

- monastrol is an allosteric inhibitor of the mitotic kinesin Eg5[J]. *Chem Biol*, 2002, 9(9): 989-996.
- [11] Nowicki MO, Pawlowski P, Fischer T, et al. Chronic myelogenous leukemia molecular signature [J]. *Oncogene*, 2003, 22(25): 3952-3963.
- [12] Liu M, Wang X, Yang Y, et al. Ectopic expression of the microtubule-dependent motor protein Eg5 promotes pancreatic tumorigenesis [J]. *J Pathol*, 2010, 221(2): 221-228.
- [13] DeBonis S, Skoufias DA, Lebeau L, et al. In vitro screening for inhibitors of the human mitotic kinesin Eg5 with antimitotic and antitumor activities [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(9): 1079-1090.
- [14] Debonis S, Skoufias DA, Indorato RL, et al. Structure-activity relationship of S-trityl-L-cysteine analogues as inhibitors of the human mitotic kinesin Eg5 [J]. *J Med Chem*, 2008, 51(5): 1115-1125.
- [15] Kantarjian HM, Padmanabhan S, Stock W, et al. Phase I/II multicenter study to assess the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of AZD4877 in patients with refractory acute myeloid leukemia [J]. *Invest New Drugs*, 2012, 30(3): 1107-1115.
- [16] Infante JR, Kurzrock R, Spratlin J, et al. A Phase I study to assess the safety, tolerability, and pharmacokinetics of AZD4877, an intravenous Eg5 inhibitor in patients with advanced solid tumors [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012, 69(1): 165-172.
- [17] Esaki T, Seto T, Ariyama H, et al. Phase I Study to Assess the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of AZD4877 in Japanese Patients with Solid Tumors [J]. *Arch Drug Inf*, 2011, 4(2): 23-31.
- [18] Luo X, Shu M, Wang Y, et al. 3D-QSAR studies of dihydropyrazole and dihydropyrrole derivatives as inhibitors of human mitotic kinesin Eg5 based on molecular docking [J]. *Molecules*, 2012, 17(2): 2015-2029.
- [19] Jiang C, Yang L, Wu WT, et al. De novo design, synthesis and biological evaluation of 1, 4-dihydroquinolin-4-ones and 1, 2, 3, 4-tetrahydroquinazolin-4-ones as potent kinesin spindle protein (KSP) inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19(18): 5612-5627.
- [20] Lad L, Luo L, Carson JD, et al. Mechanism of inhibition of human KSP by ispinesib [J]. *Biochemistry*, 2008, 47(11): 3576-3585.
- [21] Purcell JW, Davis J, Reddy M, et al. Activity of the kinesin spindle protein inhibitor ispinesib (SB-715992) in models of breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(2): 566-576.
- [22] Burris HA, Jones SF, Williams DD, et al. A phase I study of ispinesib, a kinesin spindle protein inhibitor, administered weekly for three consecutive weeks of a 28-day cycle in patients with solid tumors [J]. *Invest New Drugs*, 2011, 29(3): 467-472.
- [23] Knox JJ, Gill S, Synold TW, et al. A phase II and pharmacokinetic study of SB-715992, in patients with metastatic hepatocellular carcinoma: a study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC CTG IND. 168) [J]. *Invest New Drugs*, 2008, 26(3): 265-272.
- [24] Theoclitou ME, Aquila B, Block MH, et al. Discovery of (+)-N-(3-aminopropyl)-N-[1-(5-benzyl-3-methyl-4-oxo-1,2-thiazolo[5,4-d]pyrimidin-6-yl)-2-methylpropyl]-4-methylbenzamide (AZD4877), a kinesin spindle protein inhibitor and potential anticancer agent [J]. *J Med Chem*, 2011, 54(19): 6734-6750.
- [25] Gerecitano JF, Stephenson JJ, Lewis NL, et al. A Phase I trial of the kinesin spindle protein (Eg5) inhibitor AZD4877 in patients with solid and lymphoid malignancies [J]. *Invest New Drugs*, 2013, 31(2): 355-362.
- [26] Rath O, Kozielski F. Kinesins and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(8): 527-539.
- [27] Cox CD, Coleman PJ, Breslin MJ, et al. Kinesin spindle protein (KSP) inhibitors 9: Discovery of (2S)-4-(2,5-difluorophenyl)-n-[(3R, 4S)-3-fluoro-1-methylpiperidin-4-yl]-2-(hydroxymethyl)-N-methyl-2-phenyl-2,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxamide (MK-0731) for the treatment of taxane-refractory cancer [J]. *J Med Chem*, 2008, 51(14): 4239-4252.
- [28] Holen K, Paola R, Liu G, et al. A phase I trial of MK-0731, a kinesin spindle protein (KSP) inhibitor, in patients with solid tumors [J]. *Invest New Drugs*, 2012, 30(3): 1088-1095.

