

B 型流感嗜血杆菌疫苗的研究进展

王明清 管娇琼 朱文勇 廖国阳

摘要 B 型流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae* type b, Hib) 是小儿细菌性感染的主要元凶之一。据世界卫生组织 (WHO) 2012 年 4 月统计报道, 2008 年全世界因 Hib 感染死亡的 5 岁以下儿童人数为 20.3 万, 而目前预防 Hib 最有效的措施是接种 Hib 疫苗。本文回顾了 Hib 疫苗的发展, 对现有 Hib 结合疫苗的免疫原性、结合方式、结合策略进行综述。

关键词 B 型流感嗜血杆菌 结合疫苗 免疫原性 结合策略

中图分类号 R1 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.06.044

B 型流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae* type b, Hib) 为革兰阴性荚膜型致病菌。在 6 个荚膜型流感嗜血杆菌 (a、b、c、d、e、f) 中, Hib 致病力最强, Hib 可导致脑膜炎、肺炎、败血症、会厌炎、脊髓炎等多种侵袭性疾病。据世界卫生组织 (WHO) 2000 年统计结果显示, Hib 每年至少造成全世界 300 万例严重侵袭性疾病, 导致约 38.6 万儿童死亡^[1]。目前预防 Hib 感染的主要应对措施是接种疫苗, 随着 Hib 疫苗使用的不断扩大, Hib 疾病得到了很好的控制, 很多国家 Hib 的发生率都明显降低^[2~4]。据世界卫生组织 (WHO) 统计数据, 全球 5 岁以下死亡儿童中, 2009 年因为 Hib 导致的死亡人数占死亡总人数的 3% ~ 4% (http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/Pneumo_hib_2000/en/), 到 2012 年降为 2% (http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/Pneumo_hib/en/)。Hib 致病毒力主要是其荚膜多糖——多聚核糖基核糖醇磷酸盐 (polyriboseribitol phosphate, PRP), PRP 具有抗原性, 能在人体中诱发保护性免疫力, 但是 PRP 是一种非胸腺依赖性抗原, 虽然可以产生较弱的 IgM 型抗体, 但不产生免疫记忆, 对 18 个月龄以下的婴儿, 其 B 淋巴细胞尚未成熟, 不足以产生自我保护能力。为使机体获得更高的免疫效应, PRP 需要结合到一种载体蛋白上, 使 PRP

成为胸腺依赖性抗原, 这样其免疫机体后能对机体产生高效而又长久的保护力。到 2013 年为止全球已有 186 个国家引入 Hib 疫苗, 但 Hib 接种覆盖率仅为 52%。我国虽早已引入 Hib 疫苗, 但到目前为止尚未将 Hib 疫苗纳入国家计划免疫范围内。以下为 Hib 疫苗的发展历程及展望。

一、Hib 多糖疫苗

1970 年因为 Hib 荚膜多糖 PRP 能使机体产生免疫应答反应使 Hib 疫苗开始得到发展。1985 年美国芬兰首次以提纯的多糖 PRP 制备的 Hib 荚膜多糖疫苗用于儿童免疫, 因其产生的免疫保护性差, 所以 1988 年停止使用。基于之前的动物实验和一些经典的 Hib-PRP 多糖疫苗的临床试验表明, 体内最低抗 PRP 抗体水平浓度为 0.05 ~ 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 在这个抗体水平下, 机体将获得对 Hib 疾病的保护力^[5]。研究表明, 当人体内抗 PRP 抗体水平 $\geq 0.15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 可对机体产生短期免疫保护^[6]; 当初次免疫抗体水平 $\geq 1 \mu\text{g}/\text{ml}$, 并且 12 个月后抗体水平最低维持在 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 将对机体产生长期保护^[7]。在对 50000 名芬兰婴儿和 3 ~ 60 个月龄的儿童进行 Hib-PRP 多糖疫苗免疫临床试验研究中表明 Hib-PRP 疫苗在对 Hib 疾病的保护力上并不明显, 差异无统计学意义^[8,9]; 在对北美 18000 名 2 ~ 72 个月龄的孩子进行类似试验研究也得出类似的结果^[10], 由此可见单独的 Hib 多糖疫苗并不能对机体产生良好的保护效果。

