 CD4⁺T 细胞免疫所致, 他们又在动物攻毒前 7d、3 d 和攻毒后 4d 去除 CD4⁺T 细胞, 这样不会影响特异抗体的生成和 CD8⁺T 细胞反应, 结果显示动物获得了完全保护, 提示 CD4⁺T 细胞免疫在动物获得保护力上不具有关键作用。另外, 在所有动物实验组, 细胞免疫反应都较低。因此他们得出

结论, 抗体是 VSV 载体埃博拉病毒疫苗诱导产生保护力的关键因素^[64]。该研究结果进一步证明了埃博拉病毒特异性抗体的重要性, 那么针对埃博拉病毒的特异性抗体能否用于暴露后治疗呢? 加拿大公共卫生局的 Qiu 等给出了非常有价值的答案, 他们给恒河猴感染致死剂量的埃博拉病毒, 并分别与第 3、4、5 天开始使用一种由 3 个针对埃博拉病毒 GP 蛋白的单克隆抗体组成的混合物 ZMapp 进行治疗, 结果显示即使在第 5 天已经出现临床症状的情况下, ZMapp 依然可以使埃博拉出血热病症消除并完全治愈^[65]。该研究成果提示该单克隆抗体混合物 ZMapp 可用于埃博拉感染早期的治疗, 尽管有学者质疑 5 d 是否太短, 但 ZMapp 无疑是目前临床前研究中治疗效果最好的药物, 而且该药物也已经用于 4 个埃博拉感染患者的治疗, 其中两个已经痊愈^[66]。由于基于 VSV 载体的埃博拉病毒疫苗在非人灵长类动物上能够实现快速有效的保护, 而且具有很好的安全性, 因此该疫苗也已于今年 10 月开始了 I 期临床试验, 用于评价其安全性和免疫效力 (Clinical Trials.gov number, NCT02280408), 并有望与腺病毒载体埃博拉疫苗一起在西非进行 II 期和 III 期临床试验。该候选疫苗前期已授权给纽琳基因公司 (NewLink Genetics Corp), 后来考虑到默克公司在疫苗领域的丰富经验, 纽琳基因公司又将该疫苗授权给了默克公司。由于该疫苗较腺病毒疫苗接种剂量要少得多 (仅需要 10⁶ VPs 的免疫剂量, 甚至更低), 因此到 2015 年上半年即可生产足够的剂量用于西非疫情的防控。

1.3 DNA 疫苗

DNA 疫苗是研究最早的核酸载体疫苗, 由于其具有可同时诱导体液免疫和细胞免疫反应、可形成长期免疫保护和易于制备的优点, 已被广泛应用于病毒、细菌和寄生虫病疫苗的研究, 已有

多个疫苗进入了临床试验阶段,并且2005年首个预防马西尼罗病毒感染的DNA疫苗West Nile-Innovator DNA获得批准上市。然而DNA疫苗也存在质粒导入宿主细胞效率不高,免疫效果不强,接种途径复杂的缺点,限制了其使用。

密歇根大学医学中心的Xu等早在1998年就制备了可表达埃博拉病毒GP蛋白、分泌型GP蛋白(sGP)和NP蛋白的DNA疫苗,免疫豚鼠两个月后进行攻毒,GP组和NP组均实现了完全保护,分泌型GP组只实现了5/6的保护率。而且他们发现疫苗的保护率与抗体和细胞免疫反应直接相关^[67]。同年,美国陆军传染病医学研究所的Vanderzanden等也证明了通过4-5次免疫表达GP蛋白的DNA疫苗然后进行攻毒,可以使小鼠获得完全保护^[68]。这些研究成果开辟了埃博拉核酸载体疫苗研究的先河,为以后的各种不同类型埃博拉载体疫苗研究奠定了基础。埃博拉病毒DNA疫苗也分别于2003、2008和2009年进行了I期临床试验,证明了其安全性和免疫原性^[69-70]。美国陆军传染病医学研究所的Grant-Klein等于2012年制备扎伊尔型、苏丹型埃博拉病毒和马尔堡病毒的三价DNA疫苗,并实现了对小鼠的完全保护^[71],提示了制备多价DNA疫苗的可能。由于DNA疫苗导入宿主细胞效率不高,影响了其免疫效率,因此未见单独将埃博拉病毒DNA疫苗应用于非人灵长类动物的研究报道,不过它可与其他载体疫苗配合使用以形成长期免疫保护^[10]。

1.4 人3型副流感病毒载体疫苗

人3型副流感病毒(Human parainfluenzavirus type 3, HPIV3)是一种常见的儿童呼吸道病原体,该病毒只局限于呼吸道内腔上皮细胞复制,不会向其他组织扩散,因此具有很好的安全性,而且它可以自然感染呼吸道,能诱导呼吸道粘膜免疫反应。因此近些年有科学家开始利用该病毒研究

载体疫苗^[72]。美国国家卫生研究院过敏与传染病研究所的Bukreyev等开展了基于HPIV3载体的埃博拉病毒疫苗研究,他们将埃博拉病毒的GP蛋白基因单独插入HPIV3的基因组或与NP蛋白基因共同插入HPIV3的基因组,构建了可单独表达GP蛋白或共表达GP和NP的HPIV3载体疫苗,通过鼻腔接种豚鼠,28d后攻毒,两种疫苗免疫组均获得了100%的保护率^[73]。他们继续在恒河猴上验证该疫苗的保护效率,结果显示通过呼吸道(鼻腔和气管)接种一次该疫苗即可使恒河猴获得88%的保护率,接种两次就可使其获得完全保护,该结果与腺病毒载体疫苗效果相当,但低于VSV载体疫苗的完全保护率。而且他们证明了动物体内针对病毒特异的抗体IgG滴度与保护率直接相关,当抗体滴度在8.6-10.6 log₂时保护率为78%,而滴度达到12.6-14.6 log₂时,保护率达到100%,未看到细胞免疫反应与保护率存在明显的相关性,而且他们发现NP蛋白在疫苗中并未起到增强作用^[74]。该研究成果首次验证了HPIV3载体埃博拉病毒疫苗可使非人灵长类动物获得保护,但HPIV3与腺病毒类似,存在预存免疫现象,这也是该疫苗需要解决的一个重要问题。为了验证HPIV3预存免疫对疫苗免疫效果的影响,他们在豚鼠模型上进行了实验,结果显示预存免疫现象能够影响HPIV3的复制,但对疫苗表达的GP蛋白免疫原性影响有限,疫苗免疫一次后在存在HPIV3抗体的豚鼠体内产生的针对GP蛋白的抗体滴度只是略低于无HPIV3抗体的豚鼠,二次免疫后两者抗体滴度达到一致^[75],后来他们在恒河猴上也获得了类似的结果^[76],只可惜没有进行攻毒试验,无法确定其免疫保护率。由于HPIV3只局限于呼吸道内腔的上皮细胞,不会向其他地方扩散^[77],因此该病毒载体相对比较安全,然而埃博拉病毒GP蛋白具有识别细胞受体与侵入的功

