
目的：进行 FORT 有限公司生产包含不同血清型流感病毒的 Ultrix 疫苗的临床研究：菌株包括 H1N1 A/California/7/2009 (H1N1) pdm 09、H3N2 A/HongKong/4801/2014、NYMCX-263B (15/184) 和 B/Brisbane/60/2008 NYMCBX-35 (15/300) Victorialineage (2016 年流行病季节)、并 H1N1 A/Michigan/45/2015 NYMCX-275 (16/248)、H3N2 A/HongKong/4801/2014、NYMCX-263B(15/184) 及 B/Brisbane/60/2008 NYMCBX-35 (15/300) Victorialineage (2017 年流行病季节)。

材料与方法。免疫原性主要参数的研究包括测定平均几何抗体效价、血清保护和血清转换水平，以及免疫接种后抗体效价增加 4 倍的个体相对数量。用显微法测定了血凝反应的免疫原性。用与疫苗株相同的流感病毒血清型抗原检测血清。

结果。Ultrix 的血清保护率达到 91.7—95.8% (2016 年) 和 93.8—97.9% (2017 年)。含有 H1N1A/California 血清型的 Ultrix 疫苗 6 个月后可达到最大的血清保护水平。在 2016 年和 2017 年接种疫苗期间，所有疫苗株的平均 anti-HA 几何水平增加了 2.55-4.36 倍，在 2016 年首次免疫 21 天后，超过 70% 的志愿者的抗体滴度增加了 4 倍。

结论。包含不同血清型流感病毒的 Ultrix 疫苗的临床研究结果证明免疫原性参数符合专利药品委员会 (CPMP/MEA、CPMP/EWP/1045/01) 及俄罗斯联邦国家药典第十三版 (SP RF XIII) 的要求。

关键词：Ultrix 疫苗；血清保护；血清转化；免疫原性；抗原印记

Aim. Clinical trial of Ultrix vaccine of OOO FORT manufacture containing different serotypes of influenza virus: H1N1 A/California/7/2009 (H1N1) pdm 09, H3N2 A/HongKong/ 4801/2014, NYMCX-263B(15/184) and B/Brisbane/60/2008 NYMCBX-35 (15/300) Victo-rialineage strains (epidemiological season of 2016) and H1N1 A/Michigan/45/2015 NYMCX-275 (16/248), H3N2 A/HongKong/4801/2014, NYMCX-263B(15/184) иB/Brisbane/60/2008 NYMCBX-35 (15/300) Victorialineage strains (epidemiological season of 2017).

Materials and Methods. A study of the basic parameters of immunogenicity included determination of the geometric mean value of the antibody titer, of seroprotection and seroconversion and of relative number of individuals with 4-fold increase in the antibody titer after vaccination. Immunogenicity was determined by a micromethod in hemagglutination inhibition reaction. Sera were tested with diagnosticums obtained from serotypes of influenza virus identical to vaccinal strains.

Results. The level of seroprotection with Ultrix made 91.7-95.8% (2016) and 93.8-97.9% (2017). The maximal level of seroprotection was achieved in 6 months after vaccination with Ultrix containing H1N1A/California serotype. 2.55-4.36-Fold increase in the geometric mean value of anti-HA to all vaccinal strains was found in vaccination in 2016 and 2017, and 4-fold increase in antibody titer in more than 70% of volunteers on the 21st day after the first immunization in 2016.

Conclusion. The obtained results of clinical trials of Ultrix vaccine with different antigenic composition confirms the correspondence of the immunogenicity parameters of the drug to the requirements of the Committee for Proprietary Medical Products (CPMPEMEA, CPMP/EWP/1045/01) and of State Pharmacopoeia of RF of XIII edition (SP SP XIII).

Keywords: *Ultrix vaccine; seroprotection; seroconversion; immunogenicity; antigenic imprinting.*

流感仍然是最常见的传染病之一，发生危及生命的并发症的风险很高[1-3]。新的流感病毒血清学变体的出现，如在 2009 年出现菌株 A/H1N1/A/California/7/ 2009 导致温和性及严重流感的发展[1,4]在严重免疫抑制的背景下，出现多器官功能衰竭[5]，并伴有高死亡率[4]。目前，降低感染和相关并发症风险的最佳工具是使用流感疫苗[6-8]。利用免疫生物药物控制流感的发生通常有几个方面。一方面，一个特定个体的免疫系统对循环的病毒株和那些它第一次遇到的病毒株有不同的反应，如果它们有抗原相似性[7,9,10]。另一方面，疫苗接种后免疫的形成，H—和 N—病毒糖蛋白抗体的持续存在依赖于流感疫苗的免疫原性等指标[4,11,12]。流感疫苗的免疫原性及降低流感抗体滴度的动态仍然是许多研究的主题，这些研究与制药市场上流感疫苗的多样性有关。

目的是评估与不同抗原组成的疫苗株后 21 天、6 个月、10 个月和持续时间的抗血凝素抗体 (anti-HA) 接种疫苗后的灭活流感分裂疫苗 Ultrix (LSR-001419/08) 的免疫原性。

材料与方法

临床研究包括 48 名志愿者 (根据监管文件签署知情同意书)，年龄为 18 岁到 60 岁之间 (n=48) (平均年龄为 35±8.2 岁)，2016 年 9 月和 2017 年 5 月使用 "FORT" LLC 生产的 Ultrix 接种。在疫苗的生产中使用了菌株 H1N1 A/California/7/2009 (H1N1) pdm 09，H3N2 A/HongKong/4801/2014，NYMCX-263B (15/184)，B/Brisbane/60/2008 NYMCBX-35 (15/300) Victorialineage 由世界卫生组织推荐的 2016 年流行病季节节，并菌株 H1N1 A/Michigan/45/2015 NYMCX-275 (16/248)，H3N2 A/HongKong/4801/2014，NYMCX-263B (15/184)，B/Brisbane/60/2008NYMCBX-35 (15/300) Victorialineage，建议 2017 年流行病季节使用，每个品系的血凝素含量为 15 微克。根据俄罗斯联邦国家药典第十三版 (SP RF XIII)，血液血清中的抗体水平由微粒体在血细胞凝集抑制反应 (HI test) 中来测定[13]。为了建立反应，从用于生产相应流行季节疫苗的流感病毒株中使用了流感诊断学。使用 RDE 试剂

(Deben Diagnostics Ltd., 英国) 从免疫血清中去除非特异性血凝抑制剂。这项研究使用了微型平板 (96 孔 V 形), 在接种疫苗 21 天后使用成对的志愿者血清, 然后在 6 个月和 10 个月后进行。血凝素滴度小于 1:10, 估计为 1:5。为了评估 Ultrix 疫苗的有效性, 使用了免疫原性标 (见表 1)。

所得数据采用 Statistica 6.0 软件包进行统计处理。

结果与讨论

2016 年接种疫苗前, 经 H1N1 A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 诊断检测的血清阴性血清数为 12 名 (25.0%); 经 H3N2 A/HongKong/4801/2014 (H3N2) 为 14 名 (29.2%); 经 B/Brisbane/60/2008 位 11 名 (22.9%)。2 名志愿者 (4.2%) 对三种 Ultrix 疫苗株缺乏抗体。大部分的血清反应阳性的血清, 在缺乏数据以前的疫苗证实了, 作为一个规则, 病毒在循环过程中对人体免疫系统的积极作用, 并疫苗的抗原成分相匹配的流感病毒亚型结构[7]。用血清转化的志愿者在血清阴性个体中 (抗体效价 1:20 或以下) 及血清阳性个体中 (抗体效价 1:40 或以上) 之间的相对数量在 Ultrix 接种后的 21 天和 180 天示于表 2。

总的来说, 2016 年接种的大多数志愿者都表现出明显的免疫系统激活, 对 Ultrix 疫苗的所有菌株都形成了强烈的、可比较的免疫持续时间。在 21 天后接种疫苗的人群中, 血清转化为 H1N1A/California 和 B/Brisbane 菌株发现于 35 人 (72.9%), 并 H3N2A/HongKong 菌株于 37 名志愿者 (77.1%)。对血清阴性和血清阳性志愿者 21 天后的血清转换血清的相对数量进行比较分析, 未发现流感抗体的效价为 1:40 或更高的出现与疫苗接种前的初始抗体水平之间存在联系。尽管血清阳性志愿者中有更多的人有血清转化, 即 25 人和 27 人, 分为 A (H1N1)、A (H3N2) 及 B 菌株, 但这种差异在统计学上是不可靠的 ($Pf > 0.05$)。唯一的例外是血清阴性和血清阳性个体在 6 个月后对 A (H1N1) 和 B 的抗原变异的免疫反应。无论初始抗体水平如何, 疫苗接种前, 抗体滴度为 1:20 的志愿者血清转化率 (83.3 和 45.5%) 明显高于血清阳性志愿者 ($Pf < 0.05$)。

单次免疫后 21 天 anti-HA 抗体效价几何平均倍率为 173.5; 135.7 和 88.5, 于 95.8 形成血清保护; 病毒株 A (H1N1)、A (H3N2) 和 B 分别占 91.7%和 93.7%。

研究中发现 H1N1A/California 菌株的抗原性更高, 单次免疫 6 个月后免疫系统激活并血清保护高达 100%的情况证明该结论。同期 H3N2A/Hong Kong 和 B/Brisbane 的血清阳性血清数量分别逐渐减少至 85.4 和 91.7%, 并保护水平保持在较高水平, 符合 CPMPEMEA 和 CPMP/EWP/ 1045/01 的要求 (表 1)。

在 2017 年接种后, 志愿者重复接种了 10 个月后的 Ultrix 疫苗, 其中 H1N1A/California 株被 H1N1A/Michigan 株替代, 对 H3N2A/ HongKong 和 B/Brisbane 株的反应与首次接触疫苗株抗原时相比不那么强烈。H3N2A/ HongKong 和 B/Brisbane 抗体反应阳性血清的数量在第一

次抗原刺激后增加了 3.1 倍和 4.1 倍，而第二次抗原刺激仅增加了 2.4 倍和 2.5 倍 ($Pf < 0.001$ 和 $Pf < 0.05$)。2017 年，接种 H1N1A/Michigan 株疫苗导致在更多的志愿者 (97.9%) 中以 1:40 或更多的效价形成抗体。然而，较高比例的血清阳性个体并不认为 H1N1A/California 株具有低免疫原性，因为接种前 H1N1A/Michigan 株的血清阴性血清数量比 H1N1A/California 株少 1.4 倍。

在 10 个月后 (2017 年) 反复接种 Ultrix，刺激了 2016 年和 2017 年疫苗相同病毒抗原的抗体的产生，其效价低于 H1N1A/Michigan 株。第一次疫苗接种后的 H3N2A/Hong Kong 毒株，在 2 名志愿者 (4.2%) 中测定了最大滴度为 1:640，在 62.5% 的志愿者中，抗体滴度增加了 4-8 倍。重复接种同样的毒株刺激了抗体的产生，其效价不超过 1:320 于 5 人 (10.4%)，缺乏血清转换，是 29 名志愿者 (60.4%) 的免疫系统活性较低的特点，而在数量明显较少的志愿者 (35.4%) 中抗体滴度增加了 4-8 倍。重复免疫期间，B/Brisbane 毒株的 12 份血清的 anti-HA 滴度增加了 4-8 倍，比首次免疫时降低了 2.7 倍 (2017 年下降了 25%，2016 年下降了 66.7%)。

在一个血清 (2.1%) 中检测到对 H1N1A/California 抗体滴度的最大增加至 1:1280。在 50% 以上的血清中，抗体滴度增加 4-8 倍，分别为 39.6%—18.7%。在一份血清中还检测到了最高效价为 1:320 的抗体 (2.1%) 对 H1N1A/Michigan，在 41.7% 的志愿者中发现了血清转换。尽管血清保护水平的差异 (分别为 70.8 和 41.7%)，对 H1N1A/California 和 H1N1A/Michigan 的 anti-HA 抗体效价的相对数量的分析没有显示血清转化水平的统计学显著性差异 ($Pf > 0.05$)，这证实了不同来源的疫苗 A/H1N1 株的密切抗原组成。血清阴性血清和血清转化血清数量的比较数据见表 3。

少数志愿者 (5 人至 9 人) 分别对 B/Bris-bane 和 H3N2A/HongKong 株具有免疫耐受。超过 50% 的接种者显示抗体效价增加了 4-8 倍 (58.4% 的人有 H1N1A/California 抗体；62.5% 的人有 H3N2A/HongKong 抗体，66.6% 的人有 B/Brisbane 抗体)，这对流感病毒的个体和集体免疫的形成具有重要意义。6 个月后的重复血清测试显示，没有抗体效价动态的志愿者数量增加，而抗体效价增加 4-8 倍的血清数量减少。例如，6 个月后，接种 B/Brisbane 毒株无抗体疫苗的人数增加了 4 倍，而接种同一毒株抗体增加 4-8 倍的志愿者人数从 66.6 下降到 16.7%。免疫系统对不同疫苗中常见抗原和新抗原的不同反应与抗原印迹免疫现象有关，其本质表现为当反复接触免疫系统最初记忆的抗原时，免疫系统会产生更强的免疫反应[9,10]。在这项临床研究中，很难确定是哪种菌株导致了抗原印迹，这不仅是由于某些血清型流感病毒[3]在自然界中广泛传播了几十年，但也使用不同类型的 H1N1 血清型甲型流感病毒作为近年来用于季节性免疫的疫苗的一部分[12,11]。

抗体效价几何多重性平均值比较，疫苗株抗原性差异无统计学意义。然而，与接种前的初始抗体滴度相比，anti-HA 抗体效价几何平均倍率分别增加 2.55 倍和 4.36 倍 (Pf<0.05)，差异有统计学意义 (见表 4)。

在接种疫苗后的不同时间段检测到的 anti-HA 抗体效价之间的差异水平使用弗里德曼准则来测定，该准则用于比较 48 (n) 血清研究的 4 个测定条件 (接种疫苗前的抗体滴度，21 天、180 天和 10 个月后)。X_r²=70,05938 的经验值反映秩数的显著差异。在 $\alpha=0,05$ 和 $\alpha=0,01$ 的显著性水平上，分别等于 7.81 和 11.34，证实了接种后不同时间段产生的抗体滴度的非随机差异，在 6 个月后达到最大值。

结论

因此，临床研究的流感疫苗 Ultrix 的免疫反应的形成评估表明，免疫生物药物符合主要标准的免疫原性。Ultrix 疫苗在接种 21 天后为 90% 以上的接种者提供了血清保护水平，并使流感抗体的平均几何滴度比初始水平提高了 2.5 倍以上。

表 1

流感疫苗的免疫原性标准*

免疫原性标准	数值
血清转换因子 (与基线水平相比, 平均几何抗体效价在第 21 天增加), 表达为增加的多样性	>2.5
血清转换水平 (其抗体滴度增加了 4 倍以上的志愿者的百分比)	>40%
血清保护水平 (接种后第 21 天抗体滴度大于 1:40 的个体百分比)	>70%

注：*根据专利药品委员会 (CPMPEMEA, CPMP/EWP/1045 / 01) 及 XIII 的数据

表 2

抗体效价的范围, 血清阴性个体和血清阳性者中血清转化的志愿者人数

接种前的 志愿者人数 (%)	菌株的抗原变异					
	H1N1A/California		H3N2A/HongKong		B/Brisbane	
	A*	B*	A	B	A	B
	12 (25%)	36 (75%)	14 (29,25%)	33 (68,75%)	11 (22,9%)	37 (77,1%)
接种疫苗后 21 天						

具有血清转化的 志愿者人数 (%) (抗体滴度范围)	10 (83,3%) (1:40- 1:320)	25 (69,4%) (1:40- 1:1280)	12 (85,7%) (1:80- 1:640)	25 (75,75%) (1:40- 1:640)	8 (72,3%) (1:20- 1:320)	27 (72,97%) (1:40- 1:640)
Pf*	> 0, 05		> 0, 05		> 0, 05	
接种疫苗后 180 天						
具有血清转化的 志愿者人数 (%) (抗体滴度范围)	10 (83,3%) (1:40- 1:320)	16 (44,4%) (1:160- 1:640)	6 (42,9%) (1:20- 1:640)	11 (33,3%) (1:160- 1:320)	5 (45,5%) (1:80- 1:160)	7 (18,9%) (1:160- 1:6400)
Pf*	< 0,05		> 0,05		< 0,05	

注：*A—血清阴性；B—血清阳性；Pf—Fisher 角转化

表 3

**2016 年 (21 天后，并 180 天后) 及 2017 年
(21 天后) 接种后血清阴性和血清阳性血清的结构**

接种后的时间/ 菌株的抗原变异	抗体滴度增加的多重性 绝对 / %					
	0	2	4	8	16	32
(21 天) /H1N1A/California*	7/14,6	7/14,6	19/39,6	9/18,8	4/8,3	2/4,2
/H3N2A/HongKong*	9/18,8	4/8,3	23/47,9	7/14,6	4/8,3	1/2,1
/B/Brisbane*	5/10,4	8/16,7	22/45,8	10/20,8	3/6,3	—
(6 个月) /H1N1A/California*	10/20,8	13/27,1	13/27,1	8/16,7	3/6,3	1/2,1
H3N2A/HongKong*	15/31,3	15/31,3	13/27,1	2/4,2	2/4,2	1/2,0
B/Brisbane*	20/41,7	17/35,4	7/14,6	1/2,1	2/4,2	1/2,1
(21 天) /H1N1A/Michigan**	12/25,0	16/33,3	18/37,5	1/2,1	—	1/2,1
/H3N2A/HongKong**	14/29,2	15/31,3	13/27,1	4/8,3	16/4,2	—
/B/Brisbane**	17/35,4	16/33,3	8/16,7	4/8,3	3/6,3	—

注：* 2016 年季节 **—2017 年

2016、2017 年接种后 21 天 anti-HA 抗体效价几何平均倍率值

免疫原性标准	2016 年			2017 年		
	H1N1A/California a	H3N2A/HongKong g	B/Brisbane	H1N1A/Michigan	H3N2A/HongKong g	B/Brisbane
anