

· 综 述 ·

# 人类口服病毒疫苗的研究进展

李杉<sup>1,2</sup>, 刘夏飞<sup>1</sup>, 段招军<sup>1\*</sup>

1 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 102206

2 甘肃中医药大学公共卫生学院, 甘肃 兰州 730000

李杉, 刘夏飞, 段招军. 人类口服病毒疫苗的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3556-3565.

LI Shan, LIU Xiafei, DUAN Zhaojun. Advances of human oral viral vaccine development[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3556-3565.

**摘 要:** 研制能同时诱导有效黏膜免疫和系统免疫的疫苗是预防黏膜感染病原体的理想目标。消化道具有许多产生黏膜免疫的位点, 包括口腔、胃和小肠等。理想的口服病毒疫苗不仅能诱导较好的局部及远端黏膜免疫, 也能产生较好的系统免疫, 而且还因为具有无痛接种、可自行服用等优势而备受关注。由于人消化道环境及黏膜免疫的复杂性, 目前成功上市的人口口服病毒疫苗仅限于3种减毒活疫苗。本文将从消化道黏膜免疫的特点、当前口服病毒疫苗种类及研究现状、口服病毒疫苗所面临的挑战等方面进行综述, 期望对我国人口口服病毒疫苗的研究和开发提供参考和借鉴。

**关键词:** 黏膜免疫; 口服; 病毒疫苗

## Advances of human oral viral vaccine development

LI Shan<sup>1,2</sup>, LIU Xiafei<sup>1</sup>, DUAN Zhaojun<sup>1\*</sup>

1 National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

2 School of Public Health, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu, China

**Abstract:** Development of a vaccine that can simultaneously induce effective mucosal immunity and systemic immunity is an ideal goal to prevent mucosal pathogenic infections. The digestive tract has many sites for inducing mucosal immunity, including the mouth, stomach and small intestine. An ideal oral viral vaccine can not only induce better local and distal mucosal immunity, but also produce better systemic immunity. The oral viral vaccine has also attracted much attention because of its painless vaccination, self-administration and other advantages.

资助项目: 国家自然科学基金(21934005)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (21934005).

\*Corresponding author. E-mail: zhaojund@126.com

Received: 2022-12-01; Accepted: 2023-03-13

Due to the complexity of human digestive tract environment and mucosal immunity, only three oral attenuated live vaccines have been successfully marketed for human use. This review summarizes the characteristics of gastrointestinal mucosal immunity, the current types and research status of oral viral vaccines, and the challenges faced by oral viral vaccines, with the hope to facilitate the research and development of oral viral vaccines for human use in China.

**Keywords:** mucosal immunity; oral administration; viral vaccine

接种疫苗是人类传染病防控最重要的公共卫生措施和手段。肌肉或皮下注射是最为常见的疫苗接种方式,可诱发有效的全身系统免疫,但提供的黏膜免疫较弱,在针对一些通过黏膜感染的病原体的保护效果不佳。理想的口服病毒疫苗不仅可以无痛、无需冷链和自行服用,快速实现大规模接种,最关键的是还能同时诱导有效的黏膜免疫和系统免疫,产生最佳的保护效果。已有的研究数据<sup>[1]</sup>表明,针对经过消化道或呼吸道黏膜感染的病毒,通过口服或鼻内免疫途径诱导黏膜免疫的疫苗完全可能实现上述目的。

20世纪50年代,Hilary Koprowsk和Albert Sabin开发了针对脊髓灰质炎病毒的第一批口服疫苗<sup>[2]</sup>。20世纪,Sabin研制的三价口服脊髓灰质炎疫苗(oral polio vaccine, OPV)广泛使用<sup>[1]</sup>。从那时起,针对胃肠炎(轮状病毒)和急性呼吸道疾病(腺病毒)的口服疫苗也开始研制。但是消化道使口服疫苗的递送面临许多挑战,包括降解、通过黏膜屏障的吸收不良等。因此,口服病毒疫苗的开发进展缓慢,目前已批准的口服疫苗也仅限于影响胃肠道的疾病,其类型为减毒活疫苗或灭活疫苗<sup>[3]</sup>。而其他类型的疫苗,如口服蛋白疫苗、口服核酸疫苗等对降解敏感,口服更具挑战性,目前尚未研制成功。本文将从消化道黏膜免疫的特点、当前口服病毒疫苗种类及研究现状、口服病毒疫苗所面临的挑战等方面进行总结,期望对我国人口服病毒疫苗的研究和开发提供参考和借鉴。

## 1 消化道黏膜免疫系统

黏膜免疫系统不仅是机体抵抗病原菌入侵的第一道免疫屏障,也是预防消化道等传染病的主要生理基础<sup>[2]</sup>。从功能上看,黏膜免疫系统可以分为2个主要部分,诱导位点和效应位点。诱导位点是指大多数淋巴细胞在抗原刺激下被激活和扩张的部位<sup>[3]</sup>,主要有一些黏膜相关的淋巴组织或微褶细胞(M细胞)等具有生发中心的上皮淋巴组织。另一部分是效应位点,效应位点是指活化淋巴细胞迁移和重新定位并介导免疫反应的<sup>[3]</sup>。一个黏膜的诱导位点可以启动远端黏膜的免疫反应,这被称为共同黏膜免疫系统(common mucosal immune system, CMIS)。抗原刺激激活的免疫细胞不断从诱导位点迁移到效应位点,形成共同黏膜免疫系统的细胞基础<sup>[4]</sup>。但是黏膜免疫反应通常在诱导部位的近端最强。因此,对于口服疫苗的最佳递送,可能需要了解特定病原体的进入途径,并针对消化道内特定的部位进行递送,从而达到局部黏膜和全身免疫反应的最佳效果。