(收稿日期: 2013-01-08 修回日期: 2013-03-22)

• 综 述 •

## 细菌疫苗的发展历史及研究现状

傅国平 综述, 张雪梅<sup>△</sup> 审校

(重庆医科大学临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室 400016)

关键词: 疫苗; 细菌; 综述

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.26.039

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)26-3174-04

细菌感染性疾病是一类严重危害人类健康的疾病, 目前,

临床上用于治疗细菌感染性疾病的药物主要为抗菌药物, 但抗

菌药物的滥用导致耐药菌尤其是多重耐药菌迅速增加,使其不能有效控制感染,成为临床处理的难题,也给社会带来了沉重的经济负担<sup>[1]</sup>。细菌疫苗能提高易感人群对病原菌的抵抗力,降低病原菌感染的发生率,有利于感染性疾病的控制,所以,开发相关细菌疫苗一直是该领域的研究热点。实践证明,细菌疫苗在过去一个多世纪的发展中取得了辉煌的成果,对预防细菌感染性疾病发挥了巨大作用。随着免疫学、分子生物学等科学的不断进展,细菌疫苗的类型、组成都发生了很大变化,出现了组分疫苗、DNA 疫苗等新型疫苗,本文就细菌疫苗的发展历史及研究现状作一综述。

## 1 细菌疫苗的发展历史

疫苗的概念是 18 世纪末 Jenner 发现事先接种牛痘能够阻止天花发生之后被首先提出来的,但在其后的 100 多年间却没有新的疫苗出现。19 世纪末,法国微生物学家巴斯德发现将在人工培养基上培养传代后的鸡霍乱弧菌注射小鸡后不能使小鸡致病,并且再用野生的霍乱弧菌攻击这些已被注射过的小鸡,他们也不会发生霍乱。1881 年,巴斯德据此将炭疽杆菌在 42~43 °C 的环境下培养 2 周后,制成人工减毒炭疽活疫苗,随后进行的动物实验结果表明炭疽疫苗对动物具有保护作用。这一划时代的研究结果标志着细菌疫苗的问世,奠定了疫苗学的基础<sup>[2]</sup>。

19 世纪末至 20 世纪初,细菌疫苗是疫苗学的主要研究领域。除巴斯德外,这一时期内还涌现出 Emil、Kolle、Calmette、Guerin 等一大批疫苗学先驱。Emil 将白喉外毒素给动物免疫,收集动物血清,发现其中存在一种能中和白喉外毒素的物质,称为抗毒素。后来,他又将白喉杆菌外毒素和破伤风杆菌外毒素经甲醛处理脱毒成为类毒素,以类毒素作为疫苗预防接种得到了满意的效果。这是免疫治疗的开始,为此他获得了 1901 年的第一个诺贝尔医学奖。Kolle 于 1896 年将霍乱弧菌加热灭活,制备成灭活疫苗。1902 年,此疫苗在日本霍乱流行区大规模使用,取得了很好的保护效果。Calmette 将一株牛型结核杆菌在甘油胆汁马铃薯培养基连续培养 13 年传代 213 代,于 1921 年获得减毒的卡介苗(BCG)。Pereira 等<sup>[3]</sup>研究发现给学龄期儿童接种 BCG 能显著减少结核分支杆菌感染。除了上述疫苗外,百日咳杆菌、伤寒杆菌、鼠疫耶尔森菌等细菌疫苗也于这一时期成功制备。