能,那么在 HPIV3 基因组中插入埃博拉病毒 GP 蛋白能否改变 HPIV3 的组织嗜性,进而改变其安全性呢?该研究团队通过对豚鼠模型的研究证明了 HPIV3 载体埃博拉病毒疫苗并未改变 HPIV3 的组织嗜性,确定了该疫苗的安全性^[75]。尽管该团队在豚鼠和恒河猴上证明了预存免疫现象对 HPIV3 载体埃博拉病毒疫苗的免疫原性影响有限,通过两次疫苗接种即可解决这个问题,但是如果能对该疫苗进行进一步的改造,降低其病毒载体的免疫原性将有可能进一步减少预存免疫对其的影响。考虑到 HPIV3 共有两个膜蛋白:HN 和 F,分别负责受体识别和膜融合,而埃博拉病毒的 GP 蛋白也是负责受体识别和膜融合。因此该团队尝试去除 HPIV3 的 HN 和 F 蛋白,由埃博拉病毒的 GP 蛋白代替其功能,结果显示他们成功包装出了不含 HN 和 F 蛋白的 HPIV3 载体埃博拉病毒疫苗,该载体疫苗在动物上显示出明显的致弱,但并不影响 GP 蛋白的免疫原性,能够完全保护豚鼠免受致死剂量埃博拉病毒的攻击,更重要的一点是该疫苗完全不被针对 HPIV3 的抗体识别,也就是说不再受预存免疫的影响^[78]。该研究成果不仅解决了 HPIV3 载体疫苗的预存免疫问题,而且由于病毒载体疫苗高度致弱增加了其安全性,还有一点就是由于去除了 HN 和 F 蛋白使得载体疫苗表达的 GP 蛋白密度增加了一倍,从而增加了其抗原性。HPIV3 载体埃博拉病毒疫苗能够实现非人灵长类动物完全保护,具有很好的发展前景。

1.5 狂犬病毒载体疫苗

狂犬病毒 (Rabies virus, RV) 载体是近年发展起来的一种新型疫苗载体,已被用于 HIV^[79-82]、SARS^[83]以及丙肝疫苗^[84]的研究。狂犬病毒减毒和灭活疫苗已被应用多年,表现出了很好的安全性,而且狂犬病还是非洲的一个重要的人畜共患病,每年感染死亡人数超过两万人^[85-87],因此制备一

种狂犬病毒和埃博拉病毒的二价疫苗对于非洲具有重要的现实意义。美国国家卫生研究院过敏与传染病研究所的 Blaney 等利用狂犬病毒载体进行了埃博拉病毒疫苗的研究,他们将扎伊尔型埃博拉病毒的 GP 蛋白编码基因插入狂犬病毒 N 和 P 基因之间,实现了 GP 蛋白的表达。为了降低狂犬病毒的神经过敏性,他们分别尝试了将狂犬病毒 GP 蛋白 333 位的精氨酸突变为谷氨酸或直接将狂犬病毒 GP 蛋白编码基因敲除。然后他们将改造的活病毒载体疫苗和灭活病毒载体疫苗免疫小鼠,结果显示免疫的小鼠可以同时抵御致死剂量埃博拉病毒和狂犬病毒的攻击^[88]。该研究团队进一步评估了该疫苗的安全性,研究发现点突变和缺失狂犬病毒 GP 蛋白的载体疫苗在成年小鼠上未显示出任何毒性,在乳鼠上缺失狂犬病毒 GP 蛋白的载体疫苗依然未表现出任何毒性,证明了基于狂犬病毒载体的埃博拉病毒疫苗具有很好的安全性^[89]。继而,该研究团队又评估了该疫苗的细胞免疫和体液免疫反应以及预存免疫对该疫苗的影响,结果显示灭活和活载体疫苗均诱导了针对埃博拉病毒 GP 蛋白细胞免疫反应;灭活载体疫苗可以同时诱导生成针对狂犬病毒 GP 蛋白和埃博拉病毒 GP 蛋白的抗体,即使和其他灭活疫苗同时免疫也不会受到干扰;有意思的是未看到预存免疫现象对灭活载体疫苗的干扰^[90]。这些研究成果证明了基于狂犬病毒载体的埃博拉病毒疫苗在啮齿动物上具有很好的免疫原性、安全性和保护力。终于,该研究团队在 2013 年发表了他们在非人灵长类动物上的研究结果^[91],结果显示 R333E 点突变的活载体疫苗可以使恒河猴获得 100% 保护,而去掉狂犬病毒 GP 蛋白的活载体疫苗和灭活疫苗只实现了 50% 的保护。另外他们发现埃博拉病毒特异性抗体与保护率直接相关,结果与其他类型的埃博拉病毒载体疫苗一致^[40,64,74],而且获得保护的动物体内

的 IgG1 型抗体要明显高于 IgG2 型抗体。前期研究发现尽管保护率与埃博拉病毒特异性抗体直接相关,但与中和抗体并不具有相关性^[40,92],而抗体依赖细胞介导的细胞毒活性 (ADCC) 是依赖 IgG1 型抗体的,因此他们的研究结果提示了 ADCC 可能在埃博拉病毒载体疫苗中起到了关键作用。在非人灵长类动物实验中,该疫苗未引起动物出现任何临床症状,表现出了很好的安全性。Blaney 等研究的基于狂犬病毒载体的埃博拉病毒疫苗可以实现非人灵长类动物的完全保护,而且具有很好的安全性,因此具有很好的发展前景,尽管去除狂犬病毒 GP 蛋白复制缺陷型载体疫苗和灭活载体疫苗未表现出很好的保护力,但可以通过后续进一步的优化以提高其免疫保护力。

1.6 其他核酸载体疫苗

除上面介绍的 5 种核酸载体疫苗外,科学家们还尝试了用多种其他的核酸载体进行埃博拉病毒疫苗的研究。美国陆军传染病医学研究所 Geisbert 等构建了表达埃博拉病毒 GP 蛋白的重组牛痘病毒载体疫苗,可以使豚鼠获得 60% 的保护率^[93],但是无法使食蟹猴免受致死剂量埃博拉病毒的攻击^[94]。不过该疫苗却可以用于腺病毒载体埃博拉疫苗的加强免疫^[15]。该研究所的 Pushko 等利用委内瑞拉马脑炎病毒 (Venezuelan equine encephalitis virus, VEEV) RNA 复制子载体进行了埃博拉病毒疫苗的研究,他们将表达埃博拉病毒 GP 蛋白的载体疫苗免疫小鼠和豚鼠,可以使其获得致死剂量埃博拉病毒攻击的完全保护,与表达埃博拉病毒 NP 蛋白的载体疫苗混合免疫也能达到同样效果,但是单独免疫表达埃博拉病毒 NP 蛋白的载体疫苗只能使小鼠获得完全保护^[95]。然后他们又尝试制备埃博拉和拉沙病毒二价疫苗,他们将分别表达埃博拉和拉沙病毒 GP 蛋白的载体疫苗混合免疫豚鼠,豚鼠可以抵御两种病毒的攻