消化道的几个区域为口服疫苗提供了潜在靶点,包括口腔、胃、小肠、大肠和直肠<sup>[5-6]</sup>。其中,口腔黏膜含有丰富的淋巴组织,其pH值比其他消化道环境更有利于生物制剂的稳定<sup>[7]</sup>,是疫苗接种最容易进入的黏膜诱导部位<sup>[8]</sup>;而胃内环境恶劣,不利于微生物的定殖和生长,因此,目前关于胃作为黏膜免疫接种部位的相关研究较少;与口腔和胃腔的黏膜不同,小肠

可以快速地识别外来抗原,并通过黏膜屏障将抗原运送到免疫系统<sup>[9-10]</sup>,是目前所有批准的口服疫苗的靶点,也是目前研究认为最适合的口服疫苗靶点<sup>[11-13]</sup>;同时,大肠(包括直肠)中的M细胞也为感染性病原体提供了一个入口,包括人类免疫缺陷病毒。可以利用这个诱导位点来获得分泌性IgA保护,来对抗感染结肠、直肠和阴道黏膜表面的病原体<sup>[14]</sup>。

## 2 口服病毒疫苗种类及研究现状

### 2.1 口服病毒疫苗种类

目前在研的口服病毒疫苗种类主要有:口服减毒活疫苗、口服载体疫苗、口服蛋白疫苗和口服核酸疫苗。但已上市的口服病毒疫苗都是口服减毒活疫苗。

口服减毒活疫苗由活性细菌或病毒组成,其毒性比致病性亲本细菌或病毒株低很多。理想情况下,减毒活疫苗在给药部位形成轻微感染。同时它们也可以被设计成具有有限复制能力,并在免疫部位提供足够高的抗原负荷,同时避免不必要的局部炎症反应<sup>[15]</sup>。这些特性可以使口服疫苗接种之后,进行长时间的抗原暴露并产生大量抗原从而诱导黏膜免疫反应<sup>[16]</sup>。

口服减毒活疫苗面临的一个主要挑战是如何在保证足够的减毒和免疫原性之间取得平衡。例如,轮状病毒减毒活疫苗是病毒通过细胞连续传代来降低毒性<sup>[15-17]</sup>,从而使其具有极轻度的感染性和高度的免疫原性。虽然口服减毒活疫苗具有很好的免疫原性,可以将高水平抗原传递到黏膜特定部位,但如何产生和保证活疫苗的安全性和稳定性仍然是很大的挑战。

### 2.2 已上市的口服病毒减毒活疫苗

已上市的口服病毒疫苗包括了3种减毒活疫苗:口服脊髓灰质炎病毒疫苗、口服腺病毒

疫苗和口服轮状病毒疫苗。这些疫苗都采用了减毒的活病原体。与野生型病毒一样,减毒型的活病毒疫苗可以在胃和肠道环境中通过转运并防止降解和保持足够的抗原性,在消化道黏膜中引起有效的免疫反应和免疫保护性。

#### 2.2.1 口服脊髓灰质炎疫苗

口服脊髓灰质炎疫苗(oral polio vaccine, OPV)是第一个研制成功的口服病毒疫苗。自1960年以来,口服脊髓灰质炎减毒活疫苗开始用于人类。OPV由3种血清型脊髓灰质炎减毒活毒株混合而成,需要间隔进行3剂次接种才能诱导足够的体液和黏膜免疫来产生保护作用。OPV诱导的血清抗体可防止脊髓灰质炎病毒向神经系统传播,从而保护个人避免脊髓灰质炎瘫痪。此外,与注射的灭活脊髓灰质炎疫苗(inactivated poliovirus vaccine, IPV)相比,OPV在肠黏膜产生高水平的局部SIgA免疫反应,而肠黏膜是脊髓灰质炎病毒进入和增殖的主要部位<sup>[18-19]</sup>。这种局部肠道黏膜反应可以极为有效地阻止野生脊髓灰质炎病毒的人际传播。研究表明OPV存在极低的神经毒性逆转风险(1/2 500 000)<sup>[19]</sup>。尽管OPV已证明其在诱导体液和黏膜免疫方面具有卓越的疗效,但仍需要根据疾病防控的目标,全面考虑OPV的安全性问题。全球在通过广泛的OPV疫苗接种计划成功根除该病以来,从野生型病原体获得该病的风险低于从服用OPV获得该病的风险<sup>[19]</sup>。因此,OPV在大多数工业化国家已被IPV所取代。

#### 2.2.2 口服腺病毒疫苗

数十年来,口服复制型腺病毒(adenovirus, Ad)疫苗一直被美国军方用于预防新兵中4型和7型腺病毒呼吸道疾病。1971年对受训者的一项研究表明<sup>[20]</sup>,口服Ad4和Ad7血清型疫苗是安全的,没有副作用,并且在预防腺病毒呼吸道疾病方面有95%以上的有效性。随后,开

