



评述

EB病毒发现60周年: 回顾与展望专题

EB病毒疫苗的研究进展

姜紫莹[†], 田先淑[†], 谢楚, 钟茜, 孙聪^{*}, 曾木圣^{*}

华南恶性肿瘤防治全国重点实验室, 广东省鼻咽癌诊治研究重点实验室, 广东省恶性肿瘤临床医学研究中心, 中山大学肿瘤防治中心, 广州 510060

[†] 同等贡献^{*} 联系人, E-mail: suncong@sysucc.org.cn; zengmsh@sysucc.org.cn

收稿日期: 2024-10-13; 接受日期: 2024-11-07; 网络版发表日期: 2024-12-02

国家自然科学基金(批准号: 82030046)、国家重点研发计划(批准号: 2022YFC3400900)和中国博士后科学基金(批准号: GZB20230886, 2023M743998)资助

摘要 EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)是一种双链DNA病毒, 属于疱疹病毒属。作为人类发现的第一个致癌病毒, EB病毒感染与多种血液及上皮细胞性肿瘤密切相关。因此, 有效的EB病毒预防性和治疗性疫苗对于疾病的防治有着重要意义, 但目前为止还没有一款EB病毒疫苗获批临床使用。新型冠状病毒感染的暴发给全球病毒防控带来挑战, 但同时也促进了一系列疫苗创新设计的出现。无论是在疫苗抗原的选择, 还是新型疫苗平台的研发方面, 新冠疫苗的发展都为病毒疫苗研发工作提供了新的思路 and 方向。近几年EB病毒疫苗的研发在纳米颗粒疫苗、mRNA疫苗等方面获得了较大的发展, 多种EB病毒疫苗进入了临床试验。因此, 本文将基于疫苗抗原的选择、疫苗平台和佐剂的使用和疫苗评估系统三个方面对EB病毒疫苗的研究现状进行综述, 并对未来该领域的发展进行展望。

关键词 EB病毒, 疫苗, 糖蛋白, 佐剂, 动物模型

EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)是一种双链DNA病毒, 属于疱疹病毒属。据估计, 全球约有超过95%的人群曾感染EBV^[1]。作为人类发现的第一个致癌病毒, EB病毒的感染与包括鼻咽癌、淋巴瘤、EB病毒相关性胃癌等在内的多种淋巴及上皮细胞性肿瘤密切相关^[1,2]。研究报道, 2020年EB病毒感染与全球约239700~357900例新癌症病例和137900~208700例癌症死亡有关, 约占全球癌症负担的1.3%~1.9%^[3]。

EB病毒主要通过唾液传播, 初次感染主要发生在儿童时期, 大多数感染者无明显或仅有轻微的临床症

状。初次感染建立后, EB病毒可以在B细胞内建立持久的潜伏期, 表达多种潜伏期蛋白, 促进B细胞相关疾病的发生^[4]。在某些因素的刺激下, 处于潜伏期的EB病毒会发生再激活而进入裂解期, 一系列裂解期蛋白的表达也与多种EB病毒相关恶性肿瘤的发生相关^[4]。因此, 有效的预防EB病毒感染和治疗EB病毒相关疾病的疫苗对于疾病的防治有着重要意义。但目前为止还没有一款EB病毒预防性或治疗性疫苗获批临床, 主要与靶抗原的选择、疫苗研发平台的种类和疫苗评估系统等多种因素相关。基于此, 本文综述了目前EB病

引用格式: 姜紫莹, 田先淑, 谢楚, 等. EB病毒疫苗的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 2408–2426Jiang Z Y, Tian X S, Xie C, et al. Research progress on the vaccine of Epstein-Barr virus (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 2408–2426, doi: [10.1360/SSV-2024-0179](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0179)

毒疫苗研究的最新进展, 并总结了疫苗研发所面临的一系列问题和挑战, 以期未来EB病毒疫苗的发展提供新的思路 and 方向.

1 疫苗设计的抗原选择

筛选合适的抗原是疫苗设计的第一步. 候选抗原的种类及呈现形式决定疫苗的免疫效力. EB病毒疫苗预防作用的关键在于阻断EB病毒对宿主细胞的感染过程, 尤其是阻断初次感染. 此外, 抑制EB病毒在宿主细胞中的潜伏感染也有助于将病毒彻底清除. 理想的EB病毒疫苗应当能够诱导产生同时针对B细胞和上皮细胞的中和性抗体, 从而抑制EBV感染. 因此, 选择合适的EB病毒抗原及鉴定针对其特定位点的有效中和抗体是疫苗设计的基础. 以下介绍EB病毒疫苗设计最常用的几类抗原.

1.1 糖蛋白

EB病毒包膜表面有多种糖蛋白刺突(如gp350, gH/gL, gp42和gB)(图1A). 与其他疱疹病毒类似, 这些

糖蛋白组合在病毒与宿主细胞的受体识别、黏附、膜融合等过程^[5]中发挥关键作用. 其中gH/gL和gB在所有疱疹病毒表面保守表达, 在病毒与宿主间相互作用中扮演重要角色; 而gp350和gp42是EB病毒表面特有成分. gp350主要识别的受体有CR2 (CD21)^[6]或CR1 (CD35)^[7], 主要介导病毒与宿主细胞的结合; gH/gL/gp42通常以异源三聚体的形式存在, 其中gp42与B细胞的HLA-II结合^[8], 参与B细胞感染; gH/gL主要与缺乏CD21的上皮细胞表面的几种受体结合, 如非肌肉肌球蛋白重链IIA (non-muscle myosin heavy chain IIA, NMHC-IIA)^[9]和肾上腺素受体A2 (ephrin receptor A2, EphA2)^[10,11]和整合素^[12], 介导上皮细胞的感染; gB是一种关键的融合蛋白, 参与B细胞和上皮细胞的感染, 驱动病毒-宿主细胞膜融合和病毒颗粒内吞, 已鉴定上皮细胞表面的gB受体有神经纤毛蛋白Neuropilin1 (NRP1)^[13](图1B). 靶向糖蛋白的中和抗体可以有效抑制病毒进入宿主细胞(图1C), 对于预防EB病毒的初次感染具有关键作用, 因此, 糖蛋白是目前大多数EB病毒预防性疫苗的重要组分. 糖蛋白的分子间作用机制复杂, 进一步阐明糖蛋白的结构和作用机制有助于理

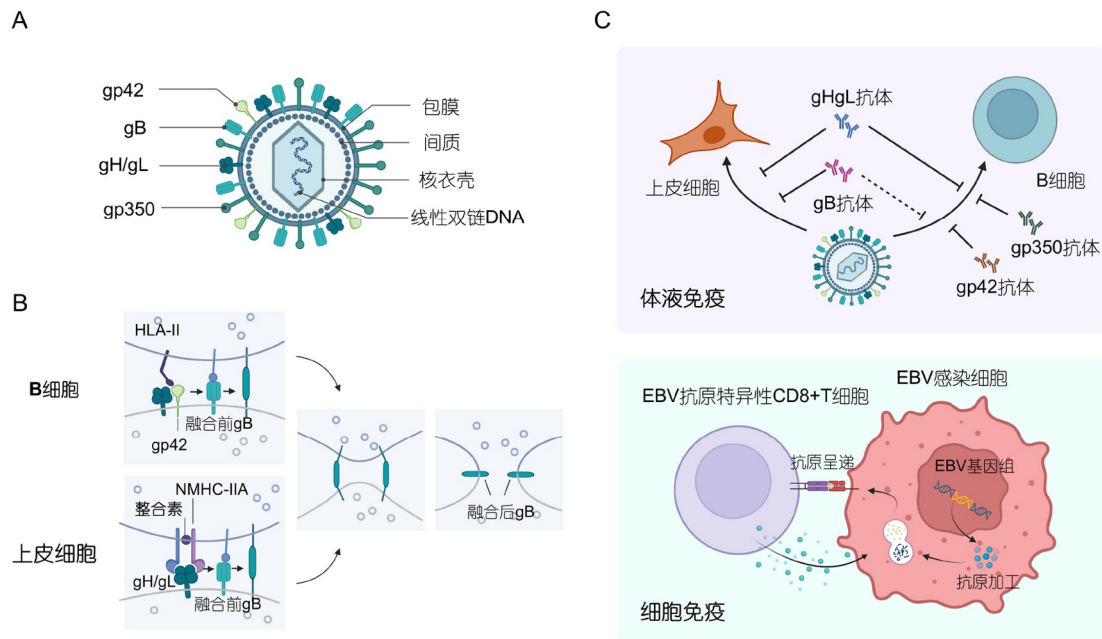


图 1 EB病毒结构、糖蛋白介导受体识别与膜融合, 及宿主体内抗病毒免疫反应示意图. A: EB病毒颗粒结构; B: EB病毒包膜糖蛋白参与病毒与宿主细胞的黏附、受体识别和膜融合; C: EB病毒在宿主体内引发的体液免疫和细胞免疫

Figure 1 Diagrams of EBV virion structure, the mechanism of glycoproteins mediating receptor binding and membrane fusion and the mechanism of host antiviral immune responses. A: The structure of EBV virion; B: EBV envelope glycoproteins mediate virus-host attachment, receptor binding and membrane fusion; C: the humoral immunity and cellular immunity response induced by EBV in host

解病毒-宿主细胞间相互作用方式,并为疫苗设计做出合适的抗原选择。

1.1.1 gp350

gp350是EB病毒包膜上表达最丰富的糖蛋白,也是EB病毒疫苗中最常见的候选抗原^[14-23]。1984年,第一个gp350亚单位疫苗问世^[24],也标志着EB病毒疫苗研究的开端。1995年,中国首次利用表达BNLF-1(gp350)的重组痘苗病毒(天坛株)开展临床试验,在血清学阴性和阳性的儿童体内诱导gp350特异性抗体产生^[25]。随后,以gp350为抗原的多种疫苗(大多数为亚单位疫苗)相继进入临床试验阶段^[14,26,27]。

随着纳米颗粒疫苗的问世, gp350疫苗的研发工作进入新阶段。近年来,多种新型gp350疫苗问世。2015年, Kanekiyo等人^[28]使用细菌铁蛋白(ferritin)和蛋白质纳米笼(encapsulin)分别构建了两种自组装纳米颗粒疫苗,它们能够在小鼠和食蟹猴中诱导针对gp350 CR2

结合位点的强效中和抗体产生。此外,两种以MF59或氢氧化铝凝胶(Alhydrogel[®])为佐剂制成的gp350纳米颗粒疫苗gp350D₁₂₃-LS和gp350D₁₂₃-I3-01,能够引起比gp350单体高65~133倍的中和抗体滴度,证明gp350D₁₂₃可能是一种具有前景的候选疫苗^[23]。近期,美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)针对健康人群的gp350铁蛋白纳米颗粒疫苗开展的I期临床试验正在招募受试者,拟对该疫苗的有效性 & 人体安全性进行初步验证(图2A, 表1)。

纳米颗粒技术的应用推动了gp350疫苗的发展。然而,目前gp350疫苗在临床试验中的效果并不理想,不能完全预防EB病毒的感染,也尚未有疫苗进入III期临床试验。仍需在现有疫苗的基础上进行优化或创新,并在动物模型和临床试验中进一步验证其有效性。

1.1.2 gH/gL和gp42

由于gH/gL复合物在B细胞,尤其是上皮细胞的感

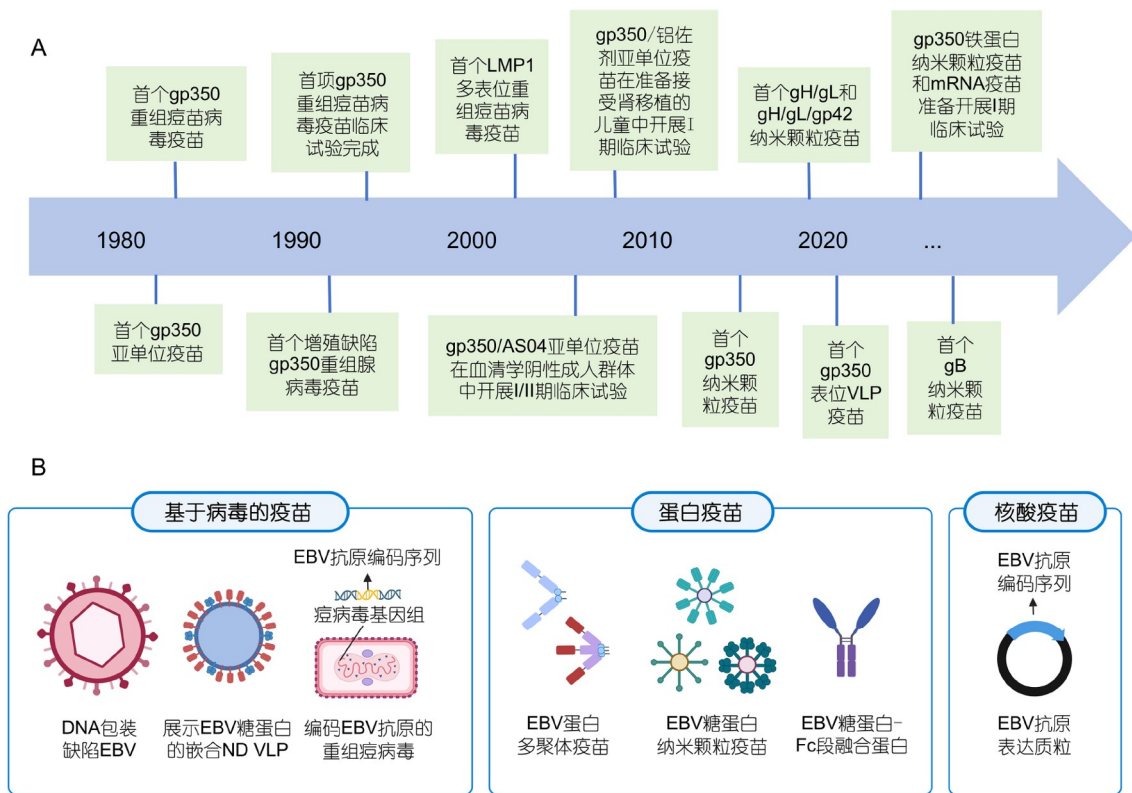


图 2 EB病毒疫苗研发标志性事件和目前常用的EBV疫苗研发平台。A: EB病毒疫苗研发的标志性事件; B: 目前几种常用的疫苗研发平台, 包括基于病毒、蛋白和核酸的疫苗

Figure 2 The landmarks of EBV vaccine research and current EBV vaccine platforms. A: The landmark events of the development of the EB virus vaccine; B: several commonly used vaccine development platforms, including vaccines based on viruses, proteins, and nucleic acids

表 1 EB病毒疫苗临床试验
Table 1 Clinical trials of EBV vaccine

临床试验 ID	机构	研究开始/结束日期	Phase	疫苗平台/佐剂	疫苗抗原	接种对象	研究阶段
NCT05683834	NIAID	2023/9/22	I	gp350 纳米颗粒疫苗/Matrix-M1	gp350	18~22岁EBV血清阴性健康人群	招募
NCT04645147	NIAID	2022/3/29	I	gp350 纳米颗粒疫苗/Matrix-M1	gp350	18~29岁健康人群, 无论EBV感染状态	招募
NCT05164094	Moderna	2021/12/28	I	mRNA 疫苗	gH, gL, gp42, gp220	12~30岁健康人群	进行中, 未招募
NCT05831111	Moderna	2023/5/5	I	mRNA 疫苗	尚未公开	18~55岁健康人群	招募
NCT01094405	香港中文大学	2020/8/27	II	重组改良型安卡拉痘苗病毒疫苗	EBNA1/LMP2	复发或转移鼻咽癌患者	已完成
NCT05714748	四川大学华西医院	2022/11/18	I	mRNA 疫苗	EBV oncoproteins	EBV阳性晚期恶性肿瘤患者	招募
NCT00278200	约翰霍普金斯大学的悉尼·金梅尔综合癌症中心	2012/8	I	灭活病毒疫苗	—	移植后淋巴增生性疾病(PTLD)高危患者	终止
NCT02115126	David Rizzieri, MD	—	II	DC疫苗	LMP2A	自体干细胞移植中输注成熟T细胞的EBV+淋巴瘤患者	撤回知情
NCT01800071	英国癌症中心	2017/3/10	I	重组改良型安卡拉痘苗病毒疫苗	EBNA1/LMP2	EBV阳性淋巴瘤患者	已完成

染过程中发挥关键作用, 近年来人们越来越关注gH/gL复合物作为新候选疫苗的可能性. 2016 年, 一项兔试验表明, 三聚体或单体gH/gL诱导产生的EB病毒中和抗体滴度远高于单体gp350^[29]. 2018年, Snijder等人^[30]发现的抗gH/gL双热带中和抗体AMMO1进一步表明, gH/gL可能是理想的疫苗抗原. 2019年, BALB/c小鼠和猴实验显示, gH/gL或gH/gL/gp42的纳米颗粒疫苗可以引起比单体gH/gL或gH/gL/gp42更高的中和抗体滴度, 抑制B细胞和上皮细胞的感染^[31]. 近期, 科学家们进一步在gH/gL或gH/gL/gp42基础上添加gp350D₁₂₃-NP, 形成新型二价纳米颗粒疫苗, 在有效诱导gp350定向抗体产生的同时, 不削弱gH/gL或gH/gL/gp42诱导的免疫反应, 从而提高对不同细胞类型病毒的覆盖率^[32]. 此外, 最近Cohen团队^[33]利用X射线晶体学和电子显微镜进行结构分析, 确定了EB病毒gH/gL的抗原结构, 并揭示了多个敏感位点, 发现了针对5个不同位点的6种人单克隆抗体; 由中国学者鉴定出的新型中和抗体1D8能够与病毒gH/gL蛋白的D-I/D-II结构域结合, 干扰gH/gL介导的膜融合和病毒结合^[34]; 夏宁邵团队^[35]鉴定了gH/gL/gp42复合物的3个非重叠位点, 并发现靶向这3个位点的三联中和抗体能够有效抑制EB病毒感染. gH/gL特异性中和抗体的鉴定工作为下

一阶段候选疫苗的开发奠定了良好基础. 然而, 目前尚无针对gH/gL疫苗的临床试验开展. 还需进一步评价其有效性及安全性, 在人体中评估gH/gL疫苗是否实现对EB病毒感染的完全保护.

gp42的C型凝集素结构域(C-type lectin domain, CTLD)在受体结合中起着关键作用, 是中和抗体的主要靶点. 近期分离出的两种gp42中和抗体靶向CTLD, 能够有效抑制EB病毒对B细胞的感染^[36]. 然而, 目前很少有研究将gp42单独作为疫苗设计的靶点. 可能的解释是gH/gL/gp42间具有密切的结构连接和功能关联, 作为复合抗原可能比单一的gp42更为有效. 此外, 研究发现gp42在促进B细胞感染的同时会抑制上皮细胞感染, 从而调控EB病毒感染向性^[37,38], 这使得gp42中和抗体的保护作用变得不确切, 可能会加重EB病毒对上皮细胞的感染.

1.1.3 gB

gB是疱疹病毒共有的一种融合蛋白. 作为一种单通道跨膜三聚体蛋白, gB有5个胞外结构域, 均参与膜融合的构象改变^[39-42]. 目前已发现多种抗体靶向gB胞外结构域的不同位点^[43,44]. 在介导病毒包膜与宿主细胞膜融合时, gB最初以融合前构象(prefusion gB)折叠,

在酸性pH条件下,通过与受体结合,发生构象变化,将疏水残基插入宿主膜;然后,gB自身发生折叠,使病毒包膜与宿主细胞膜靠拢,并发生膜融合^[45](图1B)。

融合蛋白在病毒入侵宿主细胞时发挥关键作用,其功能域是抗体中和的理想靶点,意味着它很可能是一种理想的疫苗候选抗原。事实上,在其他多种病毒中,很多预防性疫苗靶向病毒融合蛋白设计产生,如冠状病毒S蛋白^[46,47]、流感病毒HA蛋白^[48~50]、HIV env蛋白^[51,52]以及埃博拉病毒GP蛋白^[53,54]。2018年,Snijder等人^[30]发现了针对EB病毒gB的中和抗体AMMO2/3/4/5,它们对上皮细胞的感染过程具有很强的中和活性,为gB作为预防性疫苗候选抗原提供了有力证据。2022年,两种gB特异性中和抗体3A3和3A5被发现同时具有显著的B细胞和上皮细胞中和活性。通过冷冻电子显微镜发现,这两种抗体分别识别gB的D-II和D-IV表位,这两种表位在B细胞的膜融合中通过不同机制发挥关键作用^[55]。过去的研究提示,直接使用可溶性gB蛋白产生的中和抗体滴度较低。近期,曾木圣团队^[56]设计的gB-I53-50纳米颗粒疫苗有效解决了传统抗原有效性不足的难题,能够诱导强烈、长效的中和抗体反应,展现了良好的疫苗成药性和免疫效力。

融合前状态通常指与宿主细胞相互作用前的病毒包膜自然构象^[57]。近年来,随着蛋白质结构解析技术的发展,通过人工修饰冻结融合蛋白的方式对病毒融合前状态进行解析^[58~60],大大推进了病毒疫苗的研发工作。新型冠状病毒感染(coronavirus disease 2019, COVID-19)大流行期间,以融合前稳定性刺突蛋白变体S-2P为抗原设计的疫苗得到广泛使用^[61,62]。同样,融合前稳定性HIV env BG505-SOSIP蛋白^[51]和RSV F DS-CAV1蛋白^[58,60]也为疫苗开发工作注入动力,它们能够比融合后构象诱导产生更高的中和抗体滴度。因此,对于EB病毒gB的融合前构象的解析工作也引起了广泛关注。目前,已基于水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV) G蛋白的融合前构象^[63],建立起EB病毒的融合前gB的计算同源模型^[64];并使用低温电子断层扫描技术(cryo-electron tomography, cryo-ET)对疱疹病毒gB的可变结构进行研究^[65,66]。最近, β 疱疹病毒中的HCMV的融合前稳定gB(gB-C7)可溶性蛋白已被成功表达并解析,研究表明,通过建立单体间二硫键链接及疏水性氨基酸突变的方式,能够有效稳定HCMV gB的DI结构域,在冷冻电子显微镜下呈现融合前构

象。然而,gB-C7并未表现出比融合后gB更强的免疫原性,诱导中和抗体的水平较弱^[67]。因此,如何通过结构预测和冷冻电子显微镜下指导设计出具有较高免疫原性和疫苗抗原潜力的疱疹病毒prefusion gB仍有待探索。疱疹病毒prefusion gB诱导中和抗体的种类与机制也有待挖掘。仍需要更多的证据来确定EB病毒中gB的融合前结构,以及鉴定靶向EBV融合前gB的特异性中和抗体,从而推进EBV疫苗的发展。

1.2 潜伏期和裂解期蛋白

EB病毒初次感染时,病毒会脱落进入口咽,该过程由裂解开关蛋白BZLF1的表达驱动,而BZLF1会引发包括gp85, BMLF1, BMRF1, BHRF1和gp350蛋白在内的一系列裂解级联反应^[3,66]。此外,病毒驱动感染B细胞的扩散而在淋巴系统中定植。被EB病毒感染的B细胞可选择性地表达6种EB病毒潜伏期蛋白,分别为EB病毒核蛋白(EBV nuclear antigens, EBNA)s1, 2, 3, 4, 6和潜伏期膜蛋白(latent membrane protein, LMP)^[1]。因此,在EB病毒感染过程中,一些特定的潜伏期和裂解期基因表达,引发B细胞转化和病毒潜伏感染。

靶向糖蛋白的中和抗体无法清除不表达糖蛋白的EB病毒潜伏感染细胞,而此时T细胞介导的细胞免疫发挥重要作用(图1B和C)。随着对T细胞在EBV感染中作用的不断了解,及EB病毒抗原的T细胞表位相关研究的不断深入^[68~73],潜伏期与裂解期蛋白逐渐成为下一阶段EB病毒疫苗研究的主题,尤其被广泛用于EB病毒治疗性疫苗的设计。Elliott等人^[74]曾以破伤风类毒素和Montanide ISA 720为佐剂,使用EBNA3 HLA-B8 T细胞表位FLRGRAYGL制成疫苗,并在EB病毒血清学阴性的成人中开展I期临床试验。尽管疫苗具有良好的耐受性,并成功降低了IM的发生率,但并未保护接种者免受EB病毒感染。近期,Dasari等人^[75]研发的多表位亚单位疫苗,将来自EB病毒潜伏期与裂解期抗原的20种CD8⁺ T细胞表位制成EB病毒多表位蛋白与糖蛋白gp350相结合,以靶向淋巴结的两亲性分子Amphiphile-CpG为佐剂,能够引起有效且持久的体液免疫和细胞免疫,有效防止EB病毒初次感染并控制B细胞的潜伏感染,说明潜伏或裂解期蛋白与糖蛋白的组合可能是疫苗候选抗原的一种理想选择。因此,EB病毒疫苗中添加潜伏或裂解期蛋白成分可增强细胞免疫,控制潜伏期感染,但在预防初次感染方面仍需由主

要的几个糖蛋白来发挥关键作用。

综上所述, 在EB病毒疫苗的开发过程中, 为确保机体能够产生对抗EB病毒感染的显著、有效、全面的免疫反应, 必须进行合理且谨慎的抗原种类选择. 单个糖蛋白的免疫效力研究方面仍有很大的探索空间. 此外, 仍需进一步探索多种抗原联用的方式能否诱导机体同时产生足够的体液免疫及细胞免疫反应, 从而形成理想的候选疫苗。

2 疫苗研发平台和佐剂

2.1 疫苗研发平台

新型冠状病毒感染的暴发为全球疫苗的研发带来了巨大挑战, 同时也促进了一系列疫苗创新设计的出现. Moderna和BioNTech^[76-80]研发的获批临床使用的mRNA疫苗在抗击新冠疫情方面做出了巨大贡献, 充分彰显了在疫情席卷全球的情况下mRNA疫苗快速研发和应用的优势, 也为其他病原体的疫苗研发提供了新的思路. 然而, 传统的疫苗研发平台, 如灭活或减毒疫苗仍然占据了目前获批临床使用疫苗的大部分, 其高稳定性、免疫原性和分发便利性在预防和治疗疾病中发挥着巨大的优势. 因此, 选择合适的疫苗平台对于EB病毒疫苗的研发也十分重要(图2B)。

2.1.1 以病毒为基础的疫苗

(1) 灭活、减毒疫苗. EB病毒在体内具有复杂的生命周期, 主要表现为潜伏感染, 因此若想在实验室条件下大规模诱导病毒复制和宿主细胞裂解获得足够用于灭活或减毒疫苗制备的EB病毒颗粒需要非常复杂的程序, 这使得基于真病毒的灭活和减毒EB病毒疫苗的研发具有挑战性. 因此, 关于EB病毒的灭活或减毒疫苗研究很少。

(2) 病毒样颗粒疫苗. 病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)是指病毒衣壳蛋白、核心蛋白或包膜蛋白通过自组装形成的颗粒物质, 或由来源于多层病毒的单层颗粒组装而成. 此外, 由非病毒或人工合成蛋白形成的对称颗粒也称为VLPs^[81]. 由于病毒样颗粒具有与真实病毒颗粒相似的结构和形态, 保留了一定的免疫原性, 但不包含其致病基因或遗传物质, 失去了病毒复制和感染致病的能力, 因此, VLPs在体内能够很好地模拟诱发宿主免疫系统对病毒的反应, 从而提高

疫苗的有效性. 在疫苗研发历程中, 病毒样颗粒疫苗在多种预防性疫苗的研究中均充当了重要的角色^[81], 针对HBV, HPV, HEV的3款VLP疫苗陆续获批上市, 充分显示了VLP疫苗在预防性疫苗研发中具有的强大优势和潜力, 也为EB病毒样颗粒(EB-VLP)疫苗的研发提供了思路。

直接对EB病毒基因组进行修饰, 从而产生缺乏某些致病基因或病毒包装基因的缺陷型病毒是构建病毒样颗粒的一个途径. 主要方法是通过基因重组的方式构建相应基因缺陷的缺陷型病毒生产细胞系, 再通过诱导细胞进入裂解期生产大量基因缺陷的病毒样颗粒, 收集上清纯化得到相应的VLPs. Reguraman等人^[82]利用HEK293-Ⅶ包装细胞系^[83]产生的EB-VLP免疫兔发现, 该VLP能够诱导产生免疫反应、降低病毒载量, 但不能预防EB病毒感染, 考虑可能和VLP与EBV注射间期短、未使用佐剂、VLP注射方式等因素有关. 其他研究通过去除*BFLF1/BFRF1*, *BBRF1*, *BFLF2*, 末端重复序列等基因构建EBV突变体并产生相应的病毒样颗粒^[83-87]. 虽然通过直接对EB病毒基因组进行修饰的方式能够减弱或消除病毒的致病性, 较大程度地保留病毒颗粒的免疫原性, 激发强烈的免疫反应, 但仍然存在病毒重包装的可能, 确保修饰后的病毒仍然是安全的对于疫苗开发至关重要。

除了直接对EB病毒基因组进行修饰, 新城疫病毒样颗粒(Newcastle disease virus-like particles, ND VLP)也被用于EB病毒疫苗的研究. 该方法是将抗原与新城疫病毒融合蛋白(F)或基质蛋白(M)等结构蛋白融合使目的抗原表达于病毒样颗粒外壳实现抗原的展示. Ogembo等人^[88,89]基于ND VLP构建了EBV gp350/220 VLP, gHgL-EBNA1和gB-LMP2 VLP. 同课题组于2020年用类似的方法构建了五价EB-VLP, 该病毒样颗粒同时展示了gp350, gB, gp42, gH, gL五种病毒抗原, 通过动物免疫实验证实了与可溶性gp350免疫相比, 该五价VLP能够诱导产生具有更强中和能力的抗体^[90], 但该实验没有继续探究该中和能力是否与5种抗原均相关以及能否在体内实验中表现出同样的中和能力. 乙型肝炎病毒核心抗原颗粒(HBc149)也被用于制备嵌合型病毒样颗粒. Zhang等人^[91]利用HBc149成功展示了gp350受体结合区域的3种抗原表位, 并发现相比于gp350D₁₂₃, 149-3A(P1P2P3)和149-3B(P1P3P2)两种VLPs诱导产生了更高滴度和更强中和能力的抗体。

(3) 病毒载体疫苗. 另一种用于制备病毒疫苗的方法是选择合适的病毒作为载体负载抗原, 即通过消除编码毒力或复制因子的基因制备适合疫苗制备的病毒载体, 向病毒基因组插入编码特定抗原的基因序列后, 利用病毒的天然感染力直接感染宿主细胞, 借助宿主细胞的酶系统合成抗原, 继而通过对抗原的处理和呈递, 激发或增强机体的体液和细胞免疫反应^[92]. 此外, 病毒载体还可以表达多种不同的病原体相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMPs)激活天然免疫, 发挥其内在的佐剂特性, 从而增强所诱导的免疫反应^[93]. 由于病毒载体疫苗更倾向于激活细胞免疫, 更多的研究将其用于研发治疗性疫苗. 改良安卡拉痘病毒(modified vaccinia virus Ankara, MVA)^[94-96]、腺病毒(adenovirus, ADV)^[97-100]、水痘-带状疱疹病毒(varicella-zoster virus, VZV)^[101]、烟草花叶病毒(the tobacco mosaic virus, TMV)^[102]已被用于EB病毒治疗性疫苗的相关研究中. ZEBOV-GP^[103]作为一款以VSV为载体的埃博拉预防性疫苗成为首个于美国获批的VSV疫苗, 为VSV疫苗的安全性和有效性提供了有力的证据, 推动了VSV在其他病原体预防性疫苗研究中的应用. Kong等人^[104]成功将VSV用于EB病毒gB (VSV-ΔG-gB/Gb-G)和gHgL (VSV-ΔG-gHgL)的展示, 研究发现该疫苗能够诱导产生特异性体液免疫反应, 并通过中和实验发现VSV-ΔG-gB/gB-G更倾向于中和B细胞的感染, 而VSV-ΔG-gHgL更倾向于抑制上皮细胞的感染. 基于此差异, 研究者进一步探究二者的联合免疫诱导产生抗体的中和能力, 发现联合免疫促进了抗体对B细胞感染的中和能力, 而上皮细胞感染的中和效应无明显差异. 该研究首次将VSV载体应用于EB病毒预防性疫苗的基础研究, 并验证了该疫苗在动物体内的安全性和有效性, 为EB病毒疫苗的研究和开发提供了新的思路.

2.1.2 蛋白疫苗

在EB病毒疫苗探索的早期阶段, 可溶性蛋白是疫苗抗原的主要选择, 但直接以可溶性蛋白作为疫苗抗原往往不能获得理想的免疫效果, 因此研究者们后续探究了多种方法以期提高抗原的免疫原性、促进疫苗的免疫效果.

多聚体蛋白相比于单体蛋白具有更多的抗原表位, 更能模拟病原体表面的天然结构等优点, 被应用于

多项EB病毒疫苗研究中. Cui等人利用亮氨酸拉链结构域(Leucine zipper)设计了EBV gp350¹⁻⁴⁷⁰四聚体蛋白^[105], 后采用类似的方式分别设计了EBV gHgL和gB三聚体蛋白^[29], 均发现与蛋白单体相比, 多聚体蛋白能够诱导产生更高滴度的中和抗体. 近期该研究团队再次报道联合免疫EBV gH/gL和三聚体gB相比单独免疫能够诱导产生中和能力更强的B细胞和上皮细胞特异性抗体, 并通过人源化小鼠模型发现, 多聚体蛋白免疫血清能够降低小鼠高剂量EB病毒感染死亡率^[106]. 这一系列结果充分显示了多聚体蛋白能够显著提升抗原的免疫原性, 提升抗原的免疫效果, 诱导产生更强的免疫反应.

纳米颗粒平台能够增强抗原识别或作为免疫刺激剂增强免疫反应, 已被广泛用于疫苗的研发. 上文提到的曾木圣团队^[23]分别利用二氧四氢嘧啶合酶(lumazine synthase, LS)和I3-01自组装形成纳米颗粒疫苗成功展示EB病毒gp350糖蛋白, 通过小鼠和食蟹猴免疫实验发现与可溶性gp350D₁₂₃相比, gp350D₁₂₃-LS/I3-01-NP两种纳米颗粒疫苗均能诱导产生更高滴度的中和性抗体, 并表现出更强的B细胞和上皮细胞感染中和能力. 该团队在后续的研究中通过计算机辅助对接计算了gB纳米颗粒gB-I53-50 NP, 实现了EB病毒gB糖蛋白的展示, 通过小鼠和食蟹猴免疫实验发现, 该gB纳米颗粒在保持良好免疫安全性的前提下, 相比于传统的可溶性gB蛋白能够诱导更高滴度的中和性抗体, 对B细胞和上皮细胞的感染起到更强的抑制作用. 团队进一步通过人源化小鼠攻毒试验发现, 该纳米颗粒在食蟹猴体内诱导产生的血清多克隆抗体能够保护小鼠免受EB病毒感染和淋巴瘤的发生^[56]. 此外, gHgL, gHgL-gp42^[31,32,107], gp350^[28], EBNA1^[108]等蛋白也通过纳米颗粒进行展示, 表现出更优的免疫效果, 提示纳米颗粒作为疫苗平台能够更进一步提升免疫原性, 促进疫苗的免疫效果. 近期NIH研发的两款EB病毒gp350纳米颗粒疫苗已进入临床试验(表1), 充分提示了纳米颗粒疫苗在EB病毒疫苗研发中具有较大的潜力.

Fc融合蛋白^[109-112]也用于EB病毒的疫苗研究, 该种蛋白不仅可以增强蛋白的稳定性, 还可以与抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)表面的Fc受体结合, 增强抗原的靶向性, 延长抗原的半衰期, 从而增强抗原的呈递, 促进免疫反应.

除了使用全长蛋白或蛋白亚单位作为抗原用于疫

苗的研究, 特定的抗原表位也被用于诱导更加特异性的免疫反应^[75,91]. Larijani等人^[113]在计算机辅助下利用来自两种不同EB病毒株的三种类型蛋白设计了一种多表位疫苗, 并证明该多表位疫苗具有较好的稳定性和免疫原性. 这也显示了计算机和人工智能的快速发展促进了基于结构的蛋白设计和疫苗抗原选择, 能够帮助研究者进一步优化蛋白质的性质, 对疫苗研发具有重要意义.

2.1.3 核酸疫苗

COVID-19 mRNA疫苗的成功研发和使用, 为包括mRNA和DNA疫苗在内的核酸疫苗平台提供了动力, 充分显示了核酸疫苗在疫苗研发中的巨大潜力, 也激发了研究者们对EB病毒核酸疫苗的研究热情. Wojtak等人^[114]基于3种EB病毒潜伏基因(*EBNA1*, *LMP1*, *LMP2A*)设计了3种DNA疫苗, 并发现基于EBNA1和LMP2A的DNA疫苗能够诱导产生T细胞免疫反应. Zhao等人^[115]成功设计了一种以mRNA为基础的EB病毒治疗性疫苗, 该种疫苗以编码富含T细胞表位的LMP2A, EBNA1, EBNA3A截短蛋白的mRNA为基础, 通过纳米脂质体将mRNA特异性地靶向脾脏, 实现截短蛋白在体内的表达, 引发免疫反应. 通过动物实验发现, 该种疫苗相比于全长蛋白能够更加有效地激活免疫小鼠的体液和细胞免疫反应, 发挥更强的肿瘤生长抑制作用, 延长荷瘤小鼠的生存时间. 另两项研究同样设计了编码LMP2A的mRNA疫苗, 结果也显示该种疫苗具有更强的肿瘤生长抑制作用^[116,117]. 近期EB病毒mRNA疫苗的临床试验也有了新进展(表1). Moderna公司生产的一款mRNA疫苗mRNA-1189已经进入I期临床试验(NCT05164094), 第一名患者于2022年初开始给药. 另一款mRNA疫苗mRNA-1195(NCT05831111)也于2023年开始招募患者.

2.2 佐剂

对于传统的疫苗, 如减毒和灭活病毒疫苗、病毒载体疫苗, 疫苗中的某些组分能够表达多种PAMPs活化模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs), 从而激活固有免疫系统, 发挥内源性佐剂的效应^[118]. 但对于蛋白疫苗、病毒样颗粒疫苗、核酸疫苗等新型疫苗来说, 抗原在制备的过程中可能出现生物活性降低、免疫原性减弱, 从而难以诱导机体产生足够的免

疫反应, 因此需要在疫苗中添加佐剂来增强机体对抗原免疫反应的强度、广度和持久性.

从1926年首次发现铝佐剂能够增强抗原的免疫效果^[119], 到现在多种佐剂被批准用于人类疫苗^[120], 佐剂的发展已有98年的历史. 在EB病毒疫苗发展过程中, 以gp350为基础的疫苗研发激发了研究者对EB病毒疫苗佐剂探索. 20世纪末, 弗式佐剂、脂质A、免疫刺激复合物(ISCOMS)^[24,121]等均被用于gp350疫苗的构建. 近年来随着用于疫苗制备的抗原类型逐渐丰富和多种佐剂陆续被发现, 佐剂在EB病毒疫苗中的应用也随之多样化. 近期, Wu等人^[122]发现, Sigma佐剂系统(SAS)能够促进展示EBV gB蛋白的昆虫源性胞外囊泡(gB EVs)在小鼠体内诱导产生更高滴度的效应T细胞, 提示SAS作为佐剂能够促进疫苗诱导产生更高水平的细胞免疫反应. 弗式佐剂^[123]、氢氧化铝^[90,91,106]、MF59^[23,56]、AF03^[32]、AMP-CpG^[75]等均表现出促进疫苗疗效的作用. 但需要注意的是, 佐剂在增强机体对抗原免疫反应的同时, 也可能导致机体出现一些不良反应^[124], 如过敏反应、神经毒性作用等. 因此, 在保证质量和安全性的前提下, 合理选用佐剂能够帮助诱导出更强的免疫效果.

无论是传统的疫苗技术如灭活病毒疫苗, 还是新型疫苗平台如mRNA疫苗, 均在刚过去的COVID-19大流行中凸显出了其独有的优势, 这也激发了科学界对其他病原体疫苗研发的热情. 对于EB病毒疫苗研发来说, 大规模获得足够用于疫苗制备的EB病毒颗粒可能是灭活或减毒疫苗研发取得进展的突破点. 对于蛋白质或核酸为基础的新型疫苗平台, 抗原的合理选择和恰当的修饰以增强其免疫原性, 促进疫苗的免疫效果是未来疫苗研发的主要方向. 佐剂在增强疫苗疗效方面起到了很大的作用, 选择合适的佐剂辅助抗原诱导机体产生更强的免疫反应也为疫苗的开发提供了更多选择.

3 疫苗评价系统

3.1 动物模型

21世纪以后, 人类的生物医学研究主要受限于生物体的复杂性, 故临床前利用模式动物对疫苗、药物的研究评价显得尤为重要. 动物模型是疫苗研发的重要工具, 可以模拟EBV在人体中的感染过程和免疫应

答, 为疫苗的安全性和有效性提供预测和验证(表2)。在探索病原体感染致病机制和疫苗研发过程中, 动物的攻毒试验一直被视为疫苗评价的金标准, 其结果是非临床有效性的直接证据^[125~129]。目前主要有两类动物模型用于EB病毒疫苗研究, 即以小鼠为代表的非灵长类动物模型和以猕猴为代表的灵长类动物模型(图3)。

3.1.1 非灵长类动物

小鼠是疫苗评价中最常用的动物模型。通过开展小鼠免疫试验, 可以测定体液免疫和细胞免疫的各项指标, 如中和抗体滴度、T细胞分化情况、细胞因子种类等, 评估疫苗的免疫效力; 测定肿瘤瘤体大小, 评价疫苗对EBV相关肿瘤的预防效果; 进行长期毒性试验, 评估疫苗的安全性等。由于种属的限制, EBV无法直接感染小鼠, 但人源化小鼠技术很好解决了这一问题。人源化小鼠是指将人类的功能性组织、细胞或器官移植给重度联合免疫缺陷(server combined immunodeficiency, SCID)小鼠, 实现人类免疫系统重建^[130,131]。在EBV攻毒试验中, 最常用的是人造血干细胞(hemopoietic stem cell, HSC)移植SCID小鼠(Hu-

SRC/HSC), 即将人HSC (CD34⁺)通过腹腔或尾静脉注射给免疫缺陷小鼠, 对其进行免疫重建^[132]。在Hu-SRC小鼠体内, 可使用EBV感染人源性B细胞, 但无法使用预防性疫苗引起适应性免疫应答, 因为免疫重建后的小鼠并未建立起完整的免疫系统, 且缺乏EBV感染中关键的人源性上皮细胞。因此, 人源化小鼠通常只用于初步评估疫苗或中和抗体对EBV直接攻毒时的保护效应, 无法进一步评估疫苗对于EBV感染的预防作用。

除小鼠外, 兔子也常被用作疫苗研究的动物模型^[133]。作为广泛使用的实验动物, 兔子与小鼠一样具有容易获得、易于繁殖饲养等优点。在进行静脉、鼻腔或口腔接种后, 大部分兔子的血液中可检测到EBV VCA抗体和EBV DNA等标志物, 但仅部分兔子的脾脏中能检测到EBER, LMP1或EBNA, 而这些标志物对EB病毒的致癌作用至关重要。由于宿主种属的限制, 极少数的兔子在接种后能够维持EBV感染阳性。EB病毒感染状态的不确定性阻碍了兔子作为攻毒试验动物模型的使用。因此, 大部分研究仅将兔子作为评估体液免疫反应的模型^[16,21,22,29,36,90,134]。

最近, 研究发现中国树鼩(*Tupaia belangeri* subsp. *Chinensis*)可能可以作为EB病毒感染和疫苗评估的动

						
非灵长类	小鼠	兔	树鼩	灵长类	猕猴	绒猴
EBV易感性	无	低, 感染后可在脾脏中检测到EBV标志物	低, 能够感染B细胞, 可在血液和组织中检测到EBV标志物	EBV易感性	中等, 可感染但无法转化B细胞	高, EBV可引发B细胞淋巴瘤
人源化模型	免疫重建后EBV可感染人源性B细胞	无	无	EBV同源病毒	恒河猴淋巴隐病毒(rhLCV)	绒猴淋巴隐病毒(maLCV)
模型可得性	易得	易得	一般	模型可得性	一般	难获得, 濒危物种
攻毒试验可行性	EBV可行	不可行	不可行	攻毒试验可行性	仅rhLCV可行	EBV可行

图3 EB病毒疫苗评价的动物模型
Figure 3 Animal models for evaluating EBV vaccines

表 2 EB病毒疫苗动物实验

Table 2 Animal research of EBV vaccine

研究时间	疫苗平台/佐剂	疫苗抗原	动物模型	结果
2023	病毒样颗粒	—	人源化小鼠	与非免疫对照组相比, 免疫组小鼠诱导产生更高滴度的IgG抗体; 分离免疫小鼠的脾脏细胞制备永生化细胞系, 永生化B细胞产生与6GA水平相当的特异性IgG抗体, 中和活性达到70%
2024	rBCG载体疫苗	BZLF1/IL-2	C57BL/6J小鼠	促进CD4 ⁺ 和CD8 ⁺ T细胞分泌IFN- γ 和TNF- α ; 相比于对照组, IL-2-BZLF1-rBCG免疫显著降低肿瘤体积和重量
2023	病毒样颗粒疫苗/弗式佐剂	gHgL/gp42	兔/NOD-Prkdcnull IL2Rgnull mice (NPI)小鼠	免疫后筛选出了3个中性和抗体; 抗体可以为NPI小鼠提供预防EBV感染的保护力
2023	蛋白疫苗/rBCG	LMP2A, hGM-CSF	C57BL/6J小鼠	诱导产生更高的抗体滴度, 诱导产生细胞免疫, 更强的肿瘤生长抑制作用
2023	mRNA疫苗	LMP2A, EBNA1, EBNA3A 截短蛋白	C57BL/6小鼠、BALB/c小鼠	截短蛋白相比于相应的全长蛋白诱导产生更强水平的细胞免疫, 为荷瘤小鼠提供更强的免疫保护作用
2023	纳米颗粒疫苗/MF59	gB	BALB/c小鼠、食蟹猴、NOD.Cg-Prkdcem1IDMOII2r-gem2IDMO	相比于可溶性gB蛋白诱导产生更高滴度的中性和抗体, 对B细胞和上皮细胞的抑制作用更强, 食蟹猴免疫诱导血清多克隆抗体能够保护小鼠免受EB病毒感染和淋巴瘤的发生
2023.9	mRNA疫苗	LMP2	BALB/c小鼠	C2@mLMP2具有一定的抗肿瘤效果, 且通过逆转CD8 ⁺ T细胞耗竭促进PD-1抑制剂的抗肿瘤疗效
2023.8	亚单位疫苗/AMP-CpG	gp350、包含8种裂解和潜伏期抗原的20个CD8 ⁺ T细胞表位的多聚体蛋白	C57BL/6小鼠、NRG小鼠	相比于可溶性AMP, 优化的AMP-CpG佐剂辅助诱导产生更强的细胞免疫和更高滴度的中和抗体
2023.7	病毒载体疫苗/AddaVax	LMP1 surface loop epitopes	C3H/Hen小鼠	诱导产生高滴度抗体, 有效保护小鼠38C13-LMP1肿瘤细胞攻击
2023	mRNA疫苗	全长LMP2	C57BL/6小鼠	刺激产生细胞免疫, 显著抑制肿瘤的生长
2022.7	纳米颗粒疫苗/脂质A	ghgl	C57BL/6小鼠、NSG小鼠	相较于单体gHgL, 多聚体gHgL NP疫苗在首次和二次免疫中均诱导产生更高滴度的中和抗体, gHgL 60-mer NP免疫小鼠的血浆IgG能够保护人源化小鼠的EBV感染
2022.5	纳米颗粒疫苗/AF03	单链gHgL/gHgL-gp42-ferritin, gp350D123	BALB/c小鼠、雪貂、恒河猴	双价疫苗gHgL/gHgL-gp42-NP+gp350D123在小鼠、雪貂、恒河猴体内均诱导产生中性和抗体, 双价疫苗免疫小鼠血浆保护人源化小鼠免受EB病毒感染和淋巴瘤的发生
2022.5	病毒载体疫苗/铝佐剂	gB, gHgL	BALB/c小鼠、C57小鼠	诱导产生体液免疫反应, VSV- Δ G-gB/Gb-G更倾向于中和B细胞的感染, VSV- Δ G-gHgL更倾向于抑制上皮细胞的感染; 二者联合免疫促进了抗体对B细胞感染的中和能力, 而上皮细胞感染的中和效应无明显差异
2021.5	树突状细胞疫苗	BZLF1	Hu-PBL-SCID小鼠	诱导BZLF1特异性免疫, 保护小鼠EBV-LPD存活
2021.3	纳米颗粒疫苗/MF59、铝佐剂	gp350-LS/gp350-I3-01	BALB/c小鼠、食蟹猴	与可溶性gp350D123相比, gp350D123-LS/I3-01-NP两种纳米颗粒疫苗均能诱导产生更高滴度的中性和抗体, 并表现出更强的B细胞和上皮细胞感染中和能力
2021	纳米颗粒疫苗/CpG或IFN- α	EBNA1 Δ GA92-327-TA	C57BL/6小鼠	相比于IFN- α 为佐剂, CpG为佐剂的疫苗诱导产生更高水平的体液和细胞免疫, 抑制肿瘤生长的作用更强, 与PD-1抑制剂联合发挥协同抗肿瘤作用

物模型^[135-137]。树鼩与灵长类动物有着密切的系统发育学关系^[138], 在人类疾病(尤其是病毒感染类疾病)研究中具有独特优势^[139]。近期研究发现, 树鼩的CR2中与gp350结合的关键残基序列与人类的相似性达100%, 且感染EBV后的一系列表现与人类相似。EB病毒能够感染树鼩B淋巴细胞并在其中复制, 并在急性期引起短暂发热、中性粒细胞减少和高水平病毒血症等症状; 此后大多数树鼩呈无症状感染, 可以在血液和组织中检测到EBV相关蛋白^[135]。另一项研究证实, 在静脉接种EB病毒早期, 可在树鼩血清中检测到EBV基因表达和相关抗体水平的升高, 小部分动物的脾脏或淋巴结中可检出EBER, LMP和EBNA2阳性细胞, 而肺与鼻咽部的EBV标志物均为阴性, 提示在树鼩动物模型中也存在着上皮细胞感染缺失的问题^[140]。仍需更多的证据来确定树鼩是否可以作为EBV攻毒实验和疫苗评估的新模型。

3.1.2 灵长类动物

非人类灵长类动物(non-human primates, NHP)动物具有与人类高度相似的机体环境, 为病毒与宿主间动态相互作用及疫苗研发提供了宝贵的研究平台^[141-144]。早在1972年, 就有研究曾探索NHP与人类的亲缘关系对EB病毒感染的影响, 及EB病毒自然感染NHP的可能性^[145]。

过去, 以绒顶桧柳猴和普通狢猴(*Callithrix jacchus*)为代表的新世界猴曾被用于评估基于gp350的EB病毒疫苗引起的病毒载量、中和抗体滴度变化及对攻毒试验的保护效果^[15,20,146,147]。然而, 由于数量稀少, 目前绒顶桧柳猴和普通狢猴均被列入IUCN濒危物种名单, 基本无法再用于EB病毒疫苗评估。以恒河猴和食蟹猴为代表的猕猴属动物属于旧世界猴, 由于人工繁育成功、数量较多, 目前被广泛用作动物模型。一种与EB病毒基因序列高度相似的淋巴隐病毒(lymphocryptoviruses, LCV), 恒河猴淋巴隐病毒(rhLCV), 对猕猴具有种属特异性, 能够稳定感染猕猴并使其B细胞永生化^[148]。目前, 自然感染猕猴的rhLCV或其他EB病毒相关疱疹病毒的研究已取得诸多进展, 进一步体现了猕猴在EB病毒研究中的价值^[149]。然而, 猕猴在自然状态下无法被EBV感染^[150], 限制其在EBV攻毒试验中的使用。因此, 大部分研究将猕猴作为体液反应和特异性T细胞反应的评价模型, 且使用rhLCV作为EBV的替

代病毒, 评价EB病毒疫苗的保护作用。

3.2 疫苗效果免疫学评估

在疫苗的临床前研究中, 选择合适的评价指标用于疫苗效果免疫学评估对于疫苗的研发十分重要。绝大多数疫苗在体内主要通过B细胞的增殖分化为浆细胞并产生抗体, 诱导体液免疫发挥免疫效应^[151]。对于预防性疫苗来说, 反应疫苗免疫学效果最主要指标是中和性抗体。目前EBV疫苗临床前研究及临床试验主要以EBV糖蛋白如gp350, gHgL, gp42, gB等为免疫原, 通过诱导机体产生针对EBV糖蛋白的中和抗体, 特异性地阻断糖蛋白与宿主细胞互作, 抑制病毒对宿主细胞的黏附和侵入及病毒的扩散而发挥作用^[152]。一般认为疫苗诱导机体产生的中和性抗体滴度越高, 疫苗对病毒感染的预防性作用越强^[153]。通过测定gB纳米颗粒疫苗免疫小鼠及猴后血清中抗gB的总IgG抗体滴度及血清抗体对B细胞和上皮细胞的中和效力, 研究人员验证了gB作为疫苗靶标的有效性, 并通过分离的猴免疫血清对人源化小鼠EBV感染给予过继保护, 进一步佐证了gB作为免疫原能够诱导机体产生高滴度的中和抗体, 为EBV感染提供有效保护^[156]。除了血清总IgG水平, IgG1, IgG2a及IgG1/IgG2a等指标也被用于评估疫苗免疫后的效果评估, 这些指标主要反映机体产生的免疫方向, 用于评估疫苗主要诱导产生哪种适应性免疫反应。尽管EB病毒中和性抗体能够阻止病毒对宿主细胞的感染, 理论上能够减少后续病毒所致疾病的发生, 但疫苗诱导的EB病毒中和性抗体水平与相关疾病的发生率及风险的相关性仍不十分清楚。Zhu等人^[153]通过测定鼻咽癌患者和健康人群的血清抗体中和活性发现, 二者血浆抗体的中和活性并无明显差别。而另一项队列研究表明, 血浆抗体高B细胞中和能力和高特异性gp350抗体滴度与鼻咽癌的低风险相关^[154]。因此, 关于EB病毒中和性抗体与病毒相关疾病发生的相关性还需要进一步探究。

除了中和性抗体, T细胞反应也是评估疫苗诱导机体免疫反应的重要部分。T细胞能够在淋巴结中辅助B细胞成熟分化和抗体的产生, 此外, T细胞也能够通过分泌INF- γ 和TNF- α 等效应因子消除EB病毒潜伏感染的细胞和肿瘤细胞, 从而抑制EB病毒感染导致的细胞异常分化和相关疾病的发生^[155]。常用于评估疫苗免疫后细胞反应的指标主要包括特异性T细胞比例及

诱导产生细胞因子及效应因子的水平. 前者包括CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、Th1型细胞、Th2型细胞等, 后者包括如IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α 等. 目前评估疫苗诱导机体T细胞反应的研究大多基于EB病毒潜伏期蛋白如LMP^[97,102,156]和EBNA1^[157,158]等, 临床前研究表明, 基于这些蛋白构建的疫苗在治疗EB病毒相关疾病中发挥着重要作用. 但关于EB病毒糖蛋白疫苗诱导的T细胞反应相关研究却很少, 可能与糖蛋白主要诱导产生中和性抗体而潜伏期蛋白主要诱导机体产生细胞免疫有关. 但有研究表明, T细胞反应参与了EB病毒感染所有周期的免疫控制^[159]. 因此进一步探究EB病毒糖蛋白诱导机体产生的T细胞反应在病毒感染和相关疾病的控制方面的作用, 可以进一步完善疫苗疗效评估系统, 促进EB病毒疫苗的研发.

4 总结与展望

随着基础病毒学、疫苗学、合成生物学及材料化学领域的发展, 近年来EB病毒疫苗研究不断取得新的进展.

作为EB病毒疫苗研发的起点, gp350候选疫苗在临床前与临床试验中显示出其不完美的一面, 尤其是在抵御EBV初次感染方面有所欠缺, 但相关研究却促进了EB病毒疫苗的发展. 随着EB病毒糖蛋白分子作用机制的进一步阐明, gH/gL和gB在病毒进入宿主细胞和膜融合过程中发挥的关键作用得到关注, 近年来相关疫苗的研发工作取得重要进展. 潜伏期和裂解期蛋白疫苗虽无法像糖蛋白疫苗一样在EB病毒初次感

染时引起强烈的体液免疫反应, 但能够在病毒潜伏感染期引起特异性T细胞反应, 从而长效、持久地控制EB病毒感染, 广泛用于EB病毒治疗性疫苗的设计. 在选择合适抗原的基础上, 理想的疫苗研发平台通过优化抗原的设计形式及选择合适的佐剂, 来提高特定抗原的免疫原性, 促进抗原识别, 增强免疫效应. 使用病毒样颗粒展示EB病毒糖蛋白, 或采用编码EB病毒抗原的病毒载体, 基于病毒颗粒的疫苗设计增强了机体对抗原的免疫反应. 采用蛋白多聚化、纳米颗粒或融合免疫细胞靶向结构域的方式对抗原蛋白进行修饰, 为蛋白质疫苗的设计提供更多可能性. 核酸疫苗在EB病毒及其他病原体中的应用已得到广泛关注, 相关研究已步入临床试验阶段. 除疫苗设计外, 疫苗的评价体系对于疫苗的成功开发也至关重要. EB病毒攻毒试验一直是疫苗临床前评估的金标准, 传统的以小鼠、兔为代表的非灵长类哺乳动物模型和以猕猴为代表的NHP模型被用于评价疫苗免疫效力和安全性. 关于是否将T细胞反应纳入EB病毒预防性疫苗效力评估的问题仍存在争议, 提示亟待更多的研究来深入探索细胞免疫在预防初次感染和细胞癌变中的作用.

未来, 随着对EB病毒与宿主间相互作用的不断深入, 疫苗设计和评价方法不断拓展, 相关学科技术的不断进步, 更多的疫苗设计靶点将被发掘, 抗原的组合作用也可能将成为新一代候选疫苗的理想选择. 新型疫苗平台, 如纳米颗粒疫苗和mRNA疫苗, 将在EB病毒疫苗研发中得到更加广泛的应用. 此外, 仍需进一步优化现有的动物模型及疫苗评价指标, 从而更好地检验疫苗的保护性.

参考文献

- Young L S, Yap L F, Murray P G. Epstein-Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16: 789–802
- Zhong L Y, Xie C, Zhang L L, et al. Research landmarks on the 60th anniversary of Epstein-Barr virus. *Sci China Life Sci*, 2024, doi: 10.1007/s11427-024-2766-0
- Wong Y, Meehan M T, Burrows S R, et al. Estimating the global burden of Epstein-Barr virus-related cancers. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2022, 148: 31–46
- Münz C. Latency and lytic replication in Epstein-Barr virus-associated oncogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17: 691–700
- Johannsen E, Luftig M, Chase M R, et al. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 16286–16291
- Fingerroth J D, Weis J J, Tedder T F, et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 4510–4514
- Ogembo J G, Kannan L, Ghiran I, et al. Human complement receptor type 1/CD35 is an Epstein-Barr virus receptor. *Cell Rep*, 2013, 3: 371–385
- Sathiyamoorthy K, Hu Y X, Möhl B S, et al. Structural basis for Epstein-Barr virus host cell tropism mediated by gp42 and gHgL entry

- glycoproteins. *Nat Commun*, 2016, 7: 13557
- 9 Xiong D, Du Y, Wang H B, et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mediates Epstein-Barr virus infection of nasopharyngeal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 11036–11041
- 10 Chen J, Sathiyamoorthy K, Zhang X, et al. Ephrin receptor A2 is a functional entry receptor for Epstein-Barr virus. *Nat Microbiol*, 2018, 3: 172–180
- 11 Zhang H, Li Y, Wang H B, et al. Ephrin receptor A2 is an epithelial cell receptor for Epstein-Barr virus entry. *Nat Microbiol*, 2018, 3: 1–8
- 12 Chesnokova L S, Nishimura S L, Hutt-Fletcher L M. Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins $\alpha\beta 6$ or $\alpha\beta 8$. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 20464–20469
- 13 Wang H B, Zhang H, Zhang J P, et al. Neuropilin 1 is an entry factor that promotes EBV infection of nasopharyngeal epithelial cells. *Nat Commun*, 2015, 6: 6240
- 14 Moutschen M, Léonard P, Sokal E M, et al. Phase I/II studies to evaluate safety and immunogenicity of a recombinant gp350 Epstein-Barr virus vaccine in healthy adults. *Vaccine*, 2007, 25: 4697–4705
- 15 Epstein M A, Morgan A J, Finerty S, et al. Protection of cottontop tamarins against Epstein-Barr virus-induced malignant lymphoma by a prototype subunit vaccine. *Nature*, 1985, 318: 287–289
- 16 Mackett M, Arrand J R. Recombinant vaccinia virus induces neutralising antibodies in rabbits against Epstein-Barr virus membrane antigen gp340. *EMBO J*, 1985, 4: 3229–3234
- 17 Epstein M A, Randle B J, Finerty S, et al. Not all potentially neutralizing, vaccine-induced antibodies to Epstein-Barr virus ensure protection of susceptible experimental animals. *Clin Exp Immunol*, 1986, 63: 485–490
- 18 Morgan A J, Mackett M, Finerty S, et al. Recombinant vaccinia virus expressing Epstein-Barr virus glycoprotein gp340 protects cottontop tamarins against EB virus-induced malignant lymphomas. *J Med Virol*, 1988, 25: 189–195
- 19 Ragot T, Finerty S, Watkins P E, et al. Replication-defective recombinant adenovirus expressing the Epstein-Barr virus (EBV) envelope glycoprotein gp340/220 induces protective immunity against EBV-induced lymphomas in the cottontop tamarin. *J Gen Virol*, 1993, 74: 501–507
- 20 Mackett M, Cox C, Pepper S V, et al. Immunisation of common marmosets with vaccinia virus expressing Epstein-Barr virus (EBV) gp340 and challenge with EBV. *J Med Virol*, 1996, 50: 263–271
- 21 Jackman W T, Mann K A, Hoffmann H J, et al. Expression of Epstein-Barr virus gp350 as a single chain glycoprotein for an EBV subunit vaccine. *Vaccine*, 1999, 17: 660–668
- 22 Servat E, Ro B W, Cayatte C, et al. Identification of the critical attribute(s) of EBV gp350 antigen required for elicitation of a neutralizing antibody response *in vivo*. *Vaccine*, 2015, 33: 6771–6777
- 23 Kang Y F, Zhang X, Yu X H, et al. Immunization with a self-assembled nanoparticle vaccine elicits potent neutralizing antibody responses against EBV infection. *Nano Lett*, 2021, 21: 2476–2486
- 24 Morgan A J, Epstein M A, North J R. Comparative immunogenicity studies on epstein-barr virus membrane antigen (MA) gp340 with novel adjuvants in mice, rabbits, and cotton-top tamarins. *J Med Virol*, 1984, 13: 281–292
- 25 Gu S Y, Huang T M, Ruan L, et al. First EBV vaccine trial in humans using recombinant vaccinia virus expressing the major membrane antigen. *Dev Biol Stand*, 1995, 84: 171–177
- 26 Sokal E M, Hoppenbrouwers K, Vandermeulen C, et al. Recombinant gp350 vaccine for infectious mononucleosis: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, immunogenicity, and efficacy of an Epstein-Barr virus vaccine in healthy young adults. *J Infect Dis*, 2007, 196: 1749–1753
- 27 Rees L, Tizard E J, Morgan A J, et al. A phase I trial of Epstein-Barr virus Gp350 vaccine for children with chronic kidney disease awaiting transplantation. *Transplantation*, 2009, 88: 1025–1029
- 28 Kanekiyo M, Bu W, Joyce M G, et al. Rational design of an Epstein-Barr virus vaccine targeting the receptor-binding site. *Cell*, 2015, 162: 1090–1100
- 29 Cui X, Cao Z, Chen Q, et al. Rabbits immunized with Epstein-Barr virus gH/gL or gB recombinant proteins elicit higher serum virus neutralizing activity than gp350. *Vaccine*, 2016, 34: 4050–4055
- 30 Snijder J, Ortego M S, Weidle C, et al. An antibody targeting the fusion machinery neutralizes dual-tropic infection and defines a site of vulnerability on Epstein-Barr virus. *Immunity*, 2018, 48: 799–811.e9
- 31 Bu W, Joyce M G, Nguyen H, et al. Immunization with components of the viral fusion apparatus elicits antibodies that neutralize Epstein-Barr

- virus in B cells and epithelial cells. *Immunity*, 2019, 50: 1305–1316.e6
- 32 Wei C J, Bu W, Nguyen L A, et al. A bivalent Epstein-Barr virus vaccine induces neutralizing antibodies that block infection and confer immunity in humanized mice. *Sci Transl Med*, 2022, 14: eabf3685
 - 33 Chen W H, Kim J H, Bu W, et al. Epstein-Barr virus gH/gL has multiple sites of vulnerability for virus neutralization and fusion inhibition. *Immunity*, 2022, 55: 2135–2148.e6
 - 34 Zhu Q Y, Shan S, Yu J, et al. A potent and protective human neutralizing antibody targeting a novel vulnerable site of Epstein-Barr virus. *Nat Commun*, 2021, 12: 6624
 - 35 Hong J, Zhong L, Liu L, et al. Non-overlapping epitopes on the gHgL-gp42 complex for the rational design of a triple-antibody cocktail against EBV infection. *Cell Rep Med*, 2023, 4: 101296
 - 36 Wu Q, Zhong L, Wei D, et al. Neutralizing antibodies against EBV gp42 show potent *in vivo* protection and define novel epitopes. *Emerg Microbes Infects*, 2023, 12: 2245920
 - 37 Borza C M, Hutt-Fletcher L M. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med*, 2002, 8: 594–599
 - 38 Kirschner A N, Omerović J, Popov B, et al. Soluble Epstein-Barr virus glycoproteins gH, gL, and gp42 form a 1:1:1 stable complex that acts like soluble gp42 in B-cell fusion but not in epithelial cell fusion. *J Virol*, 2006, 80: 9444–9454
 - 39 Reimer J J, Backovic M, Deshpande C G, et al. Analysis of Epstein-Barr virus glycoprotein B functional domains via linker insertion mutagenesis. *J Virol*, 2009, 83: 734–747
 - 40 Lin E, Spear P G. Random linker-insertion mutagenesis to identify functional domains of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 13140–13145
 - 41 Cairns T M, Fontana J, Huang Z Y, et al. Mechanism of neutralization of herpes simplex virus by antibodies directed at the fusion domain of glycoprotein B. *J Virol*, 2014, 88: 2677–2689
 - 42 Bootz A, Karbach A, Spindler J, et al. Protective capacity of neutralizing and non-neutralizing antibodies against glycoprotein B of cytomegalovirus. *PLoS Pathog*, 2017, 13: e1006601
 - 43 Chandramouli S, Ciferri C, Nikitin P A, et al. Structure of HCMV glycoprotein B in the postfusion conformation bound to a neutralizing human antibody. *Nat Commun*, 2015, 6: 8176
 - 44 Bender F C, Samanta M, Heldwein E E, et al. Antigenic and mutational analyses of herpes simplex virus glycoprotein B reveal four functional regions. *J Virol*, 2007, 81: 3827–3841
 - 45 Connolly S A, Jardetzky T S, Longnecker R. The structural basis of herpesvirus entry. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19: 110–121
 - 46 Amanat F, Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines: status report. *Immunity*, 2020, 52: 583–589
 - 47 Dai L, Gao G F. Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21: 73–82
 - 48 Yassine H M, Boyington J C, McTamney P M, et al. Hemagglutinin-stem nanoparticles generate heterosubtypic influenza protection. *Nat Med*, 2015, 21: 1065–1070
 - 49 Pardi N, Parkhouse K, Kirkpatrick E, et al. Nucleoside-modified mRNA immunization elicits influenza virus hemagglutinin stalk-specific antibodies. *Nat Commun*, 2018, 9: 3361
 - 50 Demming D E, Walz L, Dietert K, et al. Adeno-associated virus-vectored influenza vaccine elicits neutralizing and Fcγ receptor-activating antibodies. *EMBO Mol Med*, 2020, 12: e10938
 - 51 Pancera M, Zhou T, Druz A, et al. Structure and immune recognition of trimeric pre-fusion HIV-1 Env. *Nature*, 2014, 514: 455–461
 - 52 Brouwer P J M, Antanasijevic A, Berndsen Z, et al. Enhancing and shaping the immunogenicity of native-like HIV-1 envelope trimers with a two-component protein nanoparticle. *Nat Commun*, 2019, 10: 4272
 - 53 Agnandji S T, Fernandes J F, Bache E B, et al. Safety and immunogenicity of rVSVΔG-ZEBOV-GP Ebola vaccine in adults and children in Lambaréné, Gabon: a phase I randomised trial. *PLoS Med*, 2017, 14: e1002402
 - 54 Clarke D K, Xu R, Matassov D, et al. Safety and immunogenicity of a highly attenuated rVSVN4CT1-EBOVGP1 Ebola virus vaccine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 clinical trial. *Lancet Infect Dis*, 2020, 20: 455–466
 - 55 Zhang X, Hong J, Zhong L, et al. Protective anti-gB neutralizing antibodies targeting two vulnerable sites for EBV-cell membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119: e2202371119
 - 56 Sun C, Kang Y F, Fang X Y, et al. A gB nanoparticle vaccine elicits a protective neutralizing antibody response against EBV. *Cell Host*

- [Microbe](#), 2023, 31: 1882–1897.e10
- 57 Harrison S C. Viral membrane fusion. [Nat Struct Mol Biol](#), 2008, 15: 690–698
- 58 McLellan J S, Chen M, Joyce M G, et al. Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus. [Science](#), 2013, 342: 592–598
- 59 Krarup A, Truan D, Furmanova-Hollenstein P, et al. A highly stable prefusion RSV F vaccine derived from structural analysis of the fusion mechanism. [Nat Commun](#), 2015, 6: 8143
- 60 Marcandalli J, Fiala B, Ols S, et al. Induction of potent neutralizing antibody responses by a designed protein nanoparticle vaccine for respiratory syncytial virus. [Cell](#), 2019, 176: 1420–1431.e17
- 61 Hsieh C L, Goldsmith J A, Schaub J M, et al. Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes. [Science](#), 2020, 369: 1501–1505
- 62 Corbett K S, Edwards D K, Leist S R, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. [Nature](#), 2020, 586: 567–571
- 63 Roche S, Rey F A, Gaudin Y, et al. Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. [Science](#), 2007, 315: 843–848
- 64 Backovic M, Longnecker R, Jardetzky T S. Structure of a trimeric variant of the Epstein-Barr virus glycoprotein B. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2009, 106: 2880–2885
- 65 Zeev-Ben-Mordehai T, Vasishtan D, Hernández Durán A, et al. Two distinct trimeric conformations of natively membrane-anchored full-length herpes simplex virus 1 glycoprotein B. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2016, 113: 4176–4181
- 66 Si Z, Zhang J, Shivakoti S, et al. Different functional states of fusion protein gB revealed on human cytomegalovirus by cryo electron tomography with Volta phase plate. [PLoS Pathog](#), 2018, 14: e1007452
- 67 Sponholtz M R, Byrne P O, Lee A G, et al. Structure-based design of a soluble human cytomegalovirus glycoprotein B antigen stabilized in a prefusion-like conformation. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2024, 121: e2404250121
- 68 Burrows S R, Sculley T B, Misko I S, et al. An Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cell epitope in EBV nuclear antigen 3 (EBNA 3). [J Exp Med](#), 1990, 171: 345–349
- 69 de Campos-Lima P O, Levitsky V, Brooks J, et al. T cell responses and virus evolution: loss of HLA A11-restricted CTL epitopes in Epstein-Barr virus isolates from highly A11-positive populations by selective mutation of anchor residues. [J Exp Med](#), 1994, 179: 1297–1305
- 70 Steven N M, Leese A M, Annels N E, et al. Epitope focusing in the primary cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus and its relationship to T cell memory. [J Exp Med](#), 1996, 184: 1801–1813
- 71 Callan M F C, Fazou C, Yang H, et al. CD8⁺ T-cell selection, function, and death in the primary immune response *in vivo*. [J Clin Invest](#), 2000, 106: 1251–1261
- 72 Amyes E, Hatton C, Montamat-Sicotte D, et al. Characterization of the CD4⁺ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection. [J Exp Med](#), 2003, 198: 903–911
- 73 Wang B, Yao K, Liu G, et al. Computational prediction and identification of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A antigen-specific CD8⁺ T-cell epitopes. [Cell Mol Immunol](#), 2009, 6: 97–103
- 74 Elliott S L, Suhrbier A, Miles J J, et al. Phase I trial of a CD8⁺ T-cell peptide epitope-based vaccine for infectious mononucleosis. [J Virol](#), 2008, 82: 1448–1457
- 75 Dasari V, McNeil L K, Beckett K, et al. Lymph node targeted multi-epitope subunit vaccine promotes effective immunity to EBV in HLA-expressing mice. [Nat Commun](#), 2023, 14: 4371
- 76 Moreira E D Jr, Kitchin N, Xu X, et al. Safety and efficacy of a third dose of BNT162b2 COVID-19 vaccine. [N Engl J Med](#), 2022, 386: 1910–1921
- 77 Skowronski D M, De Serres G. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. [N Engl J Med](#), 2021, 384: 1576–1577
- 78 Polack F P, Thomas S J, Kitchin N, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. [N Engl J Med](#), 2020, 383: 2603–2615
- 79 El Sahly H M, Baden L R, Essink B, et al. Efficacy of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine at completion of blinded phase. [N Engl J Med](#), 2021, 385: 1774–1785
- 80 Baden L R, El Sahly H M, Essink B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. [N Engl J Med](#), 2021, 384: 403–416
- 81 Mohsen M O, Bachmann M F. Virus-like particle vaccinology, from bench to bedside. [Cell Mol Immunol](#), 2022, 19: 993–1011
- 82 Reguraman N, Hassani A, Philip P S, et al. Assessing the efficacy of VLP-based vaccine against Epstein-Barr virus using a rabbit model.

[Vaccines](#), 2023, 11: 540

- 83 Ruiss R, Jochum S, Wanner G, et al. A virus-like particle-based Epstein-Barr virus vaccine. [J Virol](#), 2011, 85: 13105–13113
- 84 Pavlova S, Feederle R, Gärtner K, et al. An Epstein-Barr virus mutant produces immunogenic defective particles devoid of viral DNA. [J Virol](#), 2013, 87: 2011–2022
- 85 Granato M, Feederle R, Farina A, et al. Deletion of Epstein-Barr virus BFLF2 leads to impaired viral DNA packaging and primary egress as well as to the production of defective viral particles. [J Virol](#), 2008, 82: 4042–4051
- 86 Feederle R, Shannon-Lowe C, Baldwin G, et al. Defective infectious particles and rare packaged genomes produced by cells carrying terminal-repeat-negative Epstein-Barr virus. [J Virol](#), 2005, 79: 7641–7647
- 87 Hettich E, Janz A, Zeidler R, et al. Genetic design of an optimized packaging cell line for gene vectors transducing human B cells. [Gene Ther](#), 2006, 13: 844–856
- 88 Perez E M, Foley J, Tison T, et al. Novel Epstein-Barr virus-like particles incorporating gH/gL-EBNA1 or gB-LMP2 induce high neutralizing antibody titers and EBV-specific T-cell responses in immunized mice. [Oncotarget](#), 2017, 8: 19255–19273
- 89 Ogembo J G, Muraswki M R, McGinnes L W, et al. A chimeric EBV gp350/220-based VLP replicates the virion B-cell attachment mechanism and elicits long-lasting neutralizing antibodies in mice. [J Transl Med](#), 2015, 13: 50
- 90 Escalante G M, Foley J, Mutsunguma L Z, et al. A pentavalent Epstein-Barr virus-like particle vaccine elicits high titers of neutralizing antibodies against Epstein-Barr virus infection in immunized rabbits. [Vaccines](#), 2020, 8: 169
- 91 Zhang X, Zhao B, Ding M, et al. A novel vaccine candidate based on chimeric virus-like particle displaying multiple conserved epitope peptides induced neutralizing antibodies against EBV infection. [Theranostics](#), 2020, 10: 5704–5718
- 92 McCann N, O'Connor D, Lambe T, et al. Viral vector vaccines. [Curr Opin Immunol](#), 2022, 77: 102210
- 93 Wang S, Liang B, Wang W, et al. Viral vectored vaccines: design, development, preventive and therapeutic applications in human diseases. [Sig Transduct Target Ther](#), 2023, 8: 149
- 94 Hui E P, Taylor G S, Jia H, et al. Phase I trial of recombinant modified vaccinia Ankara encoding Epstein-Barr viral tumor antigens in nasopharyngeal carcinoma patients. [Cancer Res](#), 2013, 73: 1676–1688
- 95 Rühl J, Citterio C, Engelmann C, et al. Heterologous prime-boost vaccination protects against EBV antigen-expressing lymphomas. [J Clin Invest](#), 2019, 129: 2071–2087
- 96 Taylor G S, Jia H, Harrington K, et al. A recombinant modified vaccinia Ankara vaccine encoding Epstein-Barr virus (EBV) target antigens: a phase I trial in UK patients with EBV-positive cancer. [Clin Cancer Res](#), 2014, 20: 5009–5022
- 97 Ge Y, Zhou Z, Wang X, et al. In vitro evaluation of the therapeutic effectiveness of EBV-LMP2 recombinant adenovirus vaccine in nasopharyngeal carcinoma. [Biomed Pharmacother](#), 2020, 121: 109626
- 98 Bollard C M, Gottschalk S, Torrano V, et al. Sustained complete responses in patients with lymphoma receiving autologous cytotoxic T lymphocytes targeting Epstein-Barr virus latent membrane proteins. [J Clin Oncol](#), 2014, 32: 798–808
- 99 Chia W K, Wang W W, Teo M, et al. A phase II study evaluating the safety and efficacy of an adenovirus-ΔLMP1-LMP2 transduced dendritic cell vaccine in patients with advanced metastatic nasopharyngeal carcinoma. [Ann Oncol](#), 2012, 23: 997–1005
- 100 Gottschalk S, Edwards O L, Sili U, et al. Generating CTLs against the subdominant Epstein-Barr virus LMP1 antigen for the adoptive immunotherapy of EBV-associated malignancies. [Blood](#), 2003, 101: 1905–1912
- 101 Lowe R S, Keller P M, Keech B J, et al. Varicella-zoster virus as a live vector for the expression of foreign genes. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 1987, 84: 3896–3900
- 102 Soo Hoo W I, Higa K, McCormick A A. Vaccination against Epstein-Barr latent membrane protein 1 protects against an Epstein-Barr virus-associated B cell model of lymphoma. [Biology](#), 2023, 12: 983
- 103 Kieh M, Richert L, Beavogui A H, et al. Randomized trial of vaccines for Zaire Ebola virus disease. [N Engl J Med](#), 2022, 387: 2411–2424
- 104 Kong X W, Zhang X, Bu G L, et al. Vesicular stomatitis virus-based Epstein-Barr virus vaccines elicit strong protective immune responses. [J Virol](#), 2022, 96: e0033622
- 105 Cui X, Cao Z, Sen G, et al. A novel tetrameric gp3501–470 as a potential Epstein-Barr virus vaccine. [Vaccine](#), 2013, 31: 3039–3045
- 106 Cui X, Cao Z, Ishikawa Y, et al. Immunization with Epstein-Barr virus core fusion machinery envelope proteins elicit high titers of neutralizing activities and protect humanized mice from lethal dose EBV challenge. [Vaccines](#), 2021, 9: 285
- 107 Malhi H, Homad L J, Wan Y H, et al. Immunization with a self-assembling nanoparticle vaccine displaying EBV gH/gL protects humanized