二、现有 Hib 结合疫苗

1987 年第 1 代多糖结合疫苗研制成功, Hib 荚膜多糖与白喉类毒素 D 蛋白结合 (PRP-D) 疫苗, 开启了结合疫苗的新时代。1990 年后陆续有 4 种结合疫苗相继研制成功。一个好的结合疫苗应该包括以下几点: ①化学组成和结构清楚; ②生产过程中其物理

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (“863” 计划) 项目 (2012AA02A404); 科技部国际合作项目 (2010DF32890); 医学微生物学研究所科技重大专项课题 (2014IMBZDX02)

作者单位: 650550 昆明医科大学 (王明清、管娇琼); 650118 昆明, 中国医学科学院/北京协和医学院医学微生物学研究所 (朱文勇、廖国阳)

通讯作者: 廖国阳, 研究员, 博士生导师, 电子信箱: liaogy@imb-cams.com.cn

和化学性质稳定;③临床安全无内在毒性;④能够诱导机体产生高水平抗体或者调理素;⑤诱导产生相应的免疫记忆。

目前市场上的 Hib 主要由以下 4 种蛋白作为载体而合成的结合疫苗:白喉类毒素(diphtheria toxoid, DT),破伤风类毒素(tetanus toxoid, TT),无毒白喉类毒素变异体(CRM197)和脑膜炎球菌外膜蛋白复合体(OMP)。虽然以这些蛋白为载体的结合疫苗都具有较好的免疫原性,但是他们具有不同的免疫学特性。因此,在体内反应速度、产生抗体浓度、亲合力和接种后个体基因型的不同而存在差异^[11]。研究表明,即使在 3 次加强免疫后,PRP-D 所产生的抗体应答效应也是最低的^[12]。在另一个双盲实验中,随机对照实验比较 4 种疫苗的免疫原性和反应原性,4 种疫苗分别在婴儿 2、4 和 6 个月龄时各免疫 1 次,共免疫 3 次,结果显示 4 种不同的 PRP 结合疫苗的抗体水平如下:PRP-D ($0.28\mu\text{g/ml}$), PRP-OMP ($1.14\mu\text{g/ml}$), PRP-CRM197 ($3.08\mu\text{g/ml}$), PRP-T ($3.64\mu\text{g/ml}$),表明 PRP-D 所产生的抗体水平仍然是最低的。在免疫婴儿中 PRP-D 产生抗体浓度 $\geq 1\mu\text{g/ml}$,在所免疫的婴儿中占 29%;而另外 3 种疫苗分别为 PRP-OMP 为 55%, PRP-CRM197 为 75%, PRP-T 为 83%^[13]。由此可见 PRP-D 对婴儿不能产生较好的保护效果,即使在 3 剂加强免疫后,抗体水平 $\geq 1\mu\text{g/ml}$ 的比例也仅有 48%^[12]。

PRP-CRM197 在单剂免疫 2 个月龄的婴儿后就能刺激机体产生最高的抗体浓度^[13]。在一项对阿拉斯加本土 4 个月龄婴儿进行 4 种疫苗的比较试验中,PRP-CRM197 结合疫苗产生抗 PRP 抗体水平大于 $0.15\mu\text{g/ml}$ 为 91%,产生抗体浓度大于 $1\mu\text{g/ml}$ 为 57%^[14]。虽然 PRP-CRM197 在随后 4 个月、6 个月的加强免疫中,所产生的抗体水平比较缓慢,但是在一些 Hib 高发的地方(阿拉斯加州,澳大利亚土著居民等),因其初次免疫就产生大量抗体,这样就可以间接减少接种次数,降低经济负担,因此受到人们的喜欢^[15,16]。

