



评述

人呼吸道合胞病毒活疫苗研究进展

何金生^①, 付远辉^①, 洪涛^{①②}

① 北京交通大学生命科学与生物工程研究院, 北京 100044;

② 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 100052

E-mail: jshhe@bjtu.edu.cn

收稿日期: 2010-08-10; 接受日期: 2010-11-28

国家自然科学基金(批准号: 30972604)、北京市自然科学基金(批准号: 7092053)、中国博士后科学基金(批准号: 20100470196)和北京交通大学基本科研业务费(批准号: 2009JBM104)资助项目

摘要 人呼吸道合胞病毒是引起婴幼儿支气管炎和肺炎的主要原因, 也可导致免疫缺陷病人及老年人群显著发病和死亡. 人呼吸道合胞病毒疫苗已被世界卫生组织(World Health Organization, WHO)列为全球最优先发展的疫苗之一. 经过 50 多年的研究, 尤其是随着重组技术和反向遗传学的出现, 对 RSV 疫苗的研究取得了重要进展, 但尚未有疫苗上市. 目前主要集中于亚单位疫苗及活疫苗等, 其中活疫苗包括减毒活疫苗和活病毒载体疫苗, 因其最有可能用于预防婴幼儿 RSV 感染, 而受到了较大关注. 以 rA2cp248/404/1030ΔSH 为代表的 RSV 减毒活疫苗临床试验显示, 其有较好的安全性及免疫保护作用, 不产生疾病增强作用是极有潜力的候选疫苗. 因此, 本文将重点介绍 RSV 活疫苗研究的主要进展和发展方向.

关键词人呼吸道合胞病毒
减毒活疫苗
病毒载体疫苗
反向遗传学
重组技术

人呼吸道合胞病毒(human respiratory syncytial virus, RSV)广泛分布于世界各地, 是导致婴幼儿、老年人和免疫力低下的成年人下呼吸道疾病(low respiratory illness, LRI)的重要病毒病原. 近期研究认为, RSV 感染引起的社会经济负担实际上比季节性流感更加严重^[1]. 虽然已研制过多种形式的 RSV 疫苗, 如福尔马林灭活疫苗(FI-RSV)、亚单位疫苗和减毒疫苗等, 但至今尚无可用于预防 RSV 感染的疫苗问世^[2]. 同时, 由于 FI-RSV 失败的阴影及 RSV 疫苗研制中面临的动物模型局限、免疫接种人群免疫系统发育不成熟、母传抗体干扰和存在两种不同抗原亚型等诸多复杂问题, 使学术界及产业界等对成功研制出有效的 RSV 疫苗产生了怀疑和悲观情绪^[3,4].

鉴于上述原因, 中国科研工作者没有开展以传统生物学方法研发灭活疫苗和减毒活疫苗等工作, 而是借助基因工程技术, 并吸取国外 RSV 疫苗研制的经验和教训, 尝试开展了 RSV 基因工程疫苗的研制工作. 主要集中在亚单位疫苗^[5]、病毒载体疫苗^[6,7]和减毒沙门氏菌载体疫苗^[7,8]等方面, 在小动物实验上取得了一定的免疫效果, 但均为实验室研究阶段, 尚未进入灵长类动物及临床试验. 总体来说, 中国 RSV 疫苗的研制工作属起步阶段, 尚未受到政府卫生及科技管理部门和企业等单位应有的重视, 但为今后具有自主知识产权的 RSV 疫苗的研发奠定了重要基础.

RSV 属于副黏病毒科肺炎病毒属(*Pneumovirus*),

血清型单一, 基因组为长约 15.2 kb 的单股负链 RNA, 编码 11 种蛋白, 包括 3 种跨膜包膜糖蛋白(F, G 和 SH), 1 种基质蛋白(M), 4 种核衣壳蛋白(N, P, L 和 M2-1), 2 种非结构蛋白(NS1 和 NS2)和 1 种 RNA 调节因子(M2-2)^[9]. 其中 G, F 为主要中和抗原, 能刺激机体产生血清中和抗体和呼吸道黏膜的分泌型 IgA (Secretary IgA, SIgA), 根据 G 蛋白抗原性存在的差异, RSV 分为 A 和 B 两个亚型. N, F, P, NS2 和 M2 等蛋白可诱导机体产生 CD8⁺细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)^[10,11]. 病毒特异性的免疫力在避免 RSV 引起的下呼吸道感染以及促进感染恢复中发挥重要作用, 这种免疫力主要由 RSV 特异性的血清抗体、黏膜抗体和细胞毒性的 T 淋巴细胞所介导(cytotoxic T lymphocytes, CTLs). 一般认为, 体液免疫(血清抗体及黏膜抗体)是以保护上下呼吸道免受感染为主, 细胞免疫的主要作用可能在于终止感染及提供抗病毒感染的短期保护作用^[2].

20 世纪 60 年代, 用于预防 RSV 的 FI-RSV, 不仅不能防止婴幼儿感染, 在嗣后的自然感染中, 接种疫苗儿童的 LRI(支气管炎和肺炎)发生率及严重程度均大大增加、入院治疗人数明显上升, 并有 2 例疫苗接种儿童死亡. 与对照组相比, 接种疫苗儿童出现病情加重现象, 即疾病增强作用(enhanced RSV disease, ERD)^[12-14]. 现在认为至少有两个原因导致了 ERD 的发生: (1) FI-RSV 未能诱导产生亲和力高、有中和活性的抗体, 也未能产生保护性的 CD8⁺ T 细胞应答, 使得 FI-RSV 诱导机体产生的免疫力不足以控制 RSV 感染; (2) FI-RSV 诱导机体产生了 Th2 偏向的 CD4⁺ T 细胞应答, 其介导的炎症反应导致了 ERD 的发生, 并与 ERD 中支气管免疫复合物沉积和支气管狭窄(bronchoconstriction)高度相关^[14,15]. 除 ERD 外, RSV 疫苗研究的主要障碍还有: RSV 天然感染不能产生持久免疫力, 反复感染常见; 作为疫苗主要目标人群的新生儿免疫系统发育不成熟, 难以产生高效价及高亲和力的抗体, 同时体内存在的母传抗体能介导免疫干扰或抑制作用; 存在两种抗原亚型(A 和 B)的 RSV, 在同一个流行季节, 不同亚型的 RSV 可引起再次感染等, 这些因素对疫苗的安全性及免疫原性均提出了很高要求^[16]. 因此, 一个成功的 RSV 疫苗应该具备以下特性: (1) 在新生儿, 甚至在母传抗体存在的情况下, 应具有较好的免疫原性; (2) 能有效预防由野生型 RSV(wt RSV)初次感染引起的 LRI; (3) 能同

时为预防两种亚型 RSV 感染提供保护作用; (4) 在随后的自然感染中, 不会导致 ERD^[16,17].

由于 RSV 病毒对机体免疫系统具有明显的抑制作用^[3], 新生儿免疫系统发育不成熟, 因此要获得能完全预防 RSV 感染的疫苗仍然面临诸多挑战. 但随着人们对 RSV 致病及免疫逃逸机制的深入认识, 随着对 FI-RSV 疾病增强作用相关因素的逐渐明确, 随着疫苗研究方法和手段的日益丰富, 以限制病毒复制和降低 RSV 感染后严重下呼吸道症状为目的的 RSV 疫苗研制工作已看到希望. 近年来, 在亚单位(subunit vaccine)及活疫苗(live virus vaccine)的研究上取得了有意义的进展. 亚单位疫苗是指由纯化的一种或几种 RSV 病毒蛋白组成的非复制型疫苗, 能产生很好的抗体应答, 但对新生儿仍存在疾病增强作用的风险, 适宜于老年人群提高免疫力. 活疫苗为复制型疫苗, 目前主要包括 RSV 减毒活疫苗及活病毒载体疫苗, 活病毒载体疫苗以活病毒作为载体构建的可表达 RSV 保护性抗原的重组病毒疫苗^[16]. 活疫苗是目前唯一有望用于新生儿 RSV 候选疫苗.