- mice against lethal viral challenge. [Cell Rep Med](#), 2022, 3: 100658
- 108 Liu H, Chen H, Liu Z, et al. Therapeutic nanovaccines sensitize EBV-associated tumors to checkpoint blockade therapy. [Biomaterials](#), 2020, 255: 120158
- 109 Amel Jamehdar S, Tabaei S, Mashkani B, et al. Construction of Epstein-Bar virus cocktail peptide fused with Fcγ of IgG: as a potential delivery system for vaccine development. [Bioengineered](#), 2019, 10: 689–696
- 110 Zhao B, Zhang X, Krummenacher C, et al. Immunization with Fc-based recombinant Epstein-Barr virus gp350 elicits potent neutralizing humoral immune response in a BALB/c mice model. [Front Immunol](#), 2018, 9: 932
- 111 Moyle P M. Biotechnology approaches to produce potent, self-adjuvanting antigen-adjuvant fusion protein subunit vaccines. [Biotechnol Adv](#), 2017, 35: 375–389
- 112 Ahmed E H, Brooks E, Sloan S, et al. Targeted delivery of BZLF1 to DEC205 drives EBV-protective immunity in a spontaneous model of EBV-driven lymphoproliferative disease. [Vaccines](#), 2021, 9: 555
- 113 Larijani A, Kia-Karimi A, Roostaei D. Design of a multi-epitopic vaccine against Epstein-Barr virus via computer-based methods. [Front Immunol](#), 2023, 14: 1115345
- 114 Wojtak K, Perales-Puchalt A, Weiner D B. Novel synthetic DNA immunogens targeting latent expressed antigens of Epstein-Barr virus elicit potent cellular responses and inhibit tumor growth. [Vaccines](#), 2019, 7: 44
- 115 Zhao G, Bu G, Liu G, et al. mRNA-based vaccines targeting the T-cell epitope-rich domain of Epstein Barr virus latent proteins elicit robust anti-tumor immunity in mice. [Adv Sci](#), 2023, 10: 2302116
- 116 Xiang Y, Tian M, Huang J, et al. LMP2-mRNA lipid nanoparticle sensitizes EBV-related tumors to anti-PD-1 therapy by reversing T cell exhaustion. [J Nanobiotechnol](#), 2023, 21: 324
- 117 Guo M, Duan X, Peng X, et al. A lipid-based LMP2-mRNA vaccine to treat nasopharyngeal carcinoma. [Nano Res](#), 2023, 16: 5357–5367
- 118 Pulendran B, S. Arunachalam P, O'Hagan D T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. [Nat Rev Drug Discov](#), 2021, 20: 454–475
- 119 Glenny A T, Pope C G, Waddington H, et al. Immunological notes. XVII–XXIV. [J Pathol](#), 1926, 29: 31–40
- 120 Zhao T, Cai Y, Jiang Y, et al. Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms. [Sig Transduct Target Ther](#), 2023, 8: 283
- 121 Morgan A J, Finerty S, Lovgren K, et al. Prevention of Epstein-Barr (EB) virus-induced lymphoma in cottontop tamarins by vaccination with the EB virus envelope glycoprotein gp340 incorporated into immune-stimulating complexes. [J Gen Virol](#), 1988, 69: 2093–2096
- 122 Wu Q, Chen K, Xue W, et al. An insect cell-derived extracellular vesicle-based gB vaccine elicits robust adaptive immune responses against Epstein-Barr virus. [Sci China Life Sci](#), 2024, doi: 10.1007/s11427-023-2599-1
- 123 Hong J, Wei D, Wu Q, et al. Antibody generation and immunogenicity analysis of EBV gp42 N-terminal region. [Viruses](#), 2021, 13: 2380
- 124 Guimarães L E, Baker B, Perricone C, et al. Vaccines, adjuvants and autoimmunity. [Pharmacol Res](#), 2015, 100: 190–209
- 125 Chen Z, Yuan Y, Hu Q, et al. SARS-CoV-2 immunity in animal models. [Cell Mol Immunol](#), 2024, 21: 119–133
- 126 Halfmann P J, Iida S, Iwatsuki-Horimoto K, et al. SARS-CoV-2 Omicron virus causes attenuated disease in mice and hamsters. [Nature](#), 2022, 603: 687–692
- 127 Thomas E, Liang T J. Experimental models of hepatitis B and C—new insights and progress. [Nat Rev Gastroenterol Hepatol](#), 2016, 13: 362–374
- 128 Hatzioannou T, Evans D T. Animal models for HIV/AIDS research. [Nat Rev Microbiol](#), 2012, 10: 852–867
- 129 Mutlu A D A, Cavallin L E, Vincent L, et al. *In vivo*-restricted and reversible malignancy induced by human herpesvirus-8 KSHV: a cell and animal model of virally induced Kaposi's sarcoma. [Cancer Cell](#), 2007, 11: 245–258
- 130 Walsh N C, Kenney L L, Jangalwe S, et al. Humanized mouse models of clinical disease. [Annu Rev Pathol Mech Dis](#), 2017, 12: 187–215
- 131 Zitvogel L, Pitt J M, Dailière R, et al. Mouse models in oncoimmunology. [Nat Rev Cancer](#), 2016, 16: 759–773
- 132 Chuprin J, Buettner H, Seedhom M O, et al. Humanized mouse models for immuno-oncology research. [Nat Rev Clin Oncol](#), 2023, 20: 192–206
- 133 Esteves P J, Abrantes J, Baldauf H M, et al. The wide utility of rabbits as models of human diseases. [Exp Mol Med](#), 2018, 50: 1–10
- 134 Mühe J, Aye P P, Quink C, et al. Neutralizing antibodies against Epstein-Barr virus infection of B cells can protect from oral viral challenge in the rhesus macaque animal model. [Cell Rep Med](#), 2021, 2: 100352
- 135 Xia W, Chen H, Feng Y, et al. Tree shrew is a suitable animal model for the study of Epstein Barr virus. [Front Immunol](#), 2021, 12: 789604
- 136 Xia W, Shi N, Li C, et al. RNA-Seq and miRNA-Seq data from Epstein-Barr virus-infected tree shrews reveal a ceRNA network contributing to immune microenvironment regulation. [Virulence](#), 2024, 15: 2306795

- 137 Xia W, Liu L, Shi N, et al. Epstein Barr virus infection in tree shrews alters the composition of gut microbiota and metabolome profile. *Virol J*, 2023, 20: 177
- 138 Fan Y, Huang Z Y, Cao C C, et al. Genome of the Chinese tree shrew. *Nat Commun*, 2013, 4: 1426
- 139 Kayesh M E H, Sanada T, Kohara M, et al. Tree shrew as an emerging small animal model for human viral infection: a recent overview. *Viruses*, 2021, 13: 1641
- 140 Wang Z, Yi X, Du L, et al. A study of Epstein-Barr virus infection in the Chinese tree shrew(*Tupaia belangeri chinensis*). *Virol J*, 2017, 14: 193
- 141 Nath B M, Schumann K E, Boyer J D. The chimpanzee and other non-human-primate models in HIV-1 vaccine research. *Trends Microbiol*, 2000, 8: 426–431
- 142 Sullivan N J, Geisbert T W, Geisbert J B, et al. Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. *Nature*, 2003, 424: 681–684
- 143 Marzi A, Fletcher P, Feldmann F, et al. Species-specific immunogenicity and protective efficacy of a vesicular stomatitis virus-based Sudan virus vaccine: a challenge study in macaques. *Lancet Microbe*, 2023, 4: e171–e178
- 144 Yuan L, Tang Q, Zhu H, et al. SARS-CoV-2 infection and disease outcomes in non-human primate models: advances and implications. *Emerg Microbes Infects*, 2021, 10: 1881–1889
- 145 Kalter S S, Heberling R L, Ratner J J. EBV antibody in sera of non-human primates. *Nature*, 1972, 238: 353–354
- 146 Cox C, Naylor B A, Mackett M, et al. Immunization of common marmosets with Epstein-Barr virus (EBV) envelope glycoprotein gp340: effect on viral shedding following EBV challenge. *J Med Virol*, 1998, 55: 255–261
- 147 Miller G, Shope T, Coope D, et al. Lymphoma in cotton-top marmosets after inoculation with Epstein-Barr virus: tumor incidence, histologic spectrum antibody responses, demonstration of viral DNA, and characterization of viruses. *J Exp Med*, 1977, 145: 948–967
- 148 Estes J D, Wong S W, Brenchley J M. Nonhuman primate models of human viral infections. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18: 390–404
- 149 Wang F. Nonhuman primate models for Epstein-Barr virus infection. *Curr Opin Virol*, 2013, 3: 233–237
- 150 Moghaddam A, Koch J, Annis B, et al. Infection of human B lymphocytes with lymphocryptoviruses related to Epstein-Barr virus. *J Virol*, 1998, 72: 3205–3212
- 151 Pollard A J, Bijker E M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21: 83–100
- 152 Crowe J E Jr. Principles of broad and potent antiviral human antibodies: insights for vaccine design. *Cell Host Microbe*, 2017, 22: 193–206
- 153 Zhu Q Y, Kong X W, Sun C, et al. Association between antibody responses to Epstein-Barr virus glycoproteins, neutralization of infectivity, and the risk of nasopharyngeal carcinoma. *mSphere*, 2020, 5: e00901-20
- 154 Coghill A E, Bu W, Nguyen H, et al. High levels of antibody that neutralize B-cell infection of Epstein-Barr virus and that bind EBV gp350 are associated with a lower risk of nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2016, 22: 3451–3457
- 155 Dasari V, Bhatt K H, Smith C, et al. Designing an effective vaccine to prevent Epstein-Barr virus-associated diseases: challenges and opportunities. *Expert Rev Vaccines*, 2017, 16: 377–390
- 156 Xue Q, Li X, Yang C, et al. Efficacy of recombinant adenovirus expressing a fusion gene from GM-CSF and Epstein-Barr virus LMP2A in a mouse tumor model. *Hum Vaccines Immunother*, 2017, 13: 2260–2268
- 157 Qu Y, Zhang B, Wang Y, et al. Immunogenicity study of engineered ferritins with C- and N-terminus insertion of Epstein-Barr nuclear antigen 1 epitope. *Vaccine*, 2021, 39: 4830–4841
- 158 Van Zyl D G, Tsai M H, Shumilov A, et al. Immunogenic particles with a broad antigenic spectrum stimulate cytolytic T cells and offer increased protection against EBV infection *ex vivo* and in mice. *PLoS Pathog*, 2018, 14: e1007464
- 159 Long H M, Meckiff B J, Taylor G S. The T-cell response to Epstein-Barr virus-new tricks from an old dog. *Front Immunol*, 2019, 10: 2193

Research progress on the vaccine of Epstein-Barr virus

JIANG ZiYing, TIAN XianShu, XIE Chu, ZHONG Qian, SUN Cong & ZENG Mu-Sheng

State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangdong Key Laboratory of Nasopharyngeal Carcinoma Diagnosis and Therapy, Guangdong Provincial Clinical Research Center for Cancer, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China

Epstein-Barr virus (EBV) is a human herpesvirus that infects the majority of the human population. As the first reported human oncogenic virus, EBV is associated with various hematological malignancies and epithelial cancers. Therefore, effective prophylactic and therapeutic vaccines are of great significance for the control of the EBV-related disease. However, there is no EBV vaccine that has been proved in clinical use to date. The outbreak of the COVID-19 pandemic has brought great challenges for global virus control, and thus boosting the innovation of virus vaccine design. The development of vaccine against SARS-CoV-2 has provided insights for current vaccine research, no matter in the aspect of target antigen selection or vaccine design platform. In recent years, progress has been made in EBV vaccine such as nanoparticle and mRNA vaccine, and several vaccines against EBV have entered clinical trials. In this article, we will provide a comprehensive review of the current status of EBV vaccine based on antigen selection, vaccine platform, formulation and evaluation system. Additionally, a prospective outlook on the future developments in this field will be presented.

Epstein-Barr virus, vaccine, glycoprotein, adjuvant, animal model

doi: [10.1360/SSV-2024-0179](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0179)