击,然而他们将博拉和拉沙病毒 GP 蛋白同时表达在一个载体疫苗上,免疫豚鼠后只对拉沙病毒产生了完全保护^[96]。然后该实验室又在食蟹猴上评价了该疫苗的保护力,遗憾的是该疫苗未能有效保护食蟹猴免受致死剂量扎伊尔型埃博拉病毒的攻击^[94]。该研究项目至此陷于停顿,直到 10 多年后,该实验室的 Herbert 等又证明了表达苏丹型埃博拉病毒 GP 蛋白的 VEEV 载体疫苗只需免疫一次即可保护苏丹型埃博拉病毒致死剂量的攻击,免疫两次可以抵御气溶胶形式的攻击^[97],为该研究项目又带来了一丝曙光。美国国家卫生研究院过敏与传染病研究所的 Bukreyev 研究团队为了减少 HPIV3 预存免疫的影响,尝试了一种禽源副粘病毒新城疫 (Newcastle disease virus, NDV) 作为载体制备埃博拉病毒疫苗,并在恒河猴上验证了其免疫效力,结果显示一免和二免后针对埃博拉病毒 GP 蛋白的特异性抗体滴度均低于 HPIV3 载体埃博拉病毒疫苗的水平,不过呼吸道分泌的 IgA 水平与 HPIV3 载体疫苗免疫水平相当^[98],提示该疫苗可以诱导较好的粘膜免疫反应,但作为一种禽源病毒,无法有效在哺乳动物细胞中复制,影响了其免疫效力,不过也许其可配合其他载体疫苗作为加强免疫用。法国里昂第一大学的 Reynard 等尝试用库京病毒 (Kunjin virus) 载体表达埃博拉病毒 GP_{D637L} 蛋白,免疫豚鼠可以使其获得剂量依赖性保护^[99]。通过对不同载体平台的尝试,为埃博拉疫苗的研究积累了大量的经验,但与研究的较为充分的 Ad, VSV, HPIV3 和 RV 载体相比,依然需要做进一步的深入研究。

1.7 病毒样颗粒疫苗

病毒样颗粒 (Virus-like particles, VLPs) 是单独由病毒衣壳蛋白或与囊膜蛋白共同自主包装形成的空衣壳结构, VLPs 能够模拟天然病毒粒子,能有效刺激机体产生体液免疫和细胞免疫应答。

而且病毒样颗粒不含有核酸遗传物质,安全性好。由于 VLPs 疫苗比传统灭活和减毒活疫苗更加安全有效,因此已被用于多种疾病疫苗的研究,包括 HIV^[100]、流感^[101-102]、丙肝^[103]、肠道病毒^[104-105]和细小病毒^[106]等。目前已有两个人乳头瘤病毒 VLPs 疫苗上市 (Cervix 和 Gardasil),用于预防该病毒的感染^[107]。美国陆军传染病医学研究所 Bavari 等早在 2002 年就发现了将埃博拉病毒的跨膜蛋白 GP 和基质蛋白 VP40 在 293T 细胞中共表达可以组装出 VLPs,电镜观察显示 VLPs 与埃博拉病毒颗粒形态相似^[108],同年日本北海道大学的 Takeshi Noda 等发现了同样的现象,而且他们认为 VP40 在 VLPs 组装中起到了关键作用^[109]。该研究成果提示了开发埃博拉 VLPs 疫苗的可能。美国陆军传染病医学研究所 Warfield 等在前期研究基础上,进一步证明了埃博拉 VLPs 可以活化和成熟小鼠骨髓来源的树突状细胞,提示其具有刺激机体免疫反应的潜力,然后将埃博拉 VLPs 免疫小鼠,发现可以活化小鼠的 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞以及 B 细胞,并诱导生成针对埃博拉病毒的特异抗体,攻毒试验显示可以使小鼠获得完全保护^[110],后来证明也可以使豚鼠获得完全保护^[111]。该实验室的 Swenson 等尝试了埃博拉和马尔堡病毒双价 VLPs 疫苗的研究,他们首先制备了两种病毒的杂交 VLPs,发现免疫保护效果一般,然后将两种病毒的 VLPs 混合后免疫豚鼠,实现了≥90%的保护率,而且他们证明了 VLPs 中的 GP 蛋白在免疫保护中起到核心作用^[112]。后来该实验室的 Warfield 等在小鼠上分析了埃博拉 VLPs 免疫保护的机制,他们发现体液免疫和细胞毒性 CD8⁺T 细胞免疫反应在埃博拉 VLPs 免疫保护中均是必不可少的^[113]。埃博拉 VLPs 尽管在啮齿动物上证明可诱导很好的免疫保护,那么能否在灵长类动物上也诱导免疫保护呢?研究发现埃博拉病毒可以

感染人树突细胞,但是不能促使其成熟,进而无法诱发免疫反应^[114-115],那么不包含遗传物质的埃博拉 VLPs 呢?该实验室与美国弗雷德里克临床研究管理处合作研究证明了埃博拉 VLPs 可以诱导人树突细胞成熟^[116],为埃博拉 VLPs 在灵长类动物上的研究奠定了理论基础。该实验室的 Warfield 等在 2007 年证明了给食蟹猴 3 次接种埃博拉 VLPs 疫苗 (由 GP、NP 和 VP40 组成) 后,采用扎伊尔型埃博拉病毒攻毒,可以使食蟹猴获得 100%的保护,而且疫苗诱导动物产生了明显的体液和细胞免疫反应^[117]。该研究成果首次证明了埃博拉 VLPs 疫苗可以实现对非人灵长类动物的完全保护,尽管该疫苗的免疫周期长达 4 个月,但是考虑到它的安全性和无预存免疫干扰的优势,依然有望用于存在潜在感染风险的人群如在生物安全等级四级实验室工作的科研人员和非洲人群。

埃博拉 VLPs 疫苗要真正实际应用,还要解决其生产的问题,由于前期研究的 VLPs 均由 293T 生产,无法满足大量生产。杆状病毒昆虫细胞表达系统已被应用于多个病毒 VLPs 的生产,美国埃默里大学的 Ye 等尝试用该系统表达埃博拉 VLPs,他们成功地用该系统实现了埃博拉 VLPs 高水平的表达和组装。他们生产的埃博拉 VLPs 可以诱导小鼠生成埃博拉病毒特异的抗体并阻断埃博拉假病毒的感染,而且可以刺激人树突细胞分泌细胞因子^[118]。美国陆军传染病医学研究所 Warfield 等也成功地利用该系统生成了由埃博拉病毒 GP、NP 和 VP40 组装而成的 VLPs,并证明了该 VLPs 可以成熟人髓样树突状细胞,免疫小鼠后诱导与 293T 细胞来源的 VLPs 相同的细胞免疫和体液免疫反应,并能保护小鼠免受致死剂量埃博拉病毒的攻击,保护效力呈剂量依赖性。埃博拉 VLPs 疫苗较载体疫苗更为安全,如果能够进一步提高

其免疫原性, 缩短免疫周期, 其有望成为最有潜力的埃博拉疫苗。

1.8 灭活和复制缺陷型疫苗

灭活疫苗是目前应用最广泛的疫苗, 也是埃博拉病毒疫苗最早研究所采取的方案。美国陆军传染病医学研究所 Lupton 等早在 1980 年就采用热灭活和福尔马林灭活的方法制备了扎伊尔型埃博拉病毒的灭活疫苗, 该疫苗可以使豚鼠获得完全保护, 但是对照组死亡率只有 30.8%, 所以无法很好地评价该疫苗的保护效力^[119]。后来美国沃尔特里德陆军研究所的 Rao 等用脂质体包被 γ -射线灭活的埃博拉病毒, 免疫小鼠后实现了完全保护^[120]。提示通过改进工艺可以提高埃博拉病毒灭活疫苗的保护效力。由于存在潜在的生物安全风险, 埃博拉病毒灭活疫苗不适合在人体使用, 有研究证明马尔堡病毒灭活疫苗可以导致豚鼠 20% 的死亡率^[121]。而且美国陆军传染病医学研究所 Geisbert 等也证明了埃博拉病毒灭活疫苗无法使非人灵长类动物产生有效的保护力^[94], 至此, 埃博拉病毒灭活疫苗的研究告一段落。