一项研究比较了 3 种不同的 Hib 结合疫苗,结果显示,PRP-CRM197 结合疫苗所产生抗体亲合力比 PRP-OMP 高($P=0.000$),而 PRP-T 所产生的平均抗体亲合度低于 PRP-CRM197($P<0.05$),但是高于 PRP-OMP($P=0.000$)^[16]。在不同的疫苗中最高抗体亲合力是最低抗体亲和力的 7 倍($P=0.000$)^[17]。在另外一项对大鼠的研究中,PRP-CRM197 的杀菌效果和保护力度是 PRP-OMP 的 10

倍。相对于其他结合疫苗,PRP-T 在对婴儿进行 3 剂加强免疫后所产生的抗体水平是最高的,维持时间也最长^[14,18]。

三、新型 Hib 结合疫苗

2010 年有研究者研制出一种新型 Hib 结合疫苗 (PRP-T) 结合疫苗 LBVH0101 (韩国 LG Life Sciences 公司),它是通过化学合成法合成的天然 PRP 多聚物与破伤风类毒素蛋白结合的新型疫苗,并且经试验证明安全性和免疫原性较好^[19]。运用随机双盲实验比较新型 PRP-T 结合疫苗 LBVH0101 和葛兰素史克(GSK)生产的 PRP-T 疫苗的免疫原性。对韩国 185 名婴儿在出生后 2、4、6 个月分别接种两种疫苗,12~15 个月加强免疫 1 次后比较血清中抗体浓度和杀菌活性。其中接种 LBVH0101 疫苗第 2 次和第 3 次免疫后抗体浓度 $\geq 1\mu\text{g/ml}$ 的比例分别为 90.32% 和 100%,而 GSK 分别为 78.26% 和 96.74%。在第 2 次接种 LBVH0101 后抗体平均水平为 $7.34\mu\text{g/ml}$,GSK 为 $3.55\mu\text{g/ml}$ 。第 3 次接种 LBVH0101 后抗体平均水平为 $14.59\mu\text{g/ml}$,GSK 为 $12.15\mu\text{g/ml}$ 。在第 2 和第 3 次接种后 LBVH0101 杀菌活性分别为 35.05 和 116.27;GSK 分别为 53.76 和 79.64。并且该新型疫苗安全性良好,具有很好的运用前景^[19,20]。

四、Hib 多糖与蛋白的结合方式

在 PRP 多糖与蛋白的连接过程中,首先通过发酵得到所需多糖和载体蛋白,然后将他们分别纯化后作为结合起始物,而多糖可以通过化学合成法合成,蛋白也可以通过分子克隆而获得。多糖在与蛋白结合前必须先通过活化才能与蛋白结合。Hib 多糖与蛋白的结合过程见图 1。

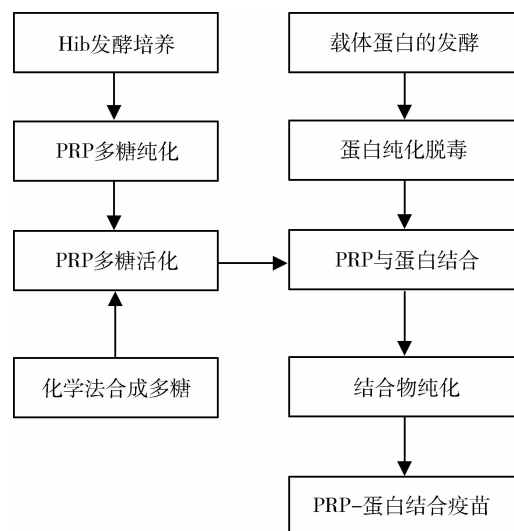


图 1 Hib 多糖 PRP 与载体蛋白结合的一般过程

多糖通过化学方式与蛋白连接,多糖必须被活化,当前用于激活 Hib 荚膜多糖 PRP 的方法主要有两种,一种是高碘酸钠氧化法(胺还原法)^[21],如图 2A 所示。另一种是氰基化作用^[22],如图 2B 所示。高碘酸盐使糖链上的两个临位羟基氧化成醛($C=O$),在这个过程中破坏了 $C=C$ 键之间的束缚。因此,在这个过程中依赖于糖的结构,高碘酸盐活化能使糖链断裂,打破糖的环形结构,不仅影响糖分子大小,进而影响后一步结合中对糖位点的识别;更重要的是可能会改变糖的一些重要表位,形成一些新的抗原表位,当结合成疫苗接种到人体后,产生新的抗原抗体应答,所以现在并不为人们所常用。

相对于高碘酸钠氧化法而言,氰化试剂用于活化糖可以产生较好的结果。1980 年 John Robbins 率先用 CNBr 活化法制备了第 1 个 Hib 结合疫苗,随后 1983 年 Beurret 等^[23]将 CNBr 活化法完善后制备出 PRP-T 结合疫苗。但是因为 CNBr 本身的毒性和在活化多糖过程中反应激烈,要求较高的 pH 值(10 以上),因此现在大多被反应相对温和的 CDAP 活化法所取代。使用 CNBr 活化后的多糖与 ADH 链接的效率低,PRP 多糖上有丰富的羟基,羟基氢与 CDAP 的氰基作用形成新的功能基团,该基团反应活性强,很容易与连接剂发生反应。CDAP 活化的 pH 值在 9~10 之间,比 CNBr 低,可以更好地保护糖结构,活化后的糖与交联剂-有机胺类形成稳定的异脲键,然后再与蛋白结合。

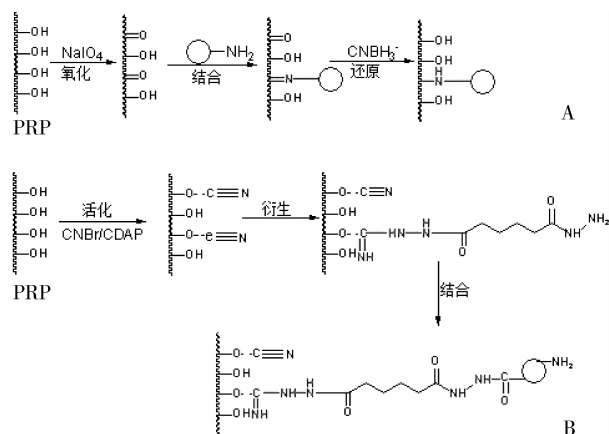


图 2 现有 Hib 疫苗的两种主要结合方法

图中圆圈代表载体蛋白

胍试剂是一种新型多糖-蛋白结合剂,由羰基和氨酰基缩合而成的化合物。在多糖和蛋白结合中具有较高的结合效率,不仅可以控制分子内相互交联,

避免有效位点的遮蔽,促进了蛋白与功能化多糖的共价结合;而且可以在一个很宽的 pH 值范围内进行结合反应。使用胍试剂制备的 14 型肺炎球菌结合疫苗免疫小鼠后,小鼠体内能产生较好的免疫应答反应,并且在初次免疫后就能产生较强的抗体水平。因此胍试剂具有很好的应用前景。除此之外,基于脑膜炎球菌多糖结合疫苗和肺炎球菌多糖结合疫苗的成功研究案例,酰胺化反应法、二硫键连接反应法或者通过双活化法等一系列方法可作为制备 Hib 多糖结合疫苗的良好参照。

五、展 望

Hib 危害巨大,但由于 Hib 疫苗成本高和人们对 Hib 认识的局限性等原因,目前为止,包括我国在内的大多数发展中国家都未将 Hib 疫苗纳入国家计划免疫范围内,导致 Hib 的预防受到限制。目前,除了 Hib 单价疫苗外,Hib 联合疫苗在国内外也有上市,如由 Hib、百白破、IPV 5 种疫苗合成的 5 价联合疫苗和由 Hib、脑膜炎、肺炎 3 种疫苗合成的 3 价联合疫苗等;联合疫苗的出现不仅使 Hib 疫苗进入一个崭新阶段,更使接种疫苗者减少了更多的痛苦。为降低 Hib 疫苗成本,研制出高产、高效的 Hib 疫苗,为联合疫苗和 Hib 疾病的控制打下坚实的基础,不仅需要提高 Hib 多糖的产量,而且要从增加结合疫苗的结合效率和增强其免疫原性等方面着手;所以就迫使我们从糖结构、载体蛋白选择、结合方式、免疫方法等诸多方面进入深入研究,研制出高产、高效的 Hib 疫苗,使人类尽早消除 Hib 感染的隐患。

参考文献

- Zheng D. *Haemophilus influenzae* type b and its conjugate vaccine [J]. *Journal of Clinical Pediatrics*, 2010, 28(6):591-593
- Briere EC, Jackson M. *Haemophilus influenzae* type b booster dose deferral, United States, 1998-2009 [J]. *Pediatrics*, 2012, 130(10):414-420
- Garcia S, Lagos R, Munoz A. *et al.* Impact of vaccination against *Haemophilus influenzae* type b with and without a booster dose on meningitis in four South American counties [J]. *Vaccine*, 2012, 30(2):486-492
- 胡莹,夏晓玲,黄海林,等.昆明地区儿童下呼吸道感染流感嗜血杆菌分离株的耐药性和血清分型研究 [J]. *实验与检验学*, 2013, 31(2):118-120
- Eskola J, Ward J, Dagan R, *et al.* Combined vaccination of *haemophilus influenzae* type b conjugate and diphtheria-tetanus-pertussis containing acellular pertussis [J]. *Lancet*, 1999, 354(9195):2063-2608
- 尹珊珊. Hib PRP-TT 结合疫苗的制备及其免疫原性研究 [D]. 延边:延边大学, 2009

(转第 137 页)

开展更大规模的临床研究进一步验证。老年心力衰竭合并 AECOPD 血清 PINP、 β -CTX 水平明显下降,患者骨质疏松症发病风险增大,血清 PINP、 β -CTX 水平与老年心力衰竭合并 AECOPD 密切相关,监测上述指标可对老年心力衰竭合并 COPD 病情及骨质疏松症发病风险进行监测与判断。

参考文献

- 1 Canpolat U, Turak O, Topaloglu S, *et al.* The Yin and Yang of dyspnea in the emergency department: heart failure or COPD? [J]. Clinics;Sao Paulo, 2013,68(9):1290-1291
- 2 Maclay JD, MacNee W. Cardiovascular disease in COPD: mechanisms[J]. Chest, 2013,143(3):798-807
- 3 Kelly E, Owen CA, Pinto-Plata V, *et al.* The role of systemic inflammatory biomarkers to predict mortality in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Expert Rev Respir Med, 2013,7(1):57-64
- 4 庞琪,刘晓菊,施凯,等.香烟烟雾对慢性阻塞性肺病患者单核细胞源性巨噬细胞吞噬功能的影响[J].中华医学杂志,2014,94(12):895-898
- 5 MacNee W. Systemic inflammatory biomarkers and co-morbidities of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Ann Med, 2013, 45(3): 291-300

(接第 157 页)

- 7 Perrett KP, John TM, Jin C, *et al.* Long-term persistence of immunity and B-cell memory following *haemophilus influenzae* type B conjugate vaccination in early childhood and response to booster[J]. Clin Infect Dis, 2014, 58(7):949-959
- 8 Robbins JB, Schneerson R, Parke JC. A review of the efficacy trials with *haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccines. In: Sell SH, ed. *Haemophilus influenzae*[M]. New York: Elsevier, 1981, 63(5):461-468
- 9 Parke JC Jr, Schlesselman JJ. Interim report of a controlled field trial of immunization with capsular polysaccharides of *haemophilus influenzae* type b and group C *Neisseria meningitidis* in Mecklenburg county, North Carolina (March 1974 - March 1976) [J]. J Infect Dis, 1977, 136(Suppl 1):S51-S56
- 10 Jackson C, Mann A, Manqani P, *et al.* Effectiveness of *Haemophilus influenzae* type b vaccines administered according to various schedules: systematic review and meta-analysis of observational data[J]. Pediatr Infect Dis J, 2013,32(11):1261-1269
- 11 Jun L, Yuquo C, Zhiquo W, *et al.* Assessment of immunogenicity and safety following primary and booster immunization with a CRM-197-conjugated *haemophilus influenzae* type B vaccine in healthy Chinese infants[J]. Int J Clin Pract, 2013, 67(10):971-978
- 12 Deck MD, Edward KM, Bradley R, *et al.* Comparative trial in infants of four conjugate *haemophilus influenzae* type b vaccines[J]. J Pediatr, 1992, 120(2 Pt 1):184-189
- 13 Hwang KW. *Haemophilus influenzae* type b (Hib) vaccine and its carrier proteins[J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(6):793-795
- 14 Miyazaki C. Hib vaccine[J]. Nihon Rinsho, 2008, 66(10):1985-9
- 15 Foresgren A, Riesbeck K, Janson H. Protein D of *haemophilus influenzae*: a protective nontypable H. Influenzae antigen and a carrier for