1 RSV 减毒活疫苗

由于 FI-RSV 的失败, 自 20 世纪 60 年代以来^[18], 获得在体内具有毒力减弱(attenuation, att)表型的 RSV 减毒活疫苗一直备受关注. 美国 Merck 公司曾通过皮下注射途径将 wt RSV 活病毒用于 RSV 疫苗研究, 并对包括血清学呈阴性的儿童进行了临床试验. 结果显示, 该疫苗极易受到血清抗体的干扰, 免疫原性差, 未能诱导保护性免疫^[19,20].

现在认为, RSV 减毒活疫苗的主要优势在于: 减毒活疫苗能经滴鼻免疫诱导机体产生系统和局部免疫, 因此可同时预防上、下呼吸道感染; 减毒活疫苗能引起与自然感染相同的免疫应答, 在嗣后的自然感染中, 不会产生疾病增强作用^[17]; 在母传抗体存在的情况下, 经鼻免疫的减毒活疫苗仍然具有在新生儿体内进行有效复制的能力^[21]. 因此, 滴鼻免疫途径是减毒活疫苗诱导机体产生安全、有效免疫保护作用的重要基础.

RSV 减毒活疫苗的研究主要经历了两个阶段, 一是在 20 世纪近 30 年的时间里, 主要采用传统的生物学方法获得 RSV 减毒活疫苗, 包括宿主范围(host-range, hr)突变、冷传代(cold passage, cp)突变及

化学诱变后的生物学筛选等, 这些方法费时、费力, 而且具有较大的偶然性; 二是近十年来主要采用基因工程方法或反向遗传学(reverse genetics)获得重组 RSV 疫苗病毒, 该方法首先利用分子生物学方法获得 RSV 基因组感染性 cDNA 克隆, 在插入各种已知的突变或缺失病毒的非必需基因后, 经拯救获得重组 RSV 疫苗病毒或 RSV 减毒活疫苗株^[22,23].

1.1 传统生物学方法获得的减毒活疫苗

(1) 冷适应型(cold-adaption, *ca*)和温度敏感型(temperature-sensitive, *ts*)减毒活疫苗. 通过在低于野生病毒最适生长温度连续传代(cold passage, *cp*)获得的减毒突变株, 包括相比野生病毒, 能在较低温度(20~25℃)进行更有效复制的突变株, 称为冷适应 *ca* 表型(phenotype), 及在人体生理温度复制效率低下的病毒突变株, 称为温度敏感 *ts* 表型. 温度敏感型减毒突变株也可利用化学诱变剂产生, 如在化学诱变剂 5-氟尿嘧啶存在下, 对病毒进行传代, 并通过生物学筛选具有 *ts* 表型的突变株. *ts* 表型的呼吸道病毒疫苗具有明显的优越性, 因为这种疫苗虽可在鼻咽部 32~34℃ 的环境中低水平复制, 但在下呼吸道的生理温度中则难以复制, 这种复制特点使 *ts* 表型疫苗具有更高的安全性. 此外, 在许可温度下, *ts* 病毒能在细胞中高效复制, 满足疫苗大规模制备的需要^[16].

20 世纪 60~70 年代, 人们对当时获得的减毒活疫苗 *cpRSV* 和几株 *ts* 型 RSV 进行了临床评估^[17,24,25], 发现这些减毒活疫苗均不会出现 FI-RSV 引起的疾病增强作用, 但存在减毒不够(*cpRSV* 和 RSV *ts*-1), 或减毒过度(RSV *ts*-2), 或出现“毒力返祖”(RSV *ts*-1)等问题.

(2) 宿主范围(*hr*)突变型减毒活疫苗. 借鉴当年 Edward Jenner 利用牛痘病毒预防天花的方法, 人们尝试采用与 RSV 抗原性相关、但在人体内复制能力较低的动物 RSV 病毒用于 RSV 疫苗研究. 这种因以异源性动物为宿主的病毒遗传性差异所产生的 *att* 表型被称为 *hr* 突变型^[16,26].

以牛呼吸道合胞病毒(bovin respiratory syncytial virus, BRSV)为减毒活疫苗的动物实验结果显示, 该疫苗仅诱导棉鼠(*Sigmodon*)产生一定的免疫保护作用, 但在猩猩的实验中未能获得保护效果^[26~28]. 值得一提的是, 减毒株 *cpRSV* 源自 RSV A 亚型 A2 株, 先在人胚肾(human embryonic kidney, HEK)细胞传代 5 次后, 继续在牛胚肾细胞连续传代 52 次, 温度逐渐

降至 26℃, 获得了在成人及血清阳性儿童高度减毒, 但在血清阴性儿童仍具有较高毒性的减毒株. 研究发现, 该毒株不具有 *ca* 及 *ts* 的体外生物学特征, 其 *att* 表型仅见于猩猩及人类的体内应用, 因此属于 *hr* 型减毒株^[18,29,30].

虽然早期开发 RSV 减毒活疫苗未获成功, 但是建立了以空白对照和双盲试验为基础的临床试验方法, 及以 RSV 流行情况分析为基础的免疫效果监测措施, 为开展 RSV 减毒活疫苗安全性和有效性的科学评估积累了重要经验. 同时, *cpRSV* 也为开发新一代减毒活疫苗奠定了良好的基础^[2].

(3) 以 *cpRSV* 为基础开发的 *ts* 型 RSV 减毒活疫苗. 为进一步降低 *cpRSV* 的毒力, 利用化学诱变, 获得了一系列毒力更弱的减毒株, 主要包括 *cpts248/955*, *cpts248/404*^[31,32] 和 *cpts530/1009*, *cpts530/1030*^[31,33] 等. 其中, *cpts248/955* 和 *cpts530/1009* 对于血清反应呈阳性的成人和儿童是充分减毒的, 但对血清反应呈阴性的低龄儿童仍具有较强的致病性和/或通过密切接触传播给未接种疫苗的儿童, 因此这两种 *cpts* 减毒株难以在低龄婴幼儿中应用^[21,34].

在所有的 RSV 减毒株候选疫苗中, *cpts248/404* 具有最好的减毒效果, 当温度为 35~36℃ 时, 病毒即停止复制. 与野毒株相比, 该毒株在猩猩上呼吸道的复制能力仅为野毒株的 1/1000, 在下呼吸道则基本失去了复制能力^[21,32]. 随后在儿童及未满 2 个月的新生儿进行了临床试验, 结果表明 *cpts248/404* 在 6 个月以上的儿童中具有较好的免疫原性, 能诱导产生中和抗体及 RSV 特异性的 IgG 和 IgA, 在 2 个月以下的新生儿中虽仅诱导产生 RSV 特异性的 IgA, 但显示出了较好的减毒效果, 仅观察到鼻塞症状, 对新生儿的哺乳及睡眠有一定影响. 在接种疫苗后的 RSV 流行季节, 对 RSV 感染情况的监测显示, 接种人群未发生 ERD, 且对 RSV 感染具有一定抵抗力^[21]. 在疫苗接种人群中获得的分离株中, 大多数(98%)仍维持了 *cpts248/404* 减毒株所有的 *ts* 表型特征, 仅有来自同一个受试者的 3 个分离株显示出温度敏感水平下降及毒力部分回复. 研究发现, 该分离株 404 号位点的 7605 碱基处发生了一个 C→A 的单碱基突变, 未回复为野生型的碱基 T, 但该分离株的毒力已回复到 *cpts248* 水平, 因此 *cpts248/404* 的安全性有待进一步提高^[21].