威斯康星大学兽医学院的 Halfmann 等采用反向遗传技术将埃博拉病毒的 VP30 基因替换为新霉素基因, 由于 VP30 编码病毒复制必需的转录因子, 因此改造后的病毒丧失了正常复制能力, 只能在稳定表达 VP30 的细胞系上复制, 而且改造后的病毒形态学未发生变化^[122]。该研究成果获得的复制缺陷型病毒比野生型病毒要安全的多, 可以不用在生物安全等级四级实验室操作, 可用于筛选抗埃博拉病毒药物的研究或疫苗研究。该研究团队进一步评价了该复制缺陷型病毒疫苗的安全性和免疫保护效力。他们给 STAT-1 敲除小鼠接种 2×10^6 FFU 复制缺陷型埃博拉病毒, 小鼠未出现任何症状。由于 STAT-1 敲除小鼠的干扰素信号通路被切断无法行使天然免疫功能, 因此该小鼠对

病毒高度易感, 该实验结果证明了复制缺陷型埃博拉病毒疫苗的安全性。另外, 他们给小鼠和豚鼠两次接种该疫苗后进行攻毒, 所有动物获得了完全保护, 证明了该疫苗具有很好的免疫保护性。同时他们也观察到了疫苗免疫后诱导了针对埃博拉病毒 GP 蛋白的特异性抗体和针对 NP 蛋白的 CD8⁺ T 细胞免疫反应^[123]。该研究成果尽管证明了该疫苗在实验室中具有很好的安全性, 但是该疫苗仅去除了 VP30 基因, 在自然界中如果一旦出现基因重组使该疫苗恢复复制能力, 其后果将是灾难性的, 所以该疫苗的生物安全性尚需进一步进行评估。

2 国内埃博拉疫苗研究状况

我国的科技工作者们也进行了埃博拉病毒疫苗的相关研究。中国医学科学院的蒋澄宇实验室进行了埃博拉病毒 DNA 疫苗的研究, 他们将扎伊尔型埃博拉病毒的 GP 蛋白基因优化后构建了 Peak13CD5LGP 质粒, 3 次免疫小鼠后可诱导针对 GP 蛋白的特异性抗体^[124]。云南沃森生物技术股份有限公司的何丽芳等利用 pcDNA3.1 载体制备了表达埃博拉病毒 GP 蛋白的 DNA 疫苗, 免疫小鼠后产生的抗体可以阻断埃博拉假病毒进入细胞^[125]。军事医学科学院的夏咸柱院士实验室进行了埃博拉病毒 VSV 载体疫苗的研究, 他们制备的疫苗在小鼠上显示出很好的安全性, 而且诱导小鼠产生的特异抗体可以阻断假病毒的感染^[126]。军事医学科学院的陈薇实验室进行了埃博拉病毒腺病毒载体疫苗的研究, 他们分别制备了扎伊尔型和苏丹型埃博拉病毒腺病毒载体疫苗, 疫苗可诱导小鼠产生有效的细胞免疫和体液免疫反应, 而且免疫后小鼠血清的抗体在近一年的时间内可稳定维持。将苏丹型和扎伊尔型埃博拉重组腺病毒混合后进行免疫, 两者不存在相互干扰作用^[127]。哈尔

滨兽医研究所的步志高实验室进行了埃博拉病毒新城疫载体疫苗的研究,他们利用新城疫 LaSota 株制备的重组载体疫苗表达了埃博拉病毒 GP 蛋白,并在小鼠和家禽上评估了其安全性。他们发现引入的埃博拉病毒 GP 蛋白改变了新城疫病毒进入细胞的通路,提示了病毒载体功能的改变所引发的潜在生物风险^[128]。中国科学院武汉病毒研究所的石正丽实验室制备了埃博拉病毒 VLPs,为该方向的研究奠定了基础。

3 小结与展望

目前已有多个埃博拉病毒疫苗研制方案证明可对非人灵长类动物实现有效保护,包括腺病毒载体疫苗、VSV 载体疫苗、HPIV3 载体疫苗、狂犬病毒载体疫苗、VEEV 载体疫苗和 VLPs 疫苗。而且腺病毒载体疫苗和 VSV 载体疫苗最有希望尽快用于本次埃博拉疫情的防控。然而,目前还没有一个埃博拉病毒疫苗进入 II 期临床,所以其在人体上能否真正起到保护作用,我们还不得而知,不过随着西非 II 期临床试验的开展,该答案将很快被揭晓。尽管目前还没有疫苗和治疗性药物获得批准上市,但前期的研究成果为本次埃博拉疫情的防控奠定了基础。美国和加拿大研究的较为深入和透彻,我国由于前期没有生物安全四级实验室,研发的疫苗无法进行动物实验验证其保护效力。随着我国生物安全四级实验室的投入使用,我国的研发水平将进入一个新的里程碑。目前疫情呈现一种在疫区快速扩散并通过输入性感染的方式逐渐向其他国家扩散的形式,由于我国与非洲的经贸往来较多,而且埃博拉出血热存在较长的潜伏期和治愈后依然带毒的特点,因此我国对埃博拉疫情的防控形势非常严峻,行之有效的疫苗和药物也显得更加迫在眉睫。笔者认为我国的研究人员除了关注相对研发较成熟的腺病毒载体

和 VSV 载体埃博拉疫苗外,还应开展具有自主创新的新型高效载体疫苗和治疗性抗体的研究,以提升我国埃博拉防控的自主创新和科技技术战略储备能力。

前期研究显示目前爆发的埃博拉疫情病毒基因组与以往的扎伊尔型埃博拉病毒存在一定的差异性^[129],而且报道称该病毒变异迅速,短短几个月就出现了多个分支^[130],新的埃博拉病毒变异株有可能对疫苗株产生免疫逃逸,这使得埃博拉病毒疫苗的研究更具挑战。随着病毒变异株多个氨基酸位点的改变,目前研究的检测技术是否能够囊括差异,研制的疫苗、抗体能够抵挡快速变异,是我们重点关注且亟待解决的难点。聚焦毒株变异,及时更新流行病学资源,研发安全、高效、可控、稳定的疫苗和抗病毒药物,是我们后续需要全力开展的工作。

REFERENCES

- [1] Lasaro MO, Ertl HC. New insights on adenovirus as vaccine vectors. *Mol Ther*, 2009, 17(8): 1333-1339.
- [2] Ledgerwood JE, Costner P, Desai N, et al. A replication defective recombinant Ad5 vaccine expressing Ebola virus GP is safe and immunogenic in healthy adults. *Vaccine*, 2010, 29(2): 304-313.
- [3] Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, et al. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the step study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet*, 2008, 372(9653): 1881-1893.
- [4] Ouedraogo A, Tiono AB, Kargougou D, et al. A phase 1b randomized, controlled, double-blinded dosage-escalation trial to evaluate the safety, reactogenicity and immunogenicity of an adenovirus type 35 based circumsporozoite malaria vaccine in Burkina Faso healthy adults 18 to 45 years of age. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e78679.