## 2 现代新型细菌疫苗

20 世纪后期至今,分子生物学、免疫学、微生物学等相关科学发展迅猛。以此为基础,细菌疫苗又有了较大的发展,出现了组分疫苗、DNA 疫苗等多种现代新型细菌疫苗,这为研发及生产更加安全、性质稳定、保护性好的细菌疫苗带来新的希望。现将这几种现代新型疫苗介绍如下。

**2.1 组分疫苗** 经典的减毒活疫苗和灭活疫苗是细菌疫苗研制的基础,但是这类疫苗成分复杂,存在可能引起免疫副反应的物质,其安全性及有效性都有待进一步提高。随着科技的进步,人们对各致病菌具体免疫组分的认识不断深入,组分疫苗的研制因此兴起并迅速成为细菌疫苗领域的研究热点。目前,组分疫苗种类繁多,就其实质而言,可以划分为以多糖为基础的组分疫苗和以蛋白质为基础的组分疫苗,但目前市面上使用的主是以多糖为基础的组分疫苗。1974 年被批准生产的 A 群流脑多糖疫苗是第一个细菌组分疫苗。1977 年肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, S. pn)14 价多糖疫苗投入生产,

1983 年 WHO 专家建议用新研制成功的肺炎链球菌 23 价多糖疫苗代替 14 价多糖疫苗,该疫苗对所覆盖血清型的 S. pn 感染具有一定的保护作用,但是由于 S. pn 多糖荚膜分子量小,属于非 T 细胞依耐性抗原,对免疫系统发育不完善 2 岁以下小儿保护性弱,故存在一定不足。在这一时期,人们发现多糖及蛋白质的结合会激发 T 细胞免疫来帮助刚出生的小动物产生免疫性,这一伟大发现打开了研发多糖蛋白结合疫苗的大门。依据多糖蛋白结合技术研发出的以破伤风类毒素为载体的 b 型流感嗜血杆菌多糖蛋白结合疫苗(PRPT)对所有 b 型流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae* type b, Hib)侵袭性疾病的预防效果达 95%,对 Hib 肺炎的预防效果甚至达到了 100%<sup>[4]</sup>。目前,肺炎链球菌荚膜多糖-CRM197 疫苗、A 群及 C 群流脑荚膜多糖蛋白结合疫苗已在临床上广泛应用。

许多细菌在生长过程中产生大量蛋白质,其中某些蛋白质在细菌的黏附、侵袭过程中发挥重要作用。绝大多数的蛋白质抗原属于 T 细胞依赖(TD)抗原,含有 T 细胞和 B 细胞表位,能刺激机体产生体液和细胞免疫,具有免疫记忆功能。随着蛋白质组学和基因组学技术的进步,大量的蛋白质和其编码基因被筛选出来,蛋白组分疫苗由此成为细菌疫苗的新的研究方向。1982 年,Valenzuela 将乙型肝炎病毒表面抗原基因片段重组到酿酒酵母中,重组后的酵母成功表达乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)。这一突破性的技术为研制蛋白疫苗奠定了基础。1986 年 9 月,默克公司生产的重组酵母乙肝疫苗获得美国 FDA 的批准成功上市,这是第一个也是目前使用最成功的蛋白疫苗。1998 年 12 月,葛兰素史克公司开发的重组伯氏疏螺旋体表面蛋白 A(OspA)疫苗得到美国 FDA 的批准上市。目前,霍乱弧菌、伤寒杆菌、痢疾杆菌的蛋白疫苗的开发已进入动物实验阶段,幽门螺杆菌的蛋白疫苗已进入 III 期临床实验阶段。相信在不久的将来会有不少细菌的蛋白疫苗问世。