虽然 *cpts248/404* 还不是新生儿适用的疫苗, 但

其临床试验结果为与减毒活疫苗相关的许多重要问题提供了有价值的信息, 如母传抗体干扰、*cpts* 减毒株表型稳定性及免疫保护作用等^[2,21]。

1.2 反向遗传学在 RSV 减毒活疫苗中的应用

反向遗传学是指利用 RNA 病毒基因组(genomic)或反基因组(antigenomic)的 cDNA 产生感染性病毒的技术, 是目前产生毒力减弱突变以获得减毒活疫苗的重要工具。反向遗传学不仅加深了人们对传统生物学方法获得的各种表型(*att*, *ca*, *ts* 和 *hr*)减毒活疫苗的遗传学机制的认识, 同时大大加快了新型减毒活疫苗的研制步伐, 突破了以传统生物学方法获得高度稳定的减毒株时存在的障碍, 产生了第二代 RSV 减毒活疫苗或重组 RSV^[35], 使 RSV 减毒活疫苗的研制工作发展到了一个崭新的阶段。

(1) 反向遗传学揭示了传统的生物学方法获得的减毒活疫苗的遗传学机制。将先前经核酸序列分析发现的 5 个存在于 *cp*RSV 上的错义突变^[36-38]引入 *wt*RSV 基因组, 获得了毒力减弱的重组 RSV *rA2cp*, 证实了 *cp*RSV 上的 5 个氨基酸突变位点及其功能, 它们分别位于 3 个蛋白上, 具体为: Val-267-Ile/N, Glu-218-Ala/F, Thr-523-Ile/F, Cys-319-Tyr/L 和 His-1690-Tyr/L, 并认为赋予 RSV 非-*ts att* 表型的 5 个 *cp* 突变共同构成了一个独立的遗传要素(element)^[30,39]。此后又应用反向遗传学方法对经核酸序列分析发现的由 *cp*RSV 衍生的 6 种 *cpts*RSV 减毒株上的 6 个 *ts* 突变位点: Gln-831-Leu/248^[38], Asp-1183-Glu/404 和 T-7605-C/404^[29,37], Phe-521-Leu/530^[40], Asn-43-Ile/955^[41], Met-1169-Val/1009^[42]和 Tyr-1321-Asn/1030^[35]进行了研究, 证实 248, 530, 955, 1009 和 1030 号突变均位于 L 蛋白的编码区, 且均为错义突变, 例外的是可引起 *ts* 及 *att* 表型突变的 404 号突变仅位于 M2 基因转录起始信号的非编码区, 为第 7605 处碱基突变(T→C)。因此, 上述 6 个减毒株的 *ts* 及 *att* 表型均分别由 1 个氨基酸或 1 个核酸突变所引起。研究同时发现, 各突变位点之间存在叠加(additive)效应、无叠加(nonadditive)效应及不兼容(incompatibility)等多种互作关系^[29,35,40,42]。

(2) 反向遗传学开展减毒活疫苗研究的主要方法。

(i) 通过重组已知的各种突变位点或筛选新的突变位点, 产生新型重组 RSV 病毒疫苗。在以传统

生物学方法获得的减毒活疫苗的基础上, 利用基因工程技术, 设计、构建或组合有不同 *cp* 和 *ts* 突变位点或含有新型 *ts* 突变位点的重组 RSV 病毒疫苗, 以期获得减毒效果更好、免疫原性更强的重组 RSV 病毒疫苗, 如在 *cpts*248/404 中增加 1030 号突变, 获得了毒力进一步减弱的 *rA2cpts*248/404/1030 减毒株。这是首次采用反向遗传学方法将已知的减毒突变添加到现有的减毒不足的候选疫苗, 以制备充分减毒的重组病毒疫苗的成功尝试^[35]。

(ii) 通过基因缺失或移位构建新型重组 RSV 病毒疫苗。RSV 基因组中含有一些体外复制时非必需的基因, 如小疏水蛋白(small hydrophobic, SH)、非结构蛋白-1(nonstructural-1, NS1)、NS2、M2 可读框-2 蛋白(M2 ORF2 protein, M2-2)和黏附蛋白(attachment glycoprotein, G)^[43,44], 单独缺失这些非必需基因, 或同时联合上述各种 *cp* 和 *ts* 突变位点, 构建新型 RSV 重组病毒, 将大大增加“毒力返祖”的难度, 有望产生安全性更高的重组病毒疫苗^[45,46], 同时也有助于提高减毒活疫苗的免疫原性, 如通过删除 NS1 和 NS2 等编码 I 型干扰素(interferon, IFN)拮抗剂(antagonists)的基因, 可增强机体由 I 型 IFN 介导的对重组病毒的抗病毒免疫应答^[47-50], 或者通过删除能下调病毒抗原表达的 M2-2 基因, 可增加病毒蛋白的表达效率等^[51-53]。

目前为止, 由美国国立卫生研究所(National Institute of Health, NIH)和 MedImmune 公司研发的两个系列的第二代 RSV 减毒活疫苗已经进入临床试验。

① *rA2cp*248/404ΔSH 和 *rA2cp*248/404/1030ΔSH。在小于 2 个月的新生儿的临床评估中显示, *rA2cp*248/404ΔSH 与 *cpts*248/404 具有相似的毒性, 而 *rA2cp*248/404/1030ΔSH 因同时含有 5 种 *att* 突变, 包括 3 种 *ts* 突变(404, 248 和 1030)及 2 种非-*ts* 突变(*cp* 和 ΔSH), 临床试验中, 显示出了更好的减毒效果, 未发现该减毒株能引起接种 *cpts*248/404 新生儿的鼻塞症状。仅从少数接种者中分离出了 248 位或 1030 位氨基酸回复为野生型氨基酸的分离株, 该减毒株能突破母传抗体的干扰, 具有一定的免疫保护作用, 是第一个最有希望用于低龄新生儿的候选疫苗^[39]。② *rA2cp*ΔNS2, *rA2cp*248/404ΔNS2 和 *rA2cp*530/1009ΔNS2。在成人、血清学阳性儿童及 6 个月以上的血清学阴性儿童中, 对这些疫苗进行了临床评估, 结果显示, 除了 *rA2cp*ΔNS2 在血清学阴性儿童减毒不足外, 另外两个减毒株在各受试人群均存

在过度减毒的问题, 结果证实了 NS2 蛋白作为 I 型 IFN 拮抗剂在 RSV 致病性上的作用, 也说明缺失 NS2 等基因是构建 RSV 减毒活疫苗的有效方法^[54]. 可喜的是, 接种 rA2cp248/404ΔSH, rA2cp248/404/1030ΔSH, rA2cp248/404ΔNS2 和 rA2cp530/1009ΔNS2 的血清学阴性的婴幼儿, 与对照组相比, 在随后的 RSV 流行季节中未出现 ERD^[55].

rA2cpΔNS1 及 rA2cpΔM2-2 减毒活疫苗虽然未进入临床试验, 但利用血清阴性的猩猩开展的免疫效果和免疫保护实验有以下发现: ① 各减毒株的减毒效果依次为: rA2ΔSH < rA2ΔNS2 < rA2cp248/404 < rA2ΔNS1 < rA2ΔM2-2; ② 像 rA2cp248/404 一样, rA2ΔNS1 和 rA2ΔM2-2 均能诱导猩猩针对 *wtRSV* 产生有效的免疫保护作用. 结合此前 *cpts248/404* 的临床试验结果, 相信 rA2ΔNS1 和 rA2ΔM2-2 是理想的 RSV 候选疫苗, 应及时开展以低龄新生儿为对象的临床试验^[16,45,53].

另外, 由于 RSV 基因组中各基因的先后顺序也是影响 mRNA 转录和蛋白质表达水平的重要影响因素, 因此, 有人将融合蛋白(fusion glycoprotein, F)和 G 基因移动到 RSV 基因组 3'端启动子附近区域, 提高了病毒在体外的复制能力, 增加了 F 和 G 蛋白的表达量, 获得重组 RSV 免疫小鼠后, 能诱导产生更好的免疫效果^[56].

最近有研究认为, 缺失 G 基因后的重组 RSV 病毒疫苗显示出很好的减毒效果, 而且诱导棉鼠产生了长期的免疫保护作用^[57].

(iii) 通过密码子改造, 增加减毒活疫苗的遗传稳定性. 与基因缺失(deletion)突变和 *hr* 突变相比, 许多 *ts* 表型是由氨基酸替换突变形成的. 这种突变的遗传稳定性较差, 如 rA2cp248/404/1030ΔSH 重组病毒疫苗接种受试者后, 少量分离株出现了毒力回复问题, 主要涉及 248 和 1030 位氨基酸.

248 位 *ts* 突变位于 L 蛋白, 为 Gln-831-Leu, 密码子由编码 Gln 的 CAA 突变为编码 Leu 的 CTG. 但由于 CAG 也是编码 Gln 的密码子, 因此若 CTG 中的 T→A, 仅有一个碱基突变, Leu 就能回复为野生型 Gln. 因此, 在编码 Leu 的 6 个密码子中(CTA, CTC, CTG, CTT, TTA 和 TTG), 选用 CTC, CTT, TTA 或 TTG 4 种密码子编码 Leu, 避免使用 CTA 及 CTG. 这样需要两个碱基同时突变, 才能发生氨基酸的回复突变, 从而增加了由 Leu 回复为 Gln 的难度, 从而有

助于减少重组病毒回复突变的可能性. 这种通过增加单个密码子中碱基替换数量的方法曾用于 *cp* 突变位点的研究^[40].

1030 位 *ts* 突变也位于 L 蛋白上, 为 Tyr-1321-Asn, 密码子由编码 Tyr 的 TAT 突变为编码 Asn 的 AAT, 因此只需要 AAT 中的第一个碱基 A→T, Asn 就能回复为野生型的 Tyr. 由于编码 Asn 的密码子仅有 AAT 和 AAC, 而编码 Tyr 的密码子为 TAT 和 TAC, 因此无论选择 AAT 还是 AAC, 只需要一个碱基突变, Asn 就能被重新替换为 Tyr, 即发生回复突变. 针对这种情况, 通过筛选其他的氨基酸, 尽可能使其与野生型氨基酸的密码子存在足够大的差异, 增加重组病毒疫苗的遗传稳定性, 同时也要保证 *ts* 及 *att* 表型. 该减毒策略已成功用于研发人副流感病毒(human parainfluenza virus, HPIV)重组病毒疫苗^[41,58,59].

(iv) 通过基因插入, 构建嵌合病毒. ① 获得可针对 RSV A 和 B 两个亚型均有免疫保护作用的 RSV A/B 嵌合重组病毒疫苗. 因为 RSV G 蛋白抗原性的差异, RSV 有 A 和 B 两个亚型(subtype), 因此理想的 RSV 疫苗应能同时为两种不同亚型的 RSV 感染提供保护作用. 以反向遗传学方法, 构建了用 RSV B 亚型 F 和 G 糖蛋白替换 A 亚型 F 和 G 糖蛋白的嵌合 RSV 重组病毒. 体内外实验显示, 该嵌合病毒具有与其 A 和 B 亚型野生型亲本病毒同样的复制能力, 说明嵌合作用本身对病毒的毒力没有任何影响, 为利用现有的各种 A 亚型的 *att* 突变构建有较好减毒效果及免疫原性的 RSV A/B 嵌合重组病毒提供了实验依据, 在此基础上, 以 A 亚型 RSV *cpts248/404/1030* 减毒株为骨架构建的 RSV A/B 嵌合重组病毒(rABcpts248/404/1030)在猩猩体内与其 A 亚型亲本 rA2RSV *cpts248/404/1030* 具有相似的减毒效果, 并诱导产生了针对野生型 RSV A/B 嵌合重组病毒的免疫保护作用^[60]. 值得一提的是, RSV A/B 嵌合重组病毒之所以能获得与 A 亚型类似的减毒效果, 与已知的 RSV A 亚型各种 *att* 突变位点多位于 G 和 F 基因以外显然存在密切联系^[16]. 为构建 RSV A/B 嵌合重组病毒, 有人尝试仅将 B 亚型 G 蛋白插入 A 亚型基因组中, 获得可同时表达两个亚型的 G 蛋白及仅表达 A 亚型 F 蛋白的嵌合重组病毒, 制备可同时预防 RSV A, B 两个亚型感染的双价疫苗^[61]; ② 以其他呼吸道 RNA 病毒为载体, 构建能预防 RSV 感染的重组病毒. 鉴于 BRSV 病毒在猩猩体内复制水平很低, 不能诱导产生有效免疫力抵

抗RSV感染, 为提高BRSV的复制能力和免疫原性, 尝试以RSV A亚型F和G蛋白替换BRSV的相应蛋白, 构建了重组人/牛嵌合RSV病毒, 但以猩猩为对象完成的免疫效果和免疫保护实验未获得预期结果^[26,28]。

2 活病毒载体疫苗

可用于表达RSV保护性抗原的病毒载体有许多种类, 以病毒载体替代RSV的优点是: ① 相对于亚单位疫苗, 表达的RSV保护性抗原可在人细胞内从头合成, 形成的蛋白构象与RSV自然感染后表达的完全相同, 不会导致抗原表位的丧失或变化, 形成的免疫力更利于抵抗随后的自然感染^[16]; ② 可避免RSV存在的体外繁殖滴度低和稳定性差的问题, 有利于疫苗的大规模制备和运送。这是因为RSV活疫苗的使用剂量约为 1×10^5 PFU/mL, 利用细胞培养方法获得的疫苗病毒的最大产量约为 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ PFU/mL。由于病毒很不稳定, 在疫苗进行滤过、冻干、包装、贮存、再水化等过程中, 其感染性会受到很大影响, 因此制备足够量的RSV活疫苗仍面临一定问题^[62]。

病毒载体疫苗的缺点在于, 一般仅表达RSV 11种蛋白中的1~2种, 如F和/或G蛋白, 这会导致能诱导细胞免疫的抗原不足, 而细胞介导的免疫应答至少在短期内具有明显的保护作用, 有利于为新生儿提供更加有效的免疫保护作用, 因此应尽可能多的表达病毒抗原。另外, 病毒载体必须充分减毒以确保其体内应用的安全性, 同时应有助于增强所表达RSV抗原的免疫原性^[62]。

根据病毒的种类不同可将用于RSV疫苗研究的病毒载体分为两类: 一类是DNA病毒载体, 如痘苗病毒(vaccinia virus)载体和腺病毒(adenovirus)载体等。其中痘苗病毒载体是最早用于RSV疫苗研究的病毒载体, 但至今尚没有DNA病毒载体重组RSV疫苗用于临床研究的报道; 一类是副黏病毒(paramyxovirus)载体, 主要包括人或牛副流感病毒(parainfluenza virus, PIV)载体和仙台病毒(sendai virus, SeV)载体等, 其中以牛副流感病毒(bovin parainfluenza virus, BPIV)为载体的重组RSV疫苗已进入临床试验。

2.1 DNA病毒载体疫苗

(1) 痘苗病毒载体疫苗。以痘苗病毒表达RSV

抗原的研究可追溯到20世纪80年代中期^[63,64]。2004年, 以改良的安卡拉痘苗病毒(modified vaccinia virus Ankara, MVA)载体构建的可表达RSV F和G蛋白的重组RSV疫苗在新生猴中的实验失败, 未能诱导其产生有效的免疫保护作用^[65], 从此历时约20余年的痘苗病毒载体RSV疫苗研究基本宣告结束。

(2) 腺病毒载体疫苗。腺病毒4和7型在美国军队有很长的应用历史, 通过口服4和7型腺病毒活疫苗诱导产生免疫保护作用, 预防腺病毒呼吸道感染^[66]。因此, 腺病毒载体疫苗具有较好的安全性。

最早用于表达异源性抗原的腺病毒载体为复制型腺病毒(replication-competent adenovirus)载体。该类腺病毒载体缺失了腺病毒复制非必需的E3区。曾以4、5和7型复制型腺病毒载体为基础构建的可表达F蛋白的重组腺病毒疫苗, 在棉鼠、雪貂和犬模型中进行免疫保护作用研究, 经过口服、鼻内和气管内等途径分别免疫后, 均可诱导产生RSV中和抗体, 且有较完全的免疫保护作用^[67~69]。但在随后的猩猩模型中发现, 经口服途径免疫可表达F蛋白的复制型重组腺病毒载体未能诱导保护性免疫应答^[68]。

目前多采用的是复制缺陷型腺病毒(replication-deficient adenovirus)载体, 与复制型腺病毒载体相比, 复制缺陷型腺病毒载体因缺乏编码病毒转录因子的E1区, 只能在293包装细胞中完成复制, 在体内、体外的其他敏感细胞中均不能复制, 因此体内应用更加安全、可靠。由于缺乏E1b, 不导致解宿主细胞的裂解和死亡, 从而使转基因表达时间延长。其可诱导机体产生有效的免疫应答, 在动物实验中显示具有较好的免疫保护作用。黏膜途径免疫效果显著提高^[70,71]。本课题组及其他研究小组以复制缺陷型腺病毒载体表达RSV F或G蛋白的重组RSV疫苗免疫小动物后, 均获得了一定的免疫保护作用^[72~75]。通过靶向树突状细胞(dendritic cells, DCs)等进一步提高其免疫原性的措施, 有望得到更加有效的RSV重组腺病毒疫苗, 同时开展灵长类动物实验, 深入了解其免疫保护效果。

另外, 本课题组及其他研究小组发现, 缺失了腺病毒全部编码基因的辅助病毒依赖型腺病毒(helper-dependent adenovirus, HDAd)载体用于疫苗研究时, 能诱导机体产生更好的转基因免疫效果和减轻的不良反应^[76,77]。本实验室已完成可表达密码子优化的RSV F抗原重组HDAd载体的构建, 经滴鼻途径免疫小鼠显示, 诱导产生了较好的免疫保护效果。

2.2 副黏病毒载体疫苗

(1) PIV 载体疫苗. 与 RSV 一样, 人副流感病毒 (human parainfluenza virus, HPIV) 也是引起婴幼儿下呼吸道感染的重要病毒病原, 同属副黏病毒科, 均为单股负链 RNA 病毒, 且两者的流行特点相似. 因此, 如以 PIV 为载体构建可表达 RSV 主要中和抗原的重组病毒, 获得同时预防 PIV 和 RSV 两种病毒感染的二价疫苗, 具有更好的应用前景和实际意义. 一种嵌合重组病毒 rB/HPIV3, 以 BPIV3 型病毒作为骨架, 含有 HPIV3 的血凝素-神经氨酸酶蛋白 (hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein, HN) 和 F 蛋白以及 RSV 的 F 或 G 蛋白, 其中作为骨架的 BPIV3 具有 *hr* 限制性, 使得该重组病毒在人等灵长类动物中有很好的减毒效果. HPIV3 的 HN 和 F 可诱导恒河猴 (*Macaca mulatta*) 产生针对 HPIV3 的抵抗力, 而 RSV 的 F 或 G 可诱导恒河猴产生针对 RSV 的抵抗力^[78]. 后来在此基础上又构建了可同时表达 RSV A 或 B 亚型的 F 和 G 蛋白的重组嵌合病毒 rB/HPIV3-RSV. 在恒河猴的实验中, 该病毒显示了很好的免疫原性和安全性, 是一种潜在的可同时预防 RSV A、B 和 PIV3 感染的三价儿童候选疫苗^[79]. 美国 MedImmune 公司开展了一项以 BPIV3 为骨架构建可表达 HPIV3 HN 及 F 蛋白和 RSV A 亚型 F 蛋白的重组病毒 rB/HPIV3-RSV (MEDI-543) 的临床试验. I 期结果显示, 该二价重组病毒疫苗在成人體內具有较好的安全性, 以 6~24 月龄儿童为对象的 I 期临床试验结果尚未见报道^[80-82].

与 *wtRSV* 和各种减毒的 RSV 病毒疫苗相比, 除了均可通过滴鼻途径进行免疫外, PIV 作为载体表达 RSV 保护性抗原、制备 RSV 疫苗的优势在于: 载体本身 (HPIV1 和 HPIV3) 即为疫苗, 且可交替用于初免和加强免疫 (prime/boost), 有利于避免机体产生的针对载体的免疫反应对载体疫苗的不利影响; 在体外能实现高效率复制, 获得很高的病毒滴度, 能充分满足大规模制备的需要; 具有很好的稳定性, 能长期保持感染活性, 便于疫苗的制备、运送、贮存和使用; 可用于制备二价或多价疫苗等^[2,16].

(2) 其他 PIV 载体疫苗. 可用于构建重组病毒

以表达 RSV 主要保护性抗原的呼吸道 RNA 病毒还包括新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 和 SeV, 它们均属于副黏病毒科, 为单股负链 RNA 病毒. NDV 的自然宿主是禽类, 在哺乳动物细胞的复制能力较差, 但作为 I 型干扰素诱导剂, 能刺激机体产生强烈的免疫应答. 表达 RSV F 蛋白的重组 NDV 病毒, 可诱导小鼠产生有效的免疫保护作用, 抵抗 *wtRSV* 感染^[83]. SeV 为鼠副流感病毒 1 型, I 期临床试验显示, SeV 作为人用疫苗载体是安全、有效的^[84], 表达 RSV F 蛋白或分泌型 G 蛋白的重组病毒可诱导棉鼠产生 RSV 特异性的保护性应答^[85,86].

3 展望

随着重组技术和反向遗传学的应用, 大大加快了 RSV 活疫苗研究的步伐. 通过综合应用非-*ts* 点突变、*ts* 点突变、基因缺失及 *hr* 遗传因子 (determinants) 等突变方法改造野生型 RSV 病毒及利用各种病毒载体构建表达 RSV 中和抗原, 已经产生了许多有潜力的、已进入或即将进入临床试验的候选重组病毒疫苗, 包括美国 MedImmune 公司的 rA2cp248/404/1030/ΔSH 和 rB/HPIV3-RSV 及 NIH 的 rA2cp248/404/1030/ΔNS2 等重组病毒疫苗.

本综述主要探讨可用于预防婴幼儿感染的 RSV 活疫苗, 这也是目前 RSV 疫苗的希望所在及重点突破方向. 虽然老年人及免疫力低下的成年人也是 RSV 重要的易感人群, 但由于免疫系统发育程度及血清抗体等存在的差异, 很难发现能同时适用于两种人群的 RSV 疫苗. 因此, 有必要着手研究能应用于成年及老年人群的有效免疫策略及疫苗形式, 目前认为病毒载体疫苗及亚单位疫苗是有潜力的候选疫苗. 由于 RSV 疫苗研制中存在巨大风险, 其他新型疫苗, 如 DNA 疫苗等, 虽然具有安全性好、制备简单、可规模化生产、成本较低、能够突破母传抗体干扰等优点, 但存在免疫原性弱的缺点, 因此在 RSV 活疫苗取得成功前, DNA 疫苗等用于临床试验的可能性较小. 期待通过疫苗接种减轻 RSV 感染的严重程度、防止因 RSV 感染引起的下呼吸道疾病成为现实.

参考文献

- 1 Fleming D M, Elliot A J. Respiratory syncytial virus: a sleeping giant? *Eur Respir J*, 2007, 30: 1029-1031

- 2 Karron R A. Respiratory Syncytial Virus Vaccine. In: Plotkin S A, Orenstein W A, Offit P A, eds. *Vaccines*, 5th ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier, 2008. 1283–1293
- 3 Power U F. Respiratory syncytial virus (RSV) vaccines—two steps back for one leap forward. *J Clin Virol*, 2008, 41: 38–44
- 4 Englund J. In search of a vaccine for respiratory syncytial virus: the saga continues. *J Infect Dis*, 2005, 191: 1036–1039
- 5 Zeng R, Qi X, Gong W, et al. Long-lasting balanced immunity and protective efficacy against respiratory syncytial virus in mice induced by a recombinant protein G1F/M2. *Vaccine*, 2007, 25: 7422–7428
- 6 Fu Y, He J, Zheng X, et al. Intranasal immunization with a replication-deficient adenoviral vector expressing the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus elicits protective immunity in BALB/c mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 381: 528–532
- 7 Fu Y H, He J S, Wang X B, et al. A prime-boost vaccination strategy using attenuated *Salmonella typhimurium* and a replication-deficient recombinant adenovirus vector elicits protective immunity against human respiratory syncytial virus. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 395: 87–92
- 8 Xie C, He J S, Zhang M, et al. Oral respiratory syncytial virus (RSV) DNA vaccine expressing RSV F protein delivered by attenuated *Salmonella typhimurium*. *Hum Gene Ther*, 2007, 18: 746–752
- 9 Ghildyal R, Ho A, Jans D A. Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection. *FEMS Microbiol Rev*, 2006, 30: 692–705
- 10 Brandenburg A H, Neijens H J, Osterhaus A D. Pathogenesis of RSV lower respiratory tract infection: implications for vaccine development. *Vaccine*, 2001, 19: 2769–2782
- 11 Kumar M, Behera A K, Lockey R F, et al. Intranasal gene transfer by chitosan-DNA nanospheres protects BALB/c mice against acute respiratory syncytial virus infection. *Hum Gene Ther*, 2002, 13: 1415–1425
- 12 Kapikian A Z, Mitchell R H, Chanock R M, et al. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am J Epidemiol*, 1969, 89: 405–421
- 13 Kim H W, Canchola J G, Brandt C D, et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol*, 1969, 89: 422–434
- 14 Polack F P, Teng M N, Collins P L, et al. A role for immune complexes in enhanced respiratory syncytial virus disease. *JEM*, 2002, 196: 859–865
- 15 Connors M, Giese N A, Kulkarni A B, et al. Enhanced pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of interleukin-4 (IL-4) and IL-10. *J Virol*, 1994, 68: 5321–5325
- 16 Schmidt A, Bartlett E, Schaap-Nutt A, et al. Vaccines against respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses. In: Levine M M, Dougan G, Good M F, eds. *New Generation Vaccines*, 4th ed. New York: Informa Healthcare, 2009. 620–632
- 17 Murphy B R, Hall S L, Kulkarni A B, et al. An update on approaches to the development of respiratory syncytial virus (RSV) and parainfluenza virus type 3 (PIV3) vaccines. *Virus Res*, 1994, 32: 13–36
- 18 Friedewald W T, Forsyth B R, Smith C B, et al. Low-temperature-grown RS virus in adult volunteers. *JAMA*, 1968, 204: 690–694
- 19 Belshe R B, Hissom F K. Cold adaptation of parainfluenza virus type 3: induction of three phenotypic markers. *J Med Virol*, 1982, 10: 235–242
- 20 Belshe R B, Van Voris L P, Mufson M A. Parenteral administration of live respiratory syncytial virus vaccine: results of a field trial. *J Infect Dis*, 1982, 145: 311–319
- 21 Wright P F, Karron R A, Belshe R B, et al. Evaluation of a live, cold-passaged, temperature-sensitive, respiratory syncytial virus vaccine candidate in infancy. *J Infect Dis*, 2000, 182: 1331–1342
- 22 Schickli J H, Dubovsky F, Tang R S. Challenges in developing a pediatric RSV vaccine. *Hum Vaccines*, 2009, 5: 582–591
- 23 Murata Y. Respiratory syncytial virus vaccine development. *Clin Lab Med*, 2009, 29: 725–739
- 24 Crowe J E Jr, Collins P L, Chanock R M, et al. Vaccines against respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3. In: Levine M M, W G, Kaper J B, Cobon G S, eds. *New Generation Vaccines*. New York: Marcel Dekker, 1997. 711–725
- 25 Chanock R M, Murphy B M. Past efforts to develop safe and effective RSV vaccines. In: Meignier B M B, Ogra P, eds. *Animal Models of Respiratory Syncytial Virus Infections*. Lyon: Merieux Foundation Publication, 1991. 35–42
- 26 Crowe J E Jr. Current approaches to the development of vaccines against disease caused by respiratory syncytial virus (RSV) and parainfluenza virus (PIV). A meeting report of the WHO Programme for Vaccine Development. *Vaccine*, 1995, 13: 415–421
- 27 Piazza F M, Johnson S A, Darnell M E, et al. Bovine respiratory syncytial virus protects cotton rats against human respiratory syncytial virus infection. *J Virol*, 1993, 67: 1503–1510

- 28 Buchholz U J, Granzow H, Schuldt K, et al. Chimeric bovine respiratory syncytial virus with glycoprotein gene substitutions from human respiratory syncytial virus (HRSV): effects on host range and evaluation as a live-attenuated HRSV vaccine. *J Virol*, 2000, 74: 1187–1199
- 29 Whitehead S S, Firestone C Y, Collins P L, et al. A single nucleotide substitution in the transcription start signal of the M2 gene of respiratory syncytial virus vaccine candidate cpts248/404 is the major determinant of the temperature-sensitive and attenuation phenotypes. *Virology*, 1998, 247: 232–239
- 30 Whitehead S S, Juhasz K, Firestone C Y, et al. Recombinant respiratory syncytial virus (RSV) bearing a set of mutations from cold-passaged RSV is attenuated in chimpanzees. *J Virol*, 1998, 72: 4467–4471
- 31 Crowe J E Jr, Bui P T, London W T, et al. Satisfactorily attenuated and protective mutants derived from a partially attenuated cold-passaged respiratory syncytial virus mutant by introduction of additional attenuating mutations during chemical mutagenesis. *Vaccine*, 1994, 12: 691–699
- 32 Crowe J E Jr, Bui P T, Davis A R, et al. A further attenuated derivative of a cold-passaged temperature-sensitive mutant of human respiratory syncytial virus retains immunogenicity and protective efficacy against wild-type challenge in seronegative chimpanzees. *Vaccine*, 1994, 12: 783–790
- 33 Crowe J E Jr, Bui P T, Siber G R, et al. Cold-passaged, temperature-sensitive mutants of human respiratory syncytial virus (RSV) are highly attenuated, immunogenic, and protective in seronegative chimpanzees, even when RSV antibodies are infused shortly before immunization. *Vaccine*, 1995, 13: 847–855
- 34 Karron R A, Wright P F, Crowe J E Jr, et al. Evaluation of two live, cold-passaged, temperature-sensitive respiratory syncytial virus vaccines in chimpanzees and in human adults, infants, and children. *J Infect Dis*, 1997, 176: 1428–1436
- 35 Whitehead S S, Firestone C Y, Karron R A, et al. Addition of a missense mutation present in the L gene of respiratory syncytial virus (RSV) cpts530/1030 to RSV vaccine candidate cpts248/404 increases its attenuation and temperature sensitivity. *J Virol*, 1999, 73: 871–877
- 36 Connors M, Crowe J E Jr, Firestone C Y, et al. A cold-passaged, attenuated strain of human respiratory syncytial virus contains mutations in the F and L genes. *Virology*, 1995, 208: 478–484
- 37 Firestone C Y, Whitehead S S, Collins P L, et al. Nucleotide sequence analysis of the respiratory syncytial virus subgroup A cold-passaged (cp) temperature sensitive (ts) cpts-248/404 live attenuated virus vaccine candidate. *Virology*, 1996, 225: 419–422
- 38 Crowe J E Jr, Firestone C Y, Whitehead S S, et al. Acquisition of the ts phenotype by a chemically mutagenized cold-passaged human respiratory syncytial virus vaccine candidate results from the acquisition of a single mutation in the polymerase (L) gene. *Virus Genes*, 1996, 13: 269–273
- 39 Karron R A, Wright P F, Belshe R B, et al. Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. *J Infect Dis*, 2005, 191: 1093–1104
- 40 Juhasz K, Whitehead S S, Bui P T, et al. The temperature-sensitive (ts) phenotype of a cold-passaged (cp) live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate, designated cpts530, results from a single amino acid substitution in the L protein. *J Virol*, 1997, 71: 5814–5819
- 41 Collins P L, Murphy B R. New generation live vaccines against human respiratory syncytial virus designed by reverse genetics. *PATS*, 2005, 2: 166–173
- 42 Juhasz K, Whitehead S S, Boulanger C A, et al. The two amino acid substitutions in the L protein of cpts530/1009, a live-attenuated respiratory syncytial virus candidate vaccine, are independent temperature-sensitive and attenuation mutations. *Vaccine*, 1999, 17: 1416–1424
- 43 Karron R A, Buonagurio D A, Georgiu A F, et al. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication *in vitro*: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 13961–13966
- 44 Jin H, Zhou H, Cheng X, et al. Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated *in vitro* and *in vivo*. *Virology*, 2000, 273: 210–218
- 45 Whitehead S S, Bukreyev A, Teng M N, et al. Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees. *J Virol*, 1999, 73: 3438–3442
- 46 Bukreyev A, Whitehead S S, Murphy B R, et al. Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *J Virol*, 1997, 71: 8973–8982
- 47 Spann K M, Tran K C, Chi B, et al. Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. *J Virol*, 2004, 78: 4363–4369
- 48 Schlender J, Bossert B, Buchholz U, et al. Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize

- alpha/beta interferon-induced antiviral response. *J Virol*, 2000, 74: 8234–8242
- 49 Ramaswamy M, Shi L, Varga S M, et al. Respiratory syncytial virus nonstructural protein 2 specifically inhibits type I interferon signal transduction. *Virology*, 2006, 344: 328–339
- 50 Lo M S, Brazas R M, Holtzman M J. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness. *J Virol*, 2005, 79: 9315–9319
- 51 Bermingham A, Collins P L. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 11259–11264
- 52 Jin H, Cheng X, Zhou H Z, et al. Respiratory syncytial virus that lacks open reading frame 2 of the M2 gene (M2-2) has altered growth characteristics and is attenuated in rodents. *J Virol*, 2000, 74: 74–82
- 53 Teng M N, Whitehead S S, Bermingham A, et al. Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees. *J Virol*, 2000, 74: 9317–9321
- 54 Wright P F, Karron R A, Madhi S A, et al. The interferon antagonist NS2 protein of respiratory syncytial virus is an important virulence determinant for humans. *J Infect Dis*, 2006, 193: 573–581
- 55 Wright P F, Karron R A, Belshe R B, et al. The absence of enhanced disease with wild type respiratory syncytial virus infection occurring after receipt of live, attenuated, respiratory syncytial virus vaccines. *Vaccine*, 2007, 25: 7372–7378
- 56 Kreml C, Murphy B R, Collins P L. Recombinant respiratory syncytial virus with the G and F genes shifted to the promoter-proximal positions. *J Virol*, 2002, 76: 11931–11942
- 57 Widjoatmodjo M N, Boes J, van Bers M, et al. A highly attenuated recombinant human respiratory syncytial virus lacking the G protein induces long-lasting protection in cotton rats. *J Virol*, 2010, 7: 114
- 58 Nolan S M, Surman S R, Amaro-Carambot E, et al. Live-attenuated intranasal parainfluenza virus type 2 vaccine candidates developed by reverse genetics containing L polymerase protein mutations imported from heterologous paramyxoviruses. *Vaccine*, 2005, 23: 4765–4774
- 59 McAuliffe J M, Surman S R, Newman J T, et al. Codon substitution mutations at two positions in the L polymerase protein of human parainfluenza virus type 1 yield viruses with a spectrum of attenuation *in vivo* and increased phenotypic stability *in vitro*. *J Virol*, 2004, 78: 2029–2036
- 60 Whitehead S S, Hill M G, Firestone C Y, et al. Replacement of the F and G proteins of respiratory syncytial virus (RSV) subgroup A with those of subgroup B generates chimeric live attenuated RSV subgroup B vaccine candidates. *J Virol*, 1999, 73: 9773–9780
- 61 Jin H, Clarke D, Zhou H Z, et al. Recombinant human respiratory syncytial virus (RSV) from cDNA and construction of subgroup A and B chimeric RSV. *Virology*, 1998, 251: 206–214
- 62 Collins P L, Murphy B R. Vaccines against human respiratory syncytial virus. In: Cane P, ed. *Respiratory Syncytial Virus*. Amsterdam: Elsevier, 2007. 233–277
- 63 Elango N, Prince G A, Murphy B R, et al. Resistance to human respiratory syncytial virus (RSV) infection induced by immunization of cotton rats with a recombinant vaccinia virus expressing the RSV G glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 1906–1910
- 64 Ball L A, Young K K, Anderson K, et al. Expression of the major glycoprotein G of human respiratory syncytial virus from recombinant vaccinia virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 246–250
- 65 de Waal L, Wyatt L S, Yuksel S, et al. Vaccination of infant macaques with a recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the respiratory syncytial virus F and G genes does not predispose for immunopathology. *Vaccine*, 2004, 22: 923–926
- 66 Gutekunst R R, White R J, Edmondson W P, et al. Immunization with live type 4 adenovirus: determination of infectious virus dose and protective effect of enteric infection. *Am J Epidemiol*, 1967, 86: 341–349
- 67 Hsu K H, Lubeck M D, Bhat B M, et al. Efficacy of adenovirus-vectored respiratory syncytial virus vaccines in a new ferret model. *Vaccine*, 1994, 12: 607–612
- 68 Hsu K H, Lubeck M D, Davis A R, et al. Immunogenicity of recombinant adenovirus-respiratory syncytial virus vaccines with adenovirus types 4, 5, and 7 vectors in dogs and a chimpanzee. *J Infect Dis*, 1992, 166: 769–775
- 69 Collins P L, Prince G A, Camargo E, et al. Evaluation of the protective efficacy of recombinant vaccinia viruses and adenoviruses that express respiratory syncytial virus glycoproteins. In: Brown F, Chanock R M, Ginsberg H S, eds. *Vaccines 90: Modern Approaches to New Vaccines Including Prevention of AIDS*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990. 79–84
- 70 Xiang Z Q, Yang Y, Wilson J M, et al. A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. *Virology*, 1996, 219: 220–227
- 71 Randrianarison-Jewtoukoff V, Perricaudet M. Recombinant adenoviruses as vaccines. *Biologicals*, 1995, 23: 145–157
- 72 Fu Y, He J, Zheng X, et al. Intranasal immunization with a replication-deficient adenoviral vector expressing the fusion glycoprotein of

- respiratory syncytial virus elicits protective immunity in BALB/c mice. *BBRC*, 2009, 381: 528–532
- 73 Kohlmann R, Schwannecke S, Tippler B, et al. Protective efficacy and immunogenicity of an adenoviral vector vaccine encoding the codon-optimized F protein of respiratory syncytial virus. *J Virol*, 2009, 83: 12601–12610
- 74 Yu J R, Kim S, Lee J B, et al. Single intranasal immunization with recombinant adenovirus-based vaccine induces protective immunity against respiratory syncytial virus infection. *J Virol*, 2008, 82: 2350–2357
- 75 Kim S, Jang J E, Yu J R, et al. Single mucosal immunization of recombinant adenovirus-based vaccine expressing F1 protein fragment induces protective mucosal immunity against respiratory syncytial virus infection. *Vaccine*, 2010, 28: 3801–3808
- 76 Weaver E A, Nehete P N, Buchl S S, et al. Comparison of replication-competent, first generation, and helper-dependent adenoviral vaccines. *PLoS One*, 2009, 4: e5059
- 77 Fu Y H, He J S, Zheng X X, et al. Intranasal vaccination with a helper-dependent adenoviral vector enhances transgene-specific immune responses in BALB/c mice. *BBRC*, 2010, 391: 857–861
- 78 Schmidt A C, McAuliffe J M, Murphy B R, et al. Recombinant bovine/human parainfluenza virus type 3 (B/HPIV3) expressing the respiratory syncytial virus (RSV) G and F proteins can be used to achieve simultaneous mucosal immunization against RSV and HPIV3. *J Virol*, 2001, 75: 4594–4603
- 79 Schmidt A C, Wenzke D R, McAuliffe J M, et al. Mucosal immunization of rhesus monkeys against respiratory syncytial virus subgroups A and B and human parainfluenza virus type 3 by using a live cDNA-derived vaccine based on a host range-attenuated bovine parainfluenza virus type 3 vector backbone. *J Virol*, 2002, 76: 1089–1099
- 80 Gomez N M, Walker R, Spaete R R, et al. Phase I study of a candidate live attenuated vaccine against respiratory syncytial virus (RSV) and parainfluenza virus type 3 (PIV3) in healthy adults. In: *IDSA Meeting*. Toronto, 2006, 183
- 81 Tang R S, MacPhail M, Schickli J H, et al. Parainfluenza virus type 3 expressing the native or soluble fusion (F) Protein of Respiratory Syncytial Virus (RSV) confers protection from RSV infection in African green monkeys. *J Virol*, 2004, 78: 11198–11207
- 82 Pennathur S, Haller A A, MacPhail M, et al. Evaluation of attenuation, immunogenicity and efficacy of a bovine parainfluenza virus type 3 (PIV-3) vaccine and a recombinant chimeric bovine/human PIV-3 vaccine vector in rhesus monkeys. *J Gen Virol*, 2003, 84: 3253–3261
- 83 Martinez-Sobrido L, Gitiban N, Fernandez-Sesma A, et al. Protection against respiratory syncytial virus by a recombinant Newcastle disease virus vector. *J Virol*, 2006, 80: 1130–1139
- 84 Slobod K S, Shenep J L, Lujan-Zilbermann J, et al. Safety and immunogenicity of intranasal murine parainfluenza virus type 1 (Sendai virus) in healthy human adults. *Vaccine*, 2004, 22: 3182–3186
- 85 Takimoto T, Hurwitz J L, Coleclough C, et al. Recombinant Sendai virus expressing the G glycoprotein of respiratory syncytial virus (RSV) elicits immune protection against RSV. *J Virol*, 2004, 78: 6043–6047
- 86 Zhan X, Hurwitz J L, Krishnamurthy S, et al. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein expressed by recombinant Sendai virus elicits B-cell and T-cell responses in cotton rats and confers protection against RSV subtypes A and B. *Vaccine*, 2007, 25: 8782–8793

Live Virus Vaccines Against Human Respiratory Syncytial Virus

HE JinSheng¹, FU YuanHui¹ & HONG Tao^{1,2}

1College of Life Sciences & Bioengineering, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China;

2Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

Human respiratory syncytial virus (RSV) is the major cause of bronchiolitis and pneumonia in infants and young children worldwide, and it is also a significant cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients and the elderly. For these reasons, there is a need to develop vaccine effective against RSV. Currently, several vaccine development strategies are being explored including subunit vaccines and live virus vaccines, etc. The live virus vaccines, either live attenuated RSV vaccines or live attenuated virus vectors encoding RSV protective antigens (vectored vaccines), are the potential candidate vaccines for seronegative infants, and have been paid more attention. Among them, the rA2cp248/404/1030ΔSH virus has shown to be highly attenuated and moderately immunogenic in infants no more than two months of age, absent with enhanced RSV disease during subsequent natural RSV infection in the vaccinees. Therefore, the current status and development of RSV live virus vaccines are reviewed.

human respiratory syncytial virus, live attenuated RSV vaccines, vectored vaccines, reverse genetics, recombination technology

doi: 10.1360/052010-513