- [5] Smaill F, Jeyanathan M, Smieja M, et al. A human type 5 adenovirus-based tuberculosis vaccine induces robust T cell responses in humans despite preexisting anti-adenovirus immunity. *Sci Transl Med*, 2013, 5(205): 205ra134.
- [6] Gurwith M, Lock M, Taylor EM, et al. Safety and immunogenicity of an oral, replicating adenovirus serotype 4 vector vaccine for H5N1 influenza: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 study. *Lancet Infect Dis*, 2013, 13(3): 238–250.
- [7] Peters W, Brandl JR, Lindbloom JD, et al. Oral administration of an adenovirus vector encoding both an avian influenza A hemagglutinin and a TLR3 ligand induces antigen specific granzyme B and IFN-gamma T cell responses in humans. *Vaccine*, 2013, 31(13): 1752–1758.
- [8] Sun C, Zhang Y, Feng L, et al. Epidemiology of adenovirus type 5 neutralizing antibodies in healthy people and AIDS patients in Guangzhou, southern China. *Vaccine*, 2011, 29(22): 3837–3841.
- [9] Nwanegbo E, Vardas E, Gao W, et al. Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of The Gambia, South Africa, and the United States. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11(2): 351–357.
- [10] Sullivan NJ, Sanchez A, Rollin PE, et al. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature*, 2000, 408(6812): 605–609.
- [11] Sullivan NJ, Geisbert TW, Geisbert JB, et al. Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. *Nature*, 2003, 424(6949): 681–684.
- [12] Manicassamy B, Wang J, Jiang H, et al. Comprehensive analysis of ebola virus GP1 in viral entry. *J Virol*, 2005, 79(8): 4793–4805.
- [13] Sullivan NJ, Geisbert TW, Geisbert JB, et al. Immune protection of nonhuman primates against Ebola virus with single low-dose adenovirus vectors encoding modified GPs. *PLoS Med*, 2006, 3(6): e177.
- [14] Geisbert TW, Bailey M, Hensley L, et al. Recombinant adenovirus serotype 26 (Ad26) and Ad35 vaccine vectors bypass immunity to Ad5 and protect nonhuman primates against ebolavirus challenge. *J Virol*, 2011, 85(9): 4222–4233.
- [15] Stanley DA, Honko AN, Asiedu C, et al. Chimpanzee adenovirus vaccine generates acute and durable protective immunity against ebolavirus challenge. *Nat Med*, 2014, 20(10): 1126–1129.
- [16] Ledgerwood JE, DeZure AD, Stanley DA, et al. Chimpanzee adenovirus vector ebola vaccine — preliminary report. *N Engl J Med*, 2014, DOI: 10.1056/NEJMoa1410863.
- [17] Kobinger GP, Feldmann H, Zhi Y, et al. Chimpanzee adenovirus vaccine protects against Zaire Ebola virus. *Virology*, 2006, 346(2): 394–401.
- [18] Santosuosso M, McCormick S, Xing Z. Adenoviral vectors for mucosal vaccination against infectious diseases. *Viral Immunol*, 2005, 18(2): 283–291.
- [19] Zhou D, Cun A, Li Y, et al. A chimpanzee-origin adenovirus vector expressing the rabies virus glycoprotein as an oral vaccine against inhalation infection with rabies virus. *Mol Ther*, 2006, 14(5): 662–672.
- [20] Patel A, Zhang Y, Croyle M, et al. Mucosal delivery of adenovirus-based vaccine protects against Ebola virus infection in mice. *J Infect Dis*, 2007, 196 Suppl 2: S413–420.
- [21] Croyle MA, Patel A, Tran KN, et al. Nasal delivery of an adenovirus-based vaccine bypasses pre-existing immunity to the vaccine carrier and improves the immune response in mice. *PLoS ONE*, 2008, 3(10): e3548.
- [22] Hartman ZC, Appledorn DM, Amalfitano A. Adenovirus vector induced innate immune responses: impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus Res*, 2008, 132(1/2): 1–14.
- [23] Richardson JS, Yao MK, Tran KN, et al. Enhanced protection against Ebola virus mediated

- by an improved adenovirus-based vaccine. *PLoS ONE*, 2009, 4(4): e5308.
- [24] Richardson JS, Abou MC, Tran KN, et al. Impact of systemic or mucosal immunity to adenovirus on Ad-based Ebola virus vaccine efficacy in guinea pigs. *J Infect Dis*, 2011, 204 Suppl 3: S1032–1042.
- [25] Richardson JS, Wong G, Pillet S, et al. Evaluation of different strategies for post-exposure treatment of Ebola virus infection in Rodents. *J Bioterror Biodef*, 2011(S1): 007. DOI:10.4172/2157-2526.S1-007.
- [26] Richardson JS, Pillet S, Bello AJ, et al. Airway delivery of an adenovirus-based Ebola virus vaccine bypasses existing immunity to homologous adenovirus in nonhuman primates. *J Virol*, 2013, 87(7): 3668–3677.
- [27] Choi JH, Jonsson-Schmunk K, Qiu X, et al. A single dose respiratory recombinant adenovirus-based vaccine provides long-term protection for non-human primates from lethal ebola infection. *Mol Pharm*, 2014, DOI: 10.1021/mp500646d.
- [28] Hevey M, Negley D, Geisbert J, et al. Antigenicity and vaccine potential of Marburg virus glycoprotein expressed by baculovirus recombinants. *Virology*, 1997, 239(1): 206–216.
- [29] Rubinchik S, Norris JS, Dong JY. Construction, purification and characterization of adenovirus vectors expressing apoptosis-inducing transgenes. *Methods Enzymol*, 2002, 346: 529–547.
- [30] Rubinchik S, Wang D, Yu H, et al. A complex adenovirus vector that delivers FASL-GFP with combined prostate-specific and tetracycline-regulated expression. *Mol Ther*, 2001, 4(5): 416–426.
- [31] Rubinchik S, Woraratanadharm J, Schepp J, et al. Improving the transcriptional regulation of genes delivered by adenovirus vectors. *Methods Mol Med*, 2003, 76: 167–199.
- [32] Wang D, Raja NU, Trubey CM, et al. Development of a cAdVax-based bivalent ebola virus vaccine that induces immune responses against both the Sudan and Zaire species of Ebola virus. *J Virol*, 2006, 80(6): 2738–2746.
- [33] Wang D, Hevey M, Juompan LY, et al. Complex adenovirus-vectored vaccine protects guinea pigs from three strains of Marburg virus challenges. *Virology*, 2006, 353(2): 324–332.
- [34] Swenson DL, Wang D, Luo M, et al. Vaccine to confer to nonhuman primates complete protection against multistrain Ebola and Marburg virus infections. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15(3): 460–467.
- [35] Pratt WD, Wang D, Nichols DK, et al. Protection of nonhuman primates against two species of Ebola virus infection with a single complex adenovirus vector. *Clin Vaccine Immunol*, 2010, 17(4): 572–581.
- [36] Roy S, Zhi Y, Kobinger GP, et al. Generation of an adenoviral vaccine vector based on simian adenovirus 21. *J Gen Virol*, 2006, 87(Pt 9): 2477–2485.
- [37] Choi JH, Schafer SC, Zhang L, et al. A single sublingual dose of an adenovirus-based vaccine protects against lethal Ebola challenge in mice and guinea pigs. *Mol Pharm*, 2012, 9(1): 156–167.
- [38] Choi JH, Schafer SC, Zhang L, et al. Modeling pre-existing immunity to adenovirus in rodents: immunological requirements for successful development of a recombinant adenovirus serotype 5-based ebola vaccine. *Mol Pharm*, 2013, 10(9): 3342–3355.
- [39] Sullivan NJ, Hensley L, Asiedu C, et al. CD8+ cellular immunity mediates rAd5 vaccine protection against Ebola virus infection of nonhuman primates. *Nat Med*, 2011, 17(9): 1128–1131.
- [40] Wong G, Richardson JS, Pillet S, et al. Immune parameters correlate with protection against ebola virus infection in rodents and nonhuman primates. *Sci Transl Med*, 2012, 4(158): 158ra146.
- [41] Clarke DK, Cooper D, Egan MA, et al. Recombinant vesicular stomatitis virus as an HIV-1 vaccine vector. *Springer Semin Immunopathol*, 2006, 28(3): 239–253.
- [42] Kaneko H, Suzuki H, Abe T, et al. Inhibition of