- 6 Pinto-Plata V, Casanova C, Müllerova H, *et al.* Inflammatory and repair serum biomarker pattern: association to clinical outcomes in COPD[J]. Respir Res, 2012,13:71
- 7 Calder L, Tierney S, Jiang Y, *et al.* Patient safety analysis of the ED care of patients with heart failure and COPD exacerbations: a multi-center prospective cohort study[J]. Am J Emerg Med, 2014,32(1): 29-35
- 8 常春,姚婉贞,方天舒,等.慢性阻塞性肺疾病住院患者合并症的分布及相关危险因素[J].中华医学杂志,2012,92(14):943-947
- 9 Engström G, Lindberg C, Gerhardsen de Verdier M, *et al.* Blood biomarkers and measures of pulmonary function - a study from the Swedish twin registry[J]. Respir Med, 2012,106(9):1250-1257
- 10 张莹,慕广建,施伟,等.老年心力衰竭合并慢性阻塞性肺病急性加重患者营养状态与免疫功能相关性分析[J].中华老年心脑血管病杂志,2013,15(7):704-706
- 11 Liu W, Ju CR, Chen RC, *et al.* Role of serum and induced sputum surfactant protein D in predicting the response to treatment in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Exp Ther Med, 2014, 8(4): 1313-1317
- 12 Agusti A, Sin DD. Biomarkers in COPD[J]. Clin Chest Med, 2014, 35(1):131-141
(收稿日期:2014-11-07)
(修回日期:2014-12-02)

- pneumococcal conjugate vaccines[J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(5): 726-731
- 16 Jun L, Yuquo C, Zhiquo W, *et al.* Assessment of immunogenicity and safety following primary and booster immunization with a CRM197-conjugate *Haemophilus influenzae* type B vaccine in healthy Chinese infants[J]. Int J Clin Pract, 2013, 67(10):971-978
- 17 Granoff DM, Anderson EL, Osterholm MT, *et al.* Differences in the immunogenicity of three *haemophilus influenzae* type b conjugate type b conjugate vaccine in infants[J]. J Pediatr, 1996, 55(5):516-520
- 18 Cuervo ML, Perez LR, Oviedo M, *et al.* Relationships among physico-chemical and biological tests for a synthetic Hib-TT conjugate vaccine[J]. Vaccine, 2007, 25(1):194-200
- 19 Kim N, Choi G, Lim CY, *et al.* An open-label, single-arm, phase I study to evaluate the safety and immunogenicity of LBFH0101, a new *haemophilus influenzae* type b teanus toxoid conjugate vaccine, in healthy adult volunteers[J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(6):919-924
- 20 Kyung HK, Kim YK, Nan HK, *et al.* Immunogenicity and safety of LBFH0101, a new *Haemophilus influenzae* type b teanus toxoid conjugate vaccine, compared with HiberixTM in Korean infants and child: A randomized trial[J]. Vaccine, 2012, 30(5):1886-1894
- 21 Ellis RW, Granoff DM. Development and clinical uses of *haemophilus* b conjugate vaccines[M]. New York: Marcel Dekker, 1994: 37-69
- 22 Lees A, Nelson BL, Mond JJ. Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents[J]. Vaccine, 1996, 14(3):190-198
- 23 Beurret M, Hamidi A, Kreeftenberg H. Development and technology transfer of *haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines for developing countries[J]. Vaccine, 2012, 30(33):4897-906
(收稿日期:2014-11-19)
(修回日期:2014-12-03)