**2.2 DNA 疫苗** DNA 疫苗安全性好,制备、储存方便,可在同一个质粒载体上克隆多个目的基因从而达到一种疫苗预防多种疾病的效果,更重要的是它模拟了自然状态下机体感染外源性病原微生物后在体内表达抗原及诱导免疫反应的过程。1989 年,Wolff 将 DNA 质粒注射到小鼠的骨骼肌后,意外地发现外源基因可以在骨骼肌细胞中表达,且表达产物的活性可长达 2 个月。1992 年,Tang 等将 CMV 启动子表达的人生长激素(hGH)基因以基因枪注射的方式注入小鼠耳内,3~6 周后在小鼠体内检测到高滴度的抗 hGH 特异性抗体,上述研究直接导致了 DNA 疫苗的诞生。目前,已有多种细菌 DNA 疫苗的研究正在全球范围内展开。

## 3 几种重要细菌疫苗的研究现状

**3.1 肺炎链球菌** 肺炎链球菌(S. pn)可引起支气管炎、肺炎、化脓性脑膜炎、中耳炎等疾病,每年约有 100 万 5 岁以下儿童死于肺炎链球菌感染引起的各种疾病<sup>[5]</sup>。在 7 价多糖蛋白结合疫苗的基础上,惠氏公司研发的 13 价结合疫苗已于 2010 年在美国上市,它可以抵御 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F 这 13 种血清型的肺炎链球菌感染,但是其价格昂贵。

蛋白疫苗是目前肺炎链球菌疫苗的研究热点。现有的研究显示,肺炎链球菌表面蛋白 A(PspA)、溶血素(ply)、胆碱结合蛋白 A(CbpA)、表面黏附素 A(PsaA)、热休克蛋白 100 家族成员 ClpP 等多种蛋白质都是有希望的疫苗候选蛋白。Seo

SU 等人构建了重组 PspA 的减毒沙门杆菌疫苗 (RASV), 并发现口服单次剂量的 RASV 对继发于流感的肺炎链球菌感染的小鼠有保护作用, 可减轻其肺部炎症<sup>[6]</sup>。Salha 等将一种新的脱毒 ply 衍生物 (PlyD1) 免疫小鼠后发现小鼠可以抵御经鼻的致死剂量的肺炎链球菌的攻击。用特异性的 PlyD1 多克隆抗血清预先处理小鼠后, 可以减轻 ply 导致的肺部损害, 并发现小鼠肺部中性粒细胞浸润增加, IL-6 水平增高, 这提示 PlyD1 的保护作用可能与产生的特异性抗 PlyD1 抗体有关<sup>[7]</sup>。Cao 等<sup>[8]</sup>的研究发现 PspA、PspC 和 ClpP 及其多克隆抗体血清在抵抗肺炎链球菌 TIGRE4 时具有很强的免疫保护作用。

**3.2 结核分支杆菌** 结核分支杆菌是一种顽固的病原体, 越来越多耐药菌株的出现则给结核病的控制带来了巨大的挑战。卡介苗 (BCG) 作为目前惟一的结核病疫苗而被广泛使用, 但是 BCG 只能预防原发性结核病, 对已感染结核分支杆菌的患者没有保护作用, 且对成人肺结核的保护效率较差, 开发新的有效的结核疫苗势在必行。

Ag85 是一种已被证实具有保护作用的 Mtb 分泌蛋白, 具有分支杆菌转移酶活性。重组 Ag85A 的痘苗病毒 (MVA85A) 在人体 I 期临床试验中取得了良好的安全性和耐受性, 可以用于强化 BCG 免疫, 目前已进入 II 期临床试验<sup>[9]</sup>。Sugawara 等<sup>[10]</sup>将 H37Rv 株的 Ag85A 基因重组人卡介苗, 构建的重组卡介苗 (rBCG-Ag85A) 对恒河猴有很好的保护作用。Liang 等<sup>[11]</sup>将编码 Ag85A/B 的基因片段克隆于质粒 pVAX1 后通过肌肉注射的方法免疫小鼠, 发现试验组小鼠能产生更高水平的 INF $\gamma$ , 血液中 Th1 和 Tc1 细胞更多, Th1/Th2 和 Tc1/Tc2 比值更大, 且能显著减少实验组小鼠肺部结核杆菌定植量, 减轻肺部损伤。

MPT64 是另一种 MTB 分泌蛋白, 具有超氧化物歧化酶活性, 也可诱导单核细胞增殖并产生高水平的干扰素  $\gamma$ 。Bao 等<sup>[12]</sup>从结核分支杆菌 H37Rv 基因组中扩增出 Ag85A/MPT-64 编码基因, 转化 BL21 感受态细胞构建真核表达载体, 将阳性克隆重组质粒肌注免疫 BALB/c 小鼠, 3 周后用 ELISPOT 法检测到抗 Ag85A/MPT-64 抗体平均滴度为 1 : 1 000, 这一研究表明 Ag85A/MPT-64DNA 疫苗对结核病的防治有一定作用。德国马普研究所设计的重组结核疫苗 rBCG $\Delta$ ureC::hly (+) 剔除了尿素酶 ureC 基因, 同时能表达来自李斯特菌的溶菌素 hly 基因, 从而大大提高了 BCG 的免疫效能, 而这可能与该疫苗提高了巨噬细胞的凋亡水平有关<sup>[13]</sup>。

**3.3 流感嗜血杆菌** 流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*, Hi) 根据有无荚膜分为荚膜型和无荚膜型 (Nontypeable *Haemophilus influenzae*, NTHi) 两类, 荚膜型中以 b 型 (Hib) 致病力最强, 但是随着 Hib 荚膜多糖疫苗及荚膜多糖蛋白结合疫苗的应用, Hib 所致疾病的发病率迅速下降。目前, 在 Hi 引起的感染中最多见的是 NTHi, 占 70% 以上, 成为导致肺炎、COPD 急性加重、脑膜炎、中耳炎的主要致病菌。

目前, 流感嗜血杆菌的蛋白疫苗也在开发中, 如在流感嗜血杆菌中高度保守的外膜蛋白 P6, 其对维持 NTHi 的结构和功能起着重要作用<sup>[14]</sup>。Kodama 等<sup>[15]</sup>在小鼠鼻内接种 P6 蛋白, 然后从中耳膜内分离单个核细胞, 通过对这些单个核细胞的分析发现, P6 特异性 IgA 产生细胞、记忆性 T 细胞数量明显增多, 而且 NKT 细胞、树突状细胞活化及增殖水平增加。另外, Roier S 等人从不同 NTHi 菌株中获得外膜囊泡 (OM-

Vs), 经鼻免疫 BALB/c 小鼠后产生了复杂的体液和黏膜免疫反应, 免疫沉淀法发现其中最重要的免疫原性蛋白质有血红素结合蛋白 A、外膜蛋白 P1、P2、P5、P6、保护性表面抗原 D15 等等。这一研究表明 NTHi 外膜囊泡有成为 NTHi 疫苗的潜力<sup>[16]</sup>。

**3.4 幽门螺杆菌** 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是一种微需氧、螺旋状的革兰阴性杆菌。1983 年, Warren 和 Marshall 从患有慢性胃炎患者的胃黏膜活检组织中发现 Hp。现已明确 Hp 是慢性胃炎、消化性溃疡的主要致病因素, 且可导致胃癌等恶性肿瘤的发生。

Flach 等<sup>[17]</sup>将 Hp 超声破碎物加脱毒霍乱毒素 (CT) 制成疫苗口服免疫 C57BL/6 小鼠, 然后用活菌做攻毒实验, 于攻击后第 3、7、14、21 天分别取小鼠胃组织, RT-PCR 结果显示胃组织中多种细胞趋化因子 (CCL8、CXCL10、CXCL11、CXCL2、CXCL5、CCR3) 及其受体基因表达增加, 流式细胞分析显示组织中 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、树突状细胞增多。这一研究提示口服免疫 Hp 疫苗后可以通过增加细胞趋化因子的表达水平募集免疫细胞从而发挥免疫保护作用。

尿素酶 (Ure) 是 Hp 中含量最多的蛋白质, 由 A、B 2 个结构亚单位和辅助蛋白组成, 可抵抗胃酸的保护作用, 是 Hp 重要的定植因子和毒力因子。重组 Ure 蛋白的细菌载体疫苗如减毒沙门杆菌疫苗、大肠埃希菌载体疫苗、乳酸菌载体疫苗在多个动物实验模型中均表现出一定的免疫保护作用, 但是其表达的蛋白质相对分子质量较大, 特异性及免疫性较差。Guo 等<sup>[18]</sup>用尿素酶 A 亚单位表位 (UreA (183-203)) 辅以黏膜佐剂霍乱毒素 B (CTB) 制成表位疫苗 CTB-UA, 纯化的 CTB-UA 蛋白经腹腔免疫 BALB/c 小鼠后发现小鼠可以产生特异性的抗 Ure 的中和性抗体。Zhou 等<sup>[19]</sup>设计和构建了一个多表位疫苗, 包括 UreB 的 3 个限制性 Th 表位 (U546-561, U229-244, 和 U237-251)、一个 UreB 的 B 细胞表位 U327-334、一个黏附素 A (HpaA) 的 B 细胞表位 (H132-141), 发现该多表位疫苗能显著的降低 Hp 的定植作用, 并且能产生 IgG、SIgA 抗体和抗原特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞的应答。

抗氧化酶如过氧化氢酶 (KatA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 已被证实是具有免疫保护性的抗原, Stent A 等人发现 Hp 的巯基过氧化物酶 (Thx) 也具有免疫保护作用, 他推测抗氧化系统对 Hp 疫苗的发展将起重要作用<sup>[20]</sup>。Hp 外膜前炎症蛋白 (OipA) 主要存在于高毒力的 Hp 菌株, Chen 等<sup>[21]</sup>通过修改 oipA 基因 GC 含量、添加 Kozak 前导序列而对 oipA 基因序列进行密码子优化, 构建携带 oipA 优化基因的真核表达载体 SL7207/poipA-opt 免疫被 Hp 感染的小鼠, 发现其能明显减少小鼠胃部 Hp 的定植量, 并产生高滴度的抗 OipA 特异性抗体。

#### 4 小 结

自 1881 年巴斯德研制成功第一个人工减毒炭疽活疫苗以来, 细菌疫苗的广泛应用给人类的健康带来了极大的帮助。新型疫苗中较成熟的是细菌多糖疫苗或多糖蛋白结合疫苗。基因重组技术的成熟使蛋白疫苗成为细菌疫苗的重要发展方向。DNA 疫苗具有安全、免疫性好、制备及储存方便等众多优点, 应用前景极其诱人, 但目前尚处于探索阶段。目前, 多种新型细菌疫苗即将上市, 这将为控制多种病原菌引起的感染性疾病提供更有效的武器。