- HIV-1 replication by vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein pseudotyped baculovirus vector-transduced ribozyme in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 349(4): 1220–1227.
- [43] Rabinovich S, Powell RL, Lindsay RW, et al. A novel, live-attenuated vesicular stomatitis virus vector displaying conformationally intact, functional HIV-1 envelope trimers that elicits potent cellular and humoral responses in mice. *PLoS ONE*, 2014, 9(9): e106597.
- [44] Kapadia SU, Rose JK, Lamirande E, et al. Long-term protection from SARS coronavirus infection conferred by a single immunization with an attenuated VSV-based vaccine. *Virology*, 2005, 340(2): 174–182.
- [45] Barefoot BE, Sample CJ, Ramsburg EA. Recombinant vesicular stomatitis virus expressing influenza nucleoprotein induces CD8 T-cell responses that enhance antibody-mediated protection after lethal challenge with influenza virus. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16(4): 488–498.
- [46] Schwartz JA, Buonocore L, Suguitan A Jr, et al. Vesicular stomatitis virus-based H5N1 avian influenza vaccines induce potent cross-clade neutralizing antibodies in rhesus macaques. *J Virol*, 2011, 85(9): 4602–4605.
- [47] Schwartz JA, Buonocore L, Suguitan AL Jr, et al. Potent vesicular stomatitis virus-based avian influenza vaccines provide long-term sterilizing immunity against heterologous challenge. *J Virol*, 2010, 84(9): 4611–4618.
- [48] Cobleigh MA, Buonocore L, Uprichard SL, et al. A vesicular stomatitis virus-based hepatitis B virus vaccine vector provides protection against challenge in a single dose. *J Virol*, 2010, 84(15): 7513–7522.
- [49] Cobleigh MA, Wei X, Robek MD. A vesicular stomatitis virus-based therapeutic vaccine generates a functional CD8 T cell response to hepatitis B virus in transgenic mice. *J Virol*, 2013, 87(5): 2969–2973.
- [50] Ezelle HJ, Markovic D, Barber GN. Generation of hepatitis C virus-like particles by use of a recombinant vesicular stomatitis virus vector. *J Virol*, 2002, 76(23): 12325–12334.
- [51] Garbutt M, Liebscher R, Wahl-Jensen V, et al. Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses. *J Virol*, 2004, 78(10): 5458–5465.
- [52] Jones SM, Feldmann H, Stroher U, et al. Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat Med*, 2005, 11(7): 786–790.
- [53] Feldmann H, Jones SM, Daddario-DiCaprio KM, et al. Effective post-exposure treatment of Ebola infection. *PLoS Pathog*, 2007, 3(1): e2.
- [54] Geisbert TW, Daddario-DiCaprio KM, Williams KJ, et al. Recombinant vesicular stomatitis virus vector mediates postexposure protection against Sudan Ebola hemorrhagic fever in nonhuman primates. *J Virol*, 2008, 82(11): 5664–5668.
- [55] Tuffs A. Experimental vaccine may have saved Hamburg scientist from Ebola fever. *BMJ*, 2009, 338: b1223.
- [56] Qiu X, Fernando L, Alimonti JB, et al. Mucosal immunization of cynomolgus macaques with the VSVDeltaG/ZEBOVGP vaccine stimulates strong ebola GP-specific immune responses. *PLoS ONE*, 2009, 4(5): e5547.
- [57] Wong G, Audet J, Fernando L, et al. Immunization with vesicular stomatitis virus vaccine expressing the Ebola glycoprotein provides sustained long-term protection in rodents. *Vaccine*, 2014, 32(43): 5722–5729.
- [58] Geisbert TW, Daddario-DiCaprio KM, Geisbert JB, et al. Vesicular stomatitis virus-based vaccines protect nonhuman primates against aerosol challenge with Ebola and Marburg viruses. *Vaccine*, 2008, 26(52): 6894–6900.
- [59] Geisbert TW, Geisbert JB, Leung A, et al. Single-injection vaccine protects nonhuman primates against infection with marburg virus and three species of ebola virus. *J Virol*, 2009, 83(14):