展了其他口服 Ad 血清型疫苗的研究, 主要包括在受训人群中的 Ad21 疫苗<sup>[20]</sup>以及在普通人中开展的 1、2 和 5 型腺病毒疫苗研究。研究表明, Ad1、2、5 和 21 疫苗的免疫原性、安全性和脱落结果与 Ad4 和 Ad7 疫苗相似<sup>[20]</sup>。获得许可的口服腺病毒疫苗被肠溶片包裹, 使它们在克服胃酸性 pH 值导致降解的同时在下肠道出现无症状感染, 并在上呼吸道产生免疫, 其保护作用与特异性血清中和抗体的存在有关。

### 2.2.3 口服轮状病毒疫苗

轮状病毒是引起人类婴幼儿重症腹泻的主要病原体<sup>[21]</sup>。目前, 全球有 6 种口服轮状病毒减毒活疫苗获批上市, 在降低全球腹泻, 尤其是轮状病毒腹泻的疾病负担中产生了显著的作用, 包括全球广泛使用的五价轮状病毒疫苗(RotaTeq)和单价轮状病毒疫苗(Rotarix), 分别在 2008 年和 2009 年最先获得世界卫生组织(World Health Organization, WHO)预认证; 在印度获批使用的 1 种单价疫苗(Rotavac, Bharat Biotech Ltd)和 1 种五价疫苗(BRV-PV, Rotasil), 也在 2018 年获得 WHO 预认证。此外, 中国批准上市的兰州单价羔羊轮状病毒疫苗(Lanzhou lamb rotavirus, LLR)和越南批准的单价人轮状病毒疫苗(Rotavin-M1)仅在本国使用<sup>[22]</sup>。尽管这些疫苗的效力各不相同, 但在低收入国家的效力明显低于高收入国家。造成这种差异的原因还不清楚, 但被认为是多因素的<sup>[22]</sup>, 包括通过胎盘或母乳获得的母传抗体(轮状病毒特异性 IgA)的抑制作用<sup>[23]</sup>, 同时接种的口服脊髓灰质炎疫苗的影响<sup>[24]</sup>, 不同人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)血型的干扰作用<sup>[25]</sup>, 以及营养不良、环境因素、慢性和合并感染等都可能抑制或干扰机体对轮状病毒(Rotavirus, RV)疫苗的免疫应答等。最近的研究表明, 肠道菌群的组成和多样性, 特别是细菌,

也可能影响口服 RV 和其他口服疫苗的免疫原性<sup>[22]</sup>。

## 2.3 在研的口服病毒疫苗

### 2.3.1 口服载体疫苗

口服的载体疫苗主要可分为口服非致病性细菌载体疫苗和口服病毒载体疫苗。而口服载体的病毒疫苗以病毒载体为主。肠道感染的病毒是口服疫苗抗原载体很好的候选者。腺病毒尤其能抵抗肠道环境, 并能感染肠道细胞。其原理是将目标抗原基因通过重组 DNA 技术插入病毒载体, 重组的病毒载体在体外包装形成重组的载体病毒, 重组载体病毒通过口服途径感染人体, 重组载体病毒复制的同时可以大量表达目标抗原基因, 从而激活和诱导针对目标抗原的特异性免疫应答<sup>[26]</sup>。但活病毒载体的潜在安全性问题必须重视和消除, 如以脊髓灰质炎病毒为载体的口服疫苗可以发生野病毒逆转。

目前, 在研的主要口服病毒载体是腺病毒载体, 而以轮状病毒和脊髓灰质炎病毒为载体的口服疫苗也取得了一定的进展。腺病毒是非包膜的双链 DNA 病毒, 能够引起强烈的 T 和 B 细胞反应, 并且可诱导大量的 I 型干扰素启动适应性免疫应答, 因此腺病毒也是一种特征最明显、应用最广泛的病毒疫苗载体<sup>[27]</sup>。已有针对艾滋病毒、流感、呼吸道合胞病毒、诺如病毒和人类乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)等的腺病毒载体疫苗的研究, 部分疫苗已进入临床试验<sup>[28-29]</sup>。最近发表的 1 项 2 期临床研究结果证实, 基于腺病毒 5 载体的口服流感疫苗片具有保护人类免受甲型流感病毒感染的能力<sup>[30]</sup>。而基于腺病毒 5 载体的口服新冠疫苗已进入临床 2 期<sup>[31]</sup>。本团队也建立了基于腺病毒 5 载体的口服疫苗平台, 分别开展了人诺如病毒(VP1 蛋白)<sup>[32]</sup>、新型冠状病毒(SARS-CoV-2) omicron 变异株 S 蛋白以及呼吸道合胞病毒前构象 F 蛋

白的重组 5 型腺病毒载体口服疫苗的研究。鉴于脊髓灰质炎病毒可引起较强的黏膜免疫和系统免疫(包括体液免疫和细胞免疫)<sup>[33]</sup>。因此,其作为病毒载体也存在很大的优势,利用脊髓灰质炎病毒的嗜神经性开发用于中枢神经系统疾病治疗的载体将是一个值得深入研究的新方向<sup>[32]</sup>。轮状病毒作为载体的研究才刚刚起步,但近几年利用反向遗传学开发安全有效的轮状病毒疫苗载体取得了一定的进展,公开的资料显示轮状病毒很可能成为新一代高效的口服疫苗载体<sup>[34]</sup>。本团队利用反向遗传学技术<sup>[35]</sup>建立了针对新型冠状病毒(SARS-CoV-2) omicron 变异株 RBD 蛋白的口服轮状病毒载体疫苗,正在小鼠体内开展免疫原性的评价。