## 参考文献:

- [1] Rosen T. Antibiotic resistance; an editorial review with recommendations[J]. *J Drugs Dermatol*, 2011, 10(7): 724-733.
- [2] Hillman MR. Vaccines in historic evolution and perspective; a narrative of vaccine discoveries[J]. *Vaccine*, 2000, 18(15): 1346-1347.
- [3] Pereira SM, Barreto ML, Pilger D, et al. Effectiveness and cost-effectiveness of first BCG vaccination against tuberculosis in school-age children without previous tuberculin test (BCG-REVAC trial): a cluster-randomised trial[J]. *Lancet Infect Dis*, 2012, 12(4): 300-306.
- [4] Mulholland K, Hilton S, Adegbola R, et al. Randomised trial of Haemophilus influenzae type b tetanus protein conjugate vaccine for prevention of pneumonia and meningitis in Gambian infants[J]. *Lancet*, 1997, 349(9060): 1191-1197.
- [5] Mahoney RT, Krattiger A, Clemens JD, et al. The introduction of new vaccines into developing countries IV: Global Access Strategies[J]. *Vaccine*, 2007, 25(20): 4003-4010.
- [6] Seo SU, Kim JJ, Yang H, et al. Effective protection against secondary pneumococcal pneumonia by oral vaccination with attenuated Salmonella delivering PspA antigen in mice[J]. *Vaccine*, 2012, 30(48): 6816-6823.
- [7] Salha D, Szeto J, Myers L, et al. Neutralizing antibodies elicited by a novel detoxified pneumolysin derivative, PlyD1, provide protection against both pneumococcal infection and lung injury[J]. *Infect Immun*, 2012, 80(6): 2212-2220.
- [8] Cao J, Chen DP, Yin YB, et al. Enhanced protection against pneumococcal infection elicited by immunization with the combination of PspA, PspC, and ClpP[J]. *Vaccine*, 2007, 25(27): 4996-5005.
- [9] Scriba TJ, Tameris M, Mansoor N, et al. Modified vaccinia Ankara-expressing Ag85A, a novel tuberculosis vaccine, is safe in adolescents and children, and induces polyfunctional CD4 T cells[J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40(1): 279-290.
- [10] Sugawara I, Sun L, Mizuno S, et al. Protective efficacy of recombinant BCG Tokyo (Ag85A) in rhesus monkeys infected intratracheally with H37 Rv Mycobacterium tuberculosis[J]. *Tuberculosis*, 2009, 89(1): 62-67.
- [11] Liang Y, Wu X, Zhang J, et al. Immunogenicity and therapeutic effects of Ag85A/B chimeric DNA vaccine in mice infected with Mycobacterium tuberculosis[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2012, 66(3): 419-426.
- [12] Bao H, Yu T, Jin Y, et al. Construction of a DNA vaccine based on the Mycobacterium tuberculosis Ag85A/MPT64 fusion gene and evaluation of its immunogenicity[J]. *Mol Med Report*, 2012, 6(6): 1375-1378.
- [13] Farinacci M, Weber S, Kaufmann SH. The recombinant tuberculosis vaccine rBCG ΔureC; hly(+) induces apoptotic vesicles for improved priming of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells[J]. *Vaccine*, 2012, 30(52): 7608-7614.
- [14] Murphy TF, Kirkham C, Lesse AJ. Construction of a mutant and characterization of the role of the vaccine antigen P6 in outer membrane integrity of nontypeable Haemophilus influenzae[J]. *Infect Immun*, 2006, 74(9): 5169-5176.
- [15] Kodama S, Hirano T, Noda K, et al. A single nasal dose of fms-like tyrosine kinase receptor-3 ligand, but not peritoneal application, enhances nontypeable Haemophilus influenzae-specific long-term mucosal immune responses in the nasopharynx[J]. *Vaccine*, 2010, 28(13): 2510-2516.
- [16] Roier S, Leitner DR, Iwashkiw J, et al. Intranasal immunization with nontypeable Haemophilus influenzae outer membrane vesicles induces cross-protective immunity in mice[J]. *Plos One*, 2012, 7(8): 42664.
- [17] Flach CF, Mozer M, Sundquist M, et al. Mucosal vaccination increases local chemokine production attracting immune cells to the stomach mucosa of Helicobacter pylori infected mice[J]. *Vaccine*, 2012, 30(9): 1636-1643.
- [18] Guo L, Li X, Tang F, et al. Immunological features and the ability of inhibitory effects on enzymatic activity of an epitope vaccine composed of cholera toxin B subunit and B cell epitope from Helicobacter pylori urease A subunit[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(5): 1937-1945.
- [19] Zhou WY, Shi Y, Wu C, et al. Therapeutic efficacy of a multi-epitope vaccine against Helicobacter pylori infection in BALB/c mice model[J]. *Vaccine*, 2009, 27(36): 5013-5019.
- [20] Stent A, Every AL, Ng GZ, et al. Helicobacter pylori thioperoxidase as a protective antigen in single- and multi-component vaccines[J]. *Vaccine*, 2012, 30(50): 7214-7220.
- [21] Chen J, Lin M, Li N, et al. Therapeutic vaccination with Salmonella-delivered codon-optimized outer inflammatory protein DNA vaccine enhances protection in Helicobacter pylori infected mice[J]. *Vaccine*, 2012, 30(36): 5310-5315.