- 7296–7304.
- [60] Geisbert TW, Daddario-Dicaprio KM, Lewis MG, et al. Vesicular stomatitis virus-based ebola vaccine is well-tolerated and protects immunocompromised nonhuman primates. *PLoS Pathog*, 2008, 4(11): e1000225.
- [61] Geisbert TW, Hensley LE, Geisbert JB, et al. Postexposure treatment of Marburg virus infection. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16(7): 1119–1122.
- [62] Mire CE, Geisbert JB, Agans KN, et al. Durability of a vesicular stomatitis virus-based marburg virus vaccine in nonhuman primates. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): e94355.
- [63] Tsuda Y, Safronetz D, Brown K, et al. Protective efficacy of a bivalent recombinant vesicular stomatitis virus vaccine in the Syrian hamster model of lethal Ebola virus infection. *J Infect Dis*, 2011, 204 Suppl 3: S1090–1097.
- [64] Marzi A, Engelmann F, Feldmann F, et al. Antibodies are necessary for rVSV/ZEBOV-GP-mediated protection against lethal Ebola virus challenge in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(5): 1893–1898.
- [65] Qiu X, Wong G, Audet J, et al. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature*, 2014, 514(7520): 47–53.
- [66] Geisbert TW. Medical research: Ebola therapy protects severely ill monkeys. *Nature*, 2014, 514(7520): 41–43.
- [67] Xu L, Sanchez A, Yang Z, et al. Immunization for Ebola virus infection. *Nat Med*, 1998, 4(1): 37–42.
- [68] Vanderzanden L, Bray M, Fuller D, et al. DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge. *Virology*, 1998, 246(1): 134–144.
- [69] Dery M, Bausch DG. A DNA vaccine for the prevention of Ebola virus infection. *Curr Opin Mol Ther*, 2008, 10(3): 285–293.
- [70] Martin JE, Sullivan NJ, Enama ME, et al. A DNA vaccine for Ebola virus is safe and immunogenic in a phase I clinical trial. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, 13(11): 1267–1277.
- [71] Grant-Klein RJ, Van Deusen NM, Badger CV, et al. A multiagent filovirus DNA vaccine delivered by intramuscular electroporation completely protects mice from ebola and Marburg virus challenge. *Hum Vaccin Immunother*, 2012, 8(11): 1703–1706.
- [72] Durbin AP, Skiadopoulos MH, McAuliffe JM, et al. Human parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the hemagglutinin protein of measles virus provides a potential method for immunization against measles virus and PIV3 in early infancy. *J Virol*, 2000, 74(15): 6821–6831.
- [73] Bukreyev A, Yang L, Zaki SR, et al. A single intranasal inoculation with a paramyxovirus-vectored vaccine protects guinea pigs against a lethal-dose Ebola virus challenge. *J Virol*, 2006, 80(5): 2267–2279.
- [74] Bukreyev A, Rollin PE, Tate MK, et al. Successful topical respiratory tract immunization of primates against Ebola virus. *J Virol*, 2007, 81(12): 6379–6388.
- [75] Yang L, Sanchez A, Ward JM, et al. A paramyxovirus-vectored intranasal vaccine against Ebola virus is immunogenic in vector-immune animals. *Virology*, 2008, 377(2): 255–264.
- [76] Bukreyev AA, Dinapoli JM, Yang L, et al. Mucosal parainfluenza virus-vectored vaccine against Ebola virus replicates in the respiratory tract of vector-immune monkeys and is immunogenic. *Virology*, 2010, 399(2): 290–298.
- [77] Zhang L, Bukreyev A, Thompson CI, et al. Infection of ciliated cells by human parainfluenza virus type 3 in an in vitro model of human airway epithelium. *J Virol*, 2005, 79(2): 1113–1124.
- [78] Bukreyev A, Marzi A, Feldmann F, et al. Chimeric human parainfluenza virus bearing the Ebola virus glycoprotein as the sole surface protein is immunogenic and highly protective against Ebola virus challenge. *Virology*, 2009, 383(2): 348–361.
- [79] McGettigan JP, Foley HD, Belyakov IM, et al. Rabies virus-based vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope

- protein induce a strong, cross-reactive cytotoxic T-lymphocyte response against envelope proteins from different HIV-1 isolates. *J Virol*, 2001, 75(9): 4430–4434.
- [80] McGettigan JP, Naper K, Orenstein J, et al. Functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag-Pol or HIV-1 Gag-Pol and env expressed from a single rhabdovirus-based vaccine vector genome. *J Virol*, 2003, 77(20): 10889–10899.
- [81] McGettigan JP, Pomerantz RJ, Siler CA, et al. Second-generation rabies virus-based vaccine vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 gag have greatly reduced pathogenicity but are highly immunogenic. *J Virol*, 2003, 77(1): 237–244.
- [82] McGettigan JP, Sarma S, Orenstein JM, et al. Expression and immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 Gag expressed by a replication-competent rhabdovirus-based vaccine vector. *J Virol*, 2001, 75(18): 8724–8732.
- [83] Faber M, Lamirande EW, Roberts A, et al. A single immunization with a rhabdovirus-based vector expressing severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) S protein results in the production of high levels of SARS-CoV-neutralizing antibodies. *J Gen Virol*, 2005, 86(Pt 5): 1435–1440.
- [84] Siler CA, McGettigan JP, Dietzschold B, et al. Live and killed rhabdovirus-based vectors as potential hepatitis C vaccines. *Virology*, 2002, 292(1): 24–34.
- [85] Cleaveland S, Fevre EM, Kaare M, et al. Estimating human rabies mortality in the United Republic of Tanzania from dog bite injuries. *Bull World Health Organ*, 2002, 80(4): 304–310.
- [86] Knobel DL, du Toit JT, Bingham J. Development of a bait and baiting system for delivery of oral rabies vaccine to free-ranging African wild dogs (*Lycaon pictus*). *J Wildl Dis*, 2002, 38(2): 352–362.
- [87] Schnell MJ, McGettigan JP, Wirblich C, et al. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(1): 51–61.
- [88] Blaney JE, Wirblich C, Papaneri AB, et al. Inactivated or live-attenuated bivalent vaccines that confer protection against rabies and Ebola viruses. *J Virol*, 2011, 85(20): 10605–10616.
- [89] Papaneri AB, Wirblich C, Cann JA, et al. A replication-deficient rabies virus vaccine expressing Ebola virus glycoprotein is highly attenuated for neurovirulence. *Virology*, 2012, 434(1): 18–26.
- [90] Papaneri AB, Wirblich C, Cooper K, et al. Further characterization of the immune response in mice to inactivated and live rabies vaccines expressing Ebola virus glycoprotein. *Vaccine*, 2012, 30(43): 6136–6141.
- [91] Blaney JE, Marzi A, Willet M, et al. Antibody quality and protection from lethal Ebola virus challenge in nonhuman primates immunized with rabies virus based bivalent vaccine. *PLoS Pathog*, 2013, 9(5): e1003389.
- [92] Sullivan NJ, Martin JE, Graham BS, et al. Correlates of protective immunity for Ebola vaccines: implications for regulatory approval by the animal rule. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(5): 393–400.
- [93] Gilligan KJ, Gelsbert J, Jahrling P, et al. Assessment of protective immunity conferred by recombinant vaccinia viruses to guinea pigs challenged with Ebola virus. *Vaccines 97*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997: 87–92.
- [94] Geisbert TW, Pushko P, Anderson K, et al. Evaluation in nonhuman primates of vaccines against Ebola virus. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8(5): 503–507.
- [95] Pushko P, Bray M, Ludwig GV, et al. Recombinant RNA replicons derived from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus protect guinea pigs and mice from Ebola hemorrhagic fever virus. *Vaccine*, 2000, 19(1): 142–153.
- [96] Pushko P, Geisbert J, Parker M, et al. Individual and bivalent vaccines based on alphavirus

- replicons protect guinea pigs against infection with Lassa and Ebola viruses. *J Virol*, 2001, 75(23): 11677–11685.
- [97] Herbert AS, Kuehne AI, Barth JF, et al. Venezuelan equine encephalitis virus replicon particle vaccine protects nonhuman primates from intramuscular and aerosol challenge with ebolavirus. *J Virol*, 2013, 87(9): 4952–4964.
- [98] DiNapoli JM, Yang L, Samal SK, et al. Respiratory tract immunization of non-human primates with a Newcastle disease virus-vectored vaccine candidate against Ebola virus elicits a neutralizing antibody response. *Vaccine*, 2010, 29(1): 17–25.
- [99] Reynard O, Mokhonov V, Mokhonova E, et al. Kunjin virus replicon-based vaccines expressing Ebola virus glycoprotein GP protect the guinea pig against lethal Ebola virus infection. *J Infect Dis*, 2011, 204 Suppl 3: S1060–1065.
- [100] Buonaguro L, Buonaguro FM, Tornesello ML, et al. High efficient production of Pr55 (gag) virus-like particles expressing multiple HIV-1 epitopes, including a gp120 protein derived from an Ugandan HIV-1 isolate of subtype A. *Antiviral Res*, 2001, 49(1): 35–47.
- [101] Pushko P, Kort T, Nathan M, et al. Recombinant H1N1 virus-like particle vaccine elicits protective immunity in ferrets against the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *Vaccine*, 2010, 28(30): 4771–4776.
- [102] Quan FS, Vunnava A, Compans RW, et al. Virus-like particle vaccine protects against 2009 H1N1 pandemic influenza virus in mice. *PLoS ONE*, 2010, 5(2): e9161.
- [103] Garrone P, Fluckiger AC, Mangeot PE, et al. A prime-boost strategy using virus-like particles pseudotyped for HCV proteins triggers broadly neutralizing antibodies in macaques. *Sci Transl Med*, 2011, 3(94): 94ra71.
- [104] 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(15): 1855–1862.
- [105] Lin YL, Yu CI, Hu YC, et al. Enterovirus type 71 neutralizing antibodies in the serum of macaque monkeys immunized with EV71 virus-like particles. *Vaccine*, 2012, 30(7): 1305–1312.
- [106] Bernstein DI, El Sahly HM, Keitel WA, et al. Safety and immunogenicity of a candidate parvovirus B19 vaccine. *Vaccine*, 2011, 29(43): 7357–7363.
- [107] Chen J, Ni G, Liu XS. Papillomavirus virus like particle-based therapeutic vaccine against human papillomavirus infection related diseases: immunological problems and future directions. *Cell Immunol*, 2011, 269(1): 5–9.
- [108] Bavari S, Bosio CM, Wiegand E, et al. Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. *J Exp Med*, 2002, 195(5): 593–602.
- [109] Noda T, Sagara H, Suzuki E, et al. Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP. *J Virol*, 2002, 76(10): 4855–4865.
- [110] Warfield KL, Bosio CM, Welcher BC, et al. Ebola virus-like particles protect from lethal Ebola virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26): 15889–15894.
- [111] Warfield KL, Swenson DL, Negley DL, et al. Marburg virus-like particles protect guinea pigs from lethal Marburg virus infection. *Vaccine*, 2004, 22(25/26): 3495–3502.
- [112] Swenson DL, Warfield KL, Negley DL, et al. Virus-like particles exhibit potential as a pan-filovirus vaccine for both Ebola and Marburg viral infections. *Vaccine*, 2005, 23(23): 3033–3042.
- [113] Warfield KL, Olinger G, Deal EM, et al. Induction of humoral and CD8+ T cell responses are required for protection against lethal Ebola virus infection. *J Immunol*, 2005, 175(2): 1184–1191.
- [114] Bosio CM, Aman MJ, Grogan C, et al. Ebola and Marburg viruses replicate in monocyte-derived dendritic cells without inducing the production of cytokines and full maturation. *J Infect Dis*, 2003,

- 188(11): 1630–1638.
- [115] Mahanty S, Hutchinson K, Agarwal S, et al. Cutting edge: impairment of dendritic cells and adaptive immunity by Ebola and Lassa viruses. *J Immunol*, 2003, 170(6): 2797–2801.
- [116] Bosio CM, Moore BD, Warfield KL, et al. Ebola and Marburg virus-like particles activate human myeloid dendritic cells. *Virology*, 2004, 326(2): 280–287.
- [117] Warfield KL, Swenson DL, Olinger GG, et al. Ebola virus-like particle-based vaccine protects nonhuman primates against lethal Ebola virus challenge. *J Infect Dis*, 2007, 196 Suppl 2: S430–437.
- [118] Ye L, Lin J, Sun Y, et al. Ebola virus-like particles produced in insect cells exhibit dendritic cell stimulating activity and induce neutralizing antibodies. *Virology*, 2006, 351(2): 260–270.
- [119] Lupton HW, Lambert RD, Bumgardner DL, et al. Inactivated vaccine for Ebola virus efficacious in guineapig model. *Lancet*, 1980, 2(8207): 1294–1295.
- [120] Rao M, Bray M, Alving CR, et al. Induction of immune responses in mice and monkeys to Ebola virus after immunization with liposome-encapsulated irradiated Ebola virus: protection in mice requires CD4(+) T cells. *J Virol*, 2002, 76(18): 9176–9185.
- [121] Hevey M, Negley D, VanderZanden L, et al. Marburg virus vaccines: comparing classical and new approaches. *Vaccine*, 2001, 20(3/4): 586–593.
- [122] Halfmann P, Kim JH, Ebihara H, et al. Generation of biologically contained Ebola viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(4): 1129–1133.
- [123] Halfmann P, Ebihara H, Marzi A, et al. Replication-deficient ebolavirus as a vaccine candidate. *J Virol*, 2009, 83(8): 3810–3815.
- [124] Zhang GG, Lang JS, Wang HL, et al. DNA vaccine encoding Ebola virus envelope glycoprotein inducing high-titer neutralization antibody in mice. *Basic Med Sci Clin*, 2011, 31(6): 667–671 (in Chinese).
张桂根, 郎建社, 王洪亮, 等. 埃博拉病毒包膜蛋白 GP 基因 DNA 疫苗诱导小鼠产生高滴度中和抗体. *基础医学与临床*, 2011, 31(6): 667–671.
- [125] He LF, Wu WJ, Wang LL, et al. Induction of neutralizing antibody in mice by plasmid DNA encoding envelope glycoprotein of Ebola virus. *Chin J Biologicals*, 2013, 26(6): 866–868 (in Chinese).
何丽芳, 武雯俊, 王丽丽, 等. 埃博拉病毒包膜蛋白 DNA 表达质粒对小鼠中和抗体的诱导作用. *中国生物制品学杂志*, 2013, 26(6): 866–868.
- [126] Song K, Wang XJ, Wen ZY, et al. Construction of a recombinant vesicular stomatitis virus expressing Zaire Ebola virus glycoprotein. *Chin J Prev Vet Med*, 2013, 35(6): 431–435 (in Chinese).
宋坤, 王喜军, 温志远, 等. 表达扎伊尔型埃博拉病毒囊膜糖蛋白重组水泡性口炎病毒的构建. *中国预防兽医学报*, 2013, 35(6): 431–435.
- [127] Wu SP. Virulent pathogen vaccines based on recombinant adenoviral vector [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2013 (in Chinese).
吴诗坡. 基于重组腺病毒载体的烈性病原体疫苗研究[D].北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2013.
- [128] Wen Z, Zhao B, Song K, et al. Recombinant lentogenic Newcastle disease virus expressing Ebola virus GP infects cells independently of exogenous trypsin and uses macropinocytosis as the major pathway for cell entry. *Virol J*, 2013, 10: 331.
- [129] Gire SK, Goba A, Andersen KG, et al. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science*, 2014, 345(6202): 1369–1372.
- [130] Vogel G. Infectious Disease. Genomes reveal start of Ebola outbreak. *Science*, 2014, 345(6200): 989–990.

(本文责编 陈宏宇)