### 2.3.2 口服蛋白疫苗

基于蛋白抗原开发针对登革热、流感、破伤风、白喉、肝炎和中东呼吸综合征冠状病毒等传染病的口服疫苗已经在尝试研制中<sup>[36-39]</sup>。但是口服蛋白疫苗通常稳定性较低,诱导抗体和细胞免疫反应的效果不佳。为了克服这些限制,目前的研究主要集中在添加佐剂,通过免疫刺激剂或免疫递呈系统来增强免疫反应<sup>[40]</sup>。例如,聚合物微粒和纳米颗粒已被广泛用于蛋白质疫苗的开发。口服蛋白疫苗的化学结构需要进行一定的控制,因此需要更好地利用天然聚合物来设计配方,进而继续在临床研究中对其进行评估。在疫苗免疫原性和保护性评估方面一直局限于体液免疫中的抗体反应的评估,但细胞免疫反应也很重要,还需要深入分析这一领域中与疫苗保护性相关的免疫指标和机制。此外,脂质疫苗载体,包括脂质体、胆质体和免疫刺激复合物,以及其他具有佐剂功能的运载体也正在开发中,其进一步的使用和优化必将有助于生产针对黏膜疾病的口服蛋白疫苗。

### 2.3.3 口服核酸疫苗

口服核酸疫苗是利用核酸(DNA 或 RNA)作为对抗病原体的抗原来源的口服疫苗。RNA 疫苗又可以分为 2 种类型:修饰的 mRNA 和自我复制的 RNA。在研的口服核酸疫苗以口服 DNA 疫苗和口服 mRNA 疫苗为主。DNA 和 mRNA 疫苗具有快速和低成本生产的潜力,因此在应对大流行方面具有特别的意义,但是它们对降解很敏感,因此很难实现有效的口服目的。研究表明,口服 DNA 疫苗的编码蛋白可在肠上皮细胞、脾和肠系膜淋巴结等处表达,可明显刺激全身性的细胞免疫和体液免疫应答,如细胞毒性 T 细胞活性和特异性 IgG 抗体产生,使肠黏膜局部产生特异性分泌型 IgA (SIgA)<sup>[41]</sup>。目前,口服 DNA 疫苗 S2-Ag85 疫苗(布鲁氏菌病)已被证明可以保护人体,而针对病毒的口服 DNA 疫苗也正在开发,包括艾滋病毒、流感、乙型肝炎病毒、单纯疱疹病毒和人乳头瘤病毒的 DNA 口服疫苗。如果这些疫苗取得成功,或将开启 DNA 口服疫苗治疗疾病的新时代。迄今获批的 mRNA 疫苗都是通过注射接种,而口服 mRNA 疫苗还处在早期研究阶段,包括通过口服胶囊来递送 mRNA 疫苗的研究。这种胶囊可以向猪的胃中递送约 150  $\mu\text{g}$  的 mRNA。这一递送量超过了目前使用的注射途径的 mRNA 新冠疫苗。该研究团队在研究中发现猪的胃部细胞成功产生了报告蛋白,但在其他器官和组织中并未发现,研究团队表示,将在后续研究中改进纳米颗粒组成或给予更大剂量,来增加其他器官对递送进去的 mRNA 的吸收。该研究团队还表示,也有可能仅向胃部递送 mRNA 就足以诱导产生强烈的免疫反应。这种 mRNA 的口服给药方式表明了口服 mRNA 疫苗的进一步发展的潜力。

### 3 口服疫苗研发的应对策略

消化道环境及黏膜免疫的复杂性给口服疫苗的研制带来了诸多挑战,其应对策略主要包括以下几个方面。

#### 3.1 防止疫苗降解和变性

在消化道中,抗原的口服交付需要克服多种物理化学和生物屏障来促进强大的免疫反应。肠道上皮及其黏液分泌层的生物屏障作用是在消化摄入的物质来吸收营养的同时保护机体免受病原的侵袭<sup>[42]</sup>。胃肠道广泛的 pH 值范围以及胃内的高酸性环境,以及存在大量的蛋白水解酶的这些特性严重干扰了生物分子(如抗原蛋白或多肽)的传递<sup>[43]</sup>。另外,胃肠道转运时间也是影响口服疫苗胃肠道稳定性的一个因素。考虑到不同的胃排空时间,禁食条件下短至 2 h,喂食条件下长至 16 h,在极低的胃 pH (pH 2.0–4.0)下,疫苗在胃中的长期存在可能导致被水解消化或变性。已经在开发的病毒载体、病毒样颗粒、微/纳米颗粒和纳米凝胶等运载系统就具有保护抗原防止其降解或变性的目的。

#### 3.2 增强疫苗摄取

抗原在恶劣的胃肠道环境中存活下来后,需要被抗原提呈细胞吸收,然后呈递给效应免疫细胞。由于与外界的密切接触,肠上皮形成了一些物理和化学屏障,这对免疫稳态至关重要,但也使口服疫苗难以达到预期的靶点和诱导强大的免疫反应。为了克服这些问题,正在研究将口服疫苗选择性地输送到肠黏膜的特定细胞群中,包括使用各种配体将疫苗抗原靶向于 M 细胞、肠上皮细胞和抗原提呈细胞的特异性受体。通过这种递送方法来增强疫苗摄取,从而诱发更强的特异性黏膜免疫应答。

#### 3.3 开发新型黏膜佐剂

口服黏膜佐剂的作用在于提高疫苗在黏膜

部位的生物利用度并提高疫苗的免疫原性,从而达到使用较低剂量的抗原和较少剂次的疫苗免疫方案。目前的口服黏膜免疫佐剂大致可分为两类:免疫刺激剂和免疫递呈系统。

免疫刺激剂主要通过 3 种机制启动免疫激活:(1) 与非 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)结合后的毒素介导的免疫刺激。这一类的最佳代表是霍乱毒素、大肠杆菌(*Escherichia coli*)产生的热不稳定毒素和白喉毒素,但由于毒性作用,未能得到临床应用。为了避免这些毒性效应,已经创建了减弱或破坏毒素活性位点的突变体<sup>[44]</sup>,例如,重组霍乱毒素亚基 B 已用于 Dukoral<sup>®</sup>疫苗<sup>[45]</sup>。(2) 作为病原体识别受体配体的物质,这些佐剂基于病原体相关的分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMPs)的激活,并通过 TLR 刺激起作用。当前,有 3 种此类型的佐剂前景较好:一种为革兰氏阴性菌属的明尼苏达沙门氏菌(*Salmonella minnesota*)的脂多糖 L 的单磷酸脂质 A,其已经被葛兰素史克公司用于 Cervarix<sup>™</sup>(人乳头瘤病毒疫苗)和 Fendrix<sup>™</sup>(乙型肝炎疫苗);合成的含有未甲基化双核苷酸的寡脱氧核苷酸(CpG oligodeoxynucleotide, CpG ODN)是另一种 TLR 激动剂。2017 年美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的一种乙肝疫苗 HEPLISAV-B,是第一种添加 CpG ODN 佐剂的疫苗<sup>[46]</sup>;人 TLR5 的天然激动剂鞭毛蛋白是细菌鞭毛的关键成分,也是另一种黏膜佐剂,已有研究证明,鞭毛蛋白促进最大抗原特异性抗体反应所需的剂量低于刺激最大先天免疫反应所需的剂量,但是目前还没有上市疫苗使用该种佐剂。(3) 天然免疫调节剂,如细胞因子、趋化因子<sup>[47]</sup>。细胞因子和趋化因子已被证明在黏膜部位作为佐剂起作用。然而,目前剂量相关毒性和稳定性等问题阻碍了它们的应用。

免疫递呈系统主要的作用为封装抗原并将其递送至特定的细胞。目前研究广泛的有脂质体、聚合物以及免疫刺激复合物(immune stimulating complex, ISCOM)等。其中, 阳离子佐剂 01 [二甲基二十八烷基胺(dimethyldioctadecylamium, DDA)和海藻糖二溴酸酯组成]已用于不同病原体的动物模型, 如结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)<sup>[48]</sup>、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、链球菌(*Streptococcus*)等<sup>[49]</sup>, 此外还用于基于 CAF01 佐剂的重组蛋白亚单位(CTH522)的衣原体疫苗的一期临床试验<sup>[50-51]</sup>; 另一种被广泛研究的是壳聚糖, 一项研究评估了基于壳聚糖功能化氧化铁纳米酶和整个灭活病毒的流感疫苗, 观察到壳聚糖增加抗原在黏膜的粘附, 并增强了小鼠的黏膜适应性免疫。ISCOM 佐剂也已被证明是一种良好的黏膜佐剂, 它能诱导强烈的黏膜免疫反应, 例如使用 ISCOM 与霍乱毒素和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)蛋白 a 的融合口服给药可诱导强烈的细胞介导和体液免疫反应<sup>[52]</sup>。研制高效、安全的新型黏膜佐剂已成为口服疫苗的重点、重点和难点。

### 3.4 防止口服耐受

口服耐受是口服抗原后出现的免疫无反应性, 是口服疫苗给药系统开发中的一个潜在问题<sup>[52-53]</sup>。早期观察到口服卵清蛋白或二硝基氯苯可抑制 T 细胞应答, 随后的各种实验又报道了可溶性蛋白抗原、接触致敏剂、异体血细胞和灭活病毒可诱导口服耐受。目前, 了解口服耐受性的机制仍然是一个持续的问题。有研究认为口服耐受性可能是免疫细胞处理较高的总抗原的自然结果。动物模型研究表明, 口服耐受出现在大多数调节性 T 细胞激活诱导时, 细胞死亡或失能引起应答耐受<sup>[18,54]</sup>。黏膜递送抗原后诱导调节性 T 细胞的研究已有超过 25 年的历史, 最近的研究表明, 主要的 4 种类型调节

性 T 细胞: (1) 抗原诱导的 CD4<sup>+</sup> TH2 细胞, (2) CD4<sup>+</sup>CD45RBlow T r1, (3) CD4<sup>+</sup>或 CD8<sup>+</sup> T 细胞产生 TGF- $\beta$  (TH3 细胞), (4) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞(Treg 细胞)可诱导或扩大抗原介导的口服耐受<sup>[18]</sup>。大量可溶性蛋白或大量抗原给药后诱导的特异性 T 细胞会变得无效和缺失<sup>[54]</sup>。目前避免口服耐受的主要方法是应用控释技术以及开发更好的佐剂。

### 3.5 其他需关注问题的应对策略

近年的研究表明肠道菌群在调节肠道和全身免疫系统中发挥重要作用。肠道菌群同样可以影响口服疫苗的疗效<sup>[18,55]</sup>。肠道菌群不仅在生命早期塑造免疫系统, 而且菌群产生的代谢物还有助于上皮屏障的完整性, 肠道菌群的失衡会导致疫苗失败<sup>[56]</sup>。研究还发现微生物群是免疫佐剂的重要来源, 如鞭毛蛋白、脂多糖或细菌肽聚糖。因此, 肠道微生物组的组成可能在调节免疫系统方面发挥重要作用, 从而影响对疫苗的反应。有研究发现在孟加拉国儿童中, 放线菌与脊髓灰质炎病毒疫苗接种增加的体液和细胞反应有关<sup>[55]</sup>。有研究报道婴儿肠道微生物组的组成与轮状病毒疫苗的免疫应答有关<sup>[57]</sup>。因此, 这一领域的更多研究将有助于开发更有效的口服疫苗<sup>[58]</sup>。此外, 提高口服疫苗自我接种的潜力将为偏远地区及发展中国家提高疫苗覆盖率具有重要的现实意义。因此, 疫苗配方的热稳定性也需要额外考虑, 而加入稳定辅料和/或使用干固体制剂已被证明可以改善口服疫苗的热稳定性<sup>[59]</sup>, 这对冷链基础设施有限的发展中国家至关重要<sup>[60]</sup>。

## 4 结语

综上所述, 尽管通过口服途径接种疫苗具有诸多的便利和优势, 但成功应用的人口服病毒疫苗还是比较单一类型的减毒活疫苗。在复

杂的消化道环境中,与口服疫苗有效性直接相关的疫苗稳定性、生物利用度以及口服耐受,包括减毒活疫苗的安全性等诸多问题,以及消化道局部黏膜免疫和系统免疫互作并提供有效免疫保护的机制、新型口服黏膜佐剂等都必须得到较好的研究和解决,才能更好地推动口服病毒疫苗的研制和成功。

## REFERENCES

- [1] 余妍. 胃肠道感染细菌口服疫苗与粘膜免疫应答研究进展[J]. 遵义医学院学报, 2003, 26(5): 478-480.  
YU Y. Research progress on oral bacterial vaccine and mucosal immune response in gastrointestinal infection[J]. *Acta Academiae Medicinae Zunyi*, 2003, 26(5): 478-480 (in Chinese).
- [2] KOPROWSKI H. Vaccines and sera through plant biotechnology[J]. *Vaccine*, 2005, 23(15): 1757.
- [3] WU RQ, ZHANG DF, TU E, CHEN QM, CHEN WJ. The mucosal immune system in the oral cavity—an orchestra of T cell diversity[J]. *International Journal of Oral Science*, 2014, 6(3): 125-132.
- [4] YUKI Y, KIYONO H. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity[J]. *Reviews in Medical Virology*, 2003, 13(5): 293-310.
- [5] MURPHY K, WEAVER C. *Janeway's Immunobiology*[M]. New York, NY: Garland Science, 2016.
- [6] VANWIJK F, CHEROUTRE H. Intestinal T cells: facing the mucosal immune dilemma with synergy and diversity[J]. *Seminars in Immunology*, 2009, 21(3): 130-138.
- [7] CREIGHTON RL, WOODROW KA. Microneedle-mediated vaccine delivery to the oral mucosa[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2018: 1801180.
- [8] COFFEY JW, DAS GAIHA G, TRAVERSO G. Oral biologic delivery: advances toward oral subunit, DNA, and mRNA vaccines and the potential for mass vaccination during pandemics[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2021, 61: 517-540.
- [9] MOWAT AM, AGACE WW. Regional specialization within the intestinal immune system[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2014, 14(10): 667-685.
- [10] CORR SC, GAHAN CCGM, HILL C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis[J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2008, 52(1): 2-12.
- [11] VELA RAMIREZ JE, SHARPE LA, PEPPAS NA. Current state and challenges in developing oral vaccines[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2017, 114: 116-131.
- [12] MARASINI N, SKWARCZYNSKI M, TOTH I. Oral delivery of nanoparticle-based vaccines[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2014, 13(11): 1361-1376.
- [13] ANSELMO AC, GOKARN Y, MITRAGOTRI S. Non-invasive delivery strategies for biologics[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2019, 18(1): 19-40.
- [14] CZERKINSKY C, HOLMGREN J. Mucosal Delivery Routes for Optimal Immunization: Targeting immunity to the right tissues[M]//*Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 1-18.
- [15] PASETTI MF, SIMON JK, SZTEIN MB, LEVINE MM. Immunology of gut mucosal vaccines[J]. *Immunological Reviews*, 2011, 239(1): 125-148.
- [16] SINGH M. *Vaccine Adjuvants and Delivery Systems*[M]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. 2007.
- [17] GREENBERG HB, ESTES MK. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(6): 1939-1951.
- [18] HOLMGREN J, CZERKINSKY C. Mucosal immunity and vaccines[J]. *Nature Medicine*, 2005, 11(S4): S45-S53.
- [19] PARKER EP, MOLODECKY NA, PONS-SALORT M, O'REILLY KM, GRASSLY NC. Impact of inactivated poliovirus vaccine on mucosal immunity: implications for the polio eradication endgame[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2015, 14(8): 1113-1123.
- [20] TUCKER SN, TINGLEY DW, SCALLAN CD. Oral adenoviral-based vaccines: historical perspective and future opportunity[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2008, 7(1): 25-31.
- [21] BERGMAN H, HENSCHKE N, HUNGERFORD D, PITAN F, NDWANDWE D, CUNLIFFE N, SOARES-WEISER K. Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: vaccines in use[J]. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2021, 2021(11): CD008521
- [22] MAGWIRA CA, TAYLOR MB. Composition of gut microbiota and its influence on the immunogenicity of oral rotavirus vaccines[J]. *Vaccine*, 2018, 36(24): 3427-3433.
- [23] MOON SS, GROOME MJ, VELASQUEZ DE, PARASHAR UD, JONES S, KOEN A, van NIEKERK N, JIANG BM, MADHI SA. Pre vaccination rotavirus serum IgG and IgA are associated with lower immunogenicity of live, oral human rotavirus vaccine in south African infants[J]. *Clinical Infectious Diseases*,



- 2016, 62(2): 157-165.
- [24] EMPERADOR DM, VELASQUEZ DE, ESTIVARIZ CF, LOPMAN B, JIANG BM, PARASHAR U, ANAND A, ZAMAN K. Interference of monovalent, bivalent, and trivalent oral poliovirus vaccines on monovalent rotavirus vaccine immunogenicity in rural Bangladesh[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2016, 62(2): 150-156.
- [25] HOOPER LV, MACPHERSON AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2010, 10(3): 159-169.
- [26] FORBES EK, de CASSAN SC, LLEWELLYN D, BISWAS S, GOODMAN AL, COTTINGHAM MG, LONG CA, PLEASS RJ, HILL AVS, HILL F, DRAPER SJ. T cell responses induced by adenoviral vectored vaccines can be adjuvanted by fusion of antigen to the oligomerization domain of C4b-binding protein[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44943.
- [27] PELASEYED T, BERGSTRÖM JH, GUSTAFSSON JK, ERMUND A, BIRCHENOUGH GMH, SCHÜTTE A, van der POST S, SVENSSON F, RODRÍGUEZ-PIÑEIRO AM, NYSTRÖM EEL, WISING C, JOHANSSON MEV, HANSSON GC. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system[J]. *Immunological Reviews*, 2014, 260(1): 8-20.
- [28] TATSIS N, ERTL HCJ. Adenoviruses as vaccine vectors[J]. *Molecular Therapy*, 2004, 10(4): 616-629.
- [29] BAROUCH DH. Novel adenovirus vector-based vaccines for HIV-1[J]. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 2010, 5(5): 386-390.
- [30] McILWAIN DR, CHEN H, RAHIL Z, BIDOKI NH, JIANG SZ, BJORNSON Z, KOLHATKAR NS, MARTINEZ CJ, GAUDILLIÈRE B, HEDOU J, MUKHERJEE N, SCHÜRCH CM, TREJO A, AFFRIME M, BOCK B, KIM K, LIEBOWITZ D, AGHAEPOUR N, TUCKER SN, NOLAN GP. Human influenza virus challenge identifies cellular correlates of protection for oral vaccination[J]. *Cell Host & Microbe*, 2021, 29(12): 1828-1837.e5
- [31] MOORE AC, DORA EG, PEINOVICH N, TUCKER KP, LIN K, CORTESE M, TUCKER SN. Pre-clinical studies of a recombinant adenoviral mucosal vaccine to prevent SARS-CoV-2 infection[J]. *BioRxiv*, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.09.04.283853>.
- [32] 王金冬, 马亚林, 毛彤瑶, 段招军. 表达诺如病毒衣壳蛋白的重组腺病毒疫苗的构建及其免疫原性分析[J]. *中国生物制品学杂志*, 2022, 35(3): 257-262.
- WANG JD, MA YL, MAO TY, DUAN ZJ. Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus vaccine expressing capsid protein of norovirus[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2022, 35(3): 257-262 (in Chinese).
- [33] 蒋燕军. 脊髓灰质炎病毒载体研究进展[J]. *国外医学 病毒学分册*, 2003(1): 13-17.
- JIANG YJ. Research progress of poliovirus vector[J]. *Foreign Medical Sciences*, 2003(1): 13-17 (in Chinese).
- [34] KOMOTO S, FUKUDA S, HATAZAWA R, MURATA T, TANIGUCHI K. Generation of recombinant rotaviruses from just 11 cDNAs encoding a viral genome[J]. *Virus Research*, 2020, 286: 198075.
- [35] 刘夏飞, 李慧莹, 杜文静, 柴萨萨, 朱武洋, 段招军. SA11 轮状病毒反向遗传学方法的初步应用[J]. *病毒学报*, 2022, 38(4): 850-857.
- LIU XF, LI HY, DU WJ, CHAI SS, ZHU WY, DUAN ZJ. Preliminary application of reverse genetics methods for rotavirus SA11[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2022, 38(4): 850-857 (in Chinese).
- [36] BAL J, LUONG NN, PARK J, SONG KD, JANG YS, KIM DH. Comparative immunogenicity of preparations of yeast-derived dengue oral vaccine candidate[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 1-14.
- [37] LEI H, GAO T, CEN QH. Cross-protective immunity of the haemagglutinin stalk domain presented on the surface of *Lactococcus lactis* against divergent influenza viruses in mice[J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 12-19.
- [38] ZHANG NR, JIANG SB, DU LY. Current advancements and potential strategies in the development of MERS-CoV vaccines[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2014, 13(6): 761-774.
- [39] BORGES O, CORDEIRO-DA-SILVA A, TAVARES J, SANTARÉM N, de SOUSA A, BORCHARD G, JUNGINGER HE. Immune response by nasal delivery of hepatitis B surface antigen and codelivery of a CpG ODN in alginate coated chitosan nanoparticles[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, 69(2): 405-416.
- [40] KARCH CP, BURKHARD P. Vaccine technologies: from whole organisms to rationally designed protein assemblies[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2016, 120: 1-14.
- [41] LLADSER A, PÁRRAGA M, QUEVEDO L, CARMEN MOLINA M, SILVA S, FERREIRA A, BILLETTA R, QUEST AFG. Naked DNA

- immunization as an approach to target the generic tumor antigen survivin induces humoral and cellular immune responses in mice[J]. *Immunobiology*, 2006, 211(1/2): 11-27.
- [42] ENSIGN LM, CONE R, HANES J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64(6): 557-570.
- [43] RENUKUNTLA J, VADLAPUDI AD, PATEL A, BODDU SHS, MITRA AK. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 447(1/2): 75-93.
- [44] SHAKYA AK, CHOWDHURY MYE, TAO WQ, GILL HS. Mucosal vaccine delivery: current state and a pediatric perspective[J]. *Journal of Controlled Release*, 2016, 240: 394-413.
- [45] MIQUEL-CLOPÉS A, BENTLEY EG, STEWART JP, CARDING SR. Mucosal vaccines and technology[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2019, 196(2): 205-214.
- [46] CAMPBELL JD. Development of the CpG adjuvant 1018: a case study[M]//*Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2016: 15-27.
- [47] FREYTAG LC, CLEMENTS JD. Mucosal adjuvants[M]//*Mucosal Immunology*. Amsterdam: Elsevier, 2015: 1183-1199.
- [48] van DISSEL JT, JOOSTEN SA, HOFF ST, SOONAWALA D, PRINS C, HOKEY DA, O'DEE DM, GRAVES A, THIERRY-CARSTENSEN B, ANDREASEN LV, RUHWALD M, de VISSER AW, AGGER EM, OTTENHOFF THM, KROMANN I, ANDERSEN P. A novel liposomal adjuvant system, CAF01, promotes long-lived *Mycobacterium tuberculosis*-specific T-cell responses in human[J]. *Vaccine*, 2014, 32(52): 7098-7107.
- [49] CHRISTENSEN D, MORTENSEN R, ROSENKRANDS I, DIETRICH J, ANDERSEN P. Vaccine-induced Th17 cells are established as resident memory cells in the lung and promote local IgA responses[J]. *Mucosal Immunology*, 2017, 10(1): 260-270.
- [50] ABRAHAM S, JUEL HB, BANG P, CHEESEMAN HM, DOHN RB, COLE T, KRISTIANSEN MP, KORSHOLM KS, LEWIS D, OLSEN AW, McFARLANE LR, DAY S, KNUDSEN S, MOEN K, RUHWALD M, KROMANN I, ANDERSEN P, SHATTOCK RJ, FOLLMANN F. Safety and immunogenicity of the chlamydia vaccine candidate CTH522 adjuvanted with CAF01 liposomes or aluminium hydroxide: a first-in-human, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2019, 19(10): 1091-1100.
- [51] CORREA VA, PORTILHO AI, de GASPARI E. Vaccines, adjuvants and key factors for mucosal immune response[J]. *Immunology*, 2022, 167(2): 124-138.
- [52] GARSIDE P, MOWAT AM. Oral tolerance[J]. *Seminars in Immunology*, 2001, 13(3): 177-185.
- [53] WILKHU J, McNEIL SE, KIRBY DJ, PERRIE Y. Formulation design considerations for oral vaccines[J]. *Therapeutic Delivery*, 2011, 2(9): 1141-1164.
- [54] MOWAT AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3(4): 331-341.
- [55] de JONG SE, OLIN A, PULENDRAN B. The impact of the microbiome on immunity to vaccination in humans[J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 28(2): 169-179.
- [56] CIABATTINI A, OLIVIERI R, LAZZERI E, MEDAGLINI D. Role of the microbiota in the modulation of vaccine immune responses[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1305.
- [57] CHEN XF, FERNANDO GJP, CRICHTON ML, FLAIM C, YUKIKO SR, FAIRMAID EJ, CORBETT HJ, PRIMIERO CA, ANSALDO AB, FRAZER IH, BROWN LE, KENDALL MAF. Improving the reach of vaccines to low-resource regions, with a needle-free vaccine delivery device and long-term thermostabilization[J]. *Journal of Controlled Release*, 2011, 152(3): 349-355.
- [58] HUDA MN, LEWIS Z, KALANETRA KM, RASHID M, AHMAD SM, RAQIB R, QADRI F, UNDERWOOD MA, MILLS DA, STEPHENSEN CB. Stool microbiota and vaccine responses of infants[J]. *Pediatrics*, 2014, 134(2): e362-e372.
- [59] HARRIS VC, HAAK BW, HANDLEY SA, JIANG BM, VELASQUEZ DE, HYKES BL Jr, DROIT L, BERBERS GAM, KEMPER EM, van LEEUWEN EMM, BOELE van HENS BROEK M, WIERSINGA WJ. Effect of antibiotic-mediated microbiome modulation on rotavirus vaccine immunogenicity: a human, randomized-control proof-of-concept trial[J]. *Cell Host & Microbe*, 2018, 24(2): 197-207.e4.
- [60] CHEN DX, KRISTENSEN D. Opportunities and challenges of developing thermostable vaccines[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2009, 8(5): 547-557.

(本文责编 郝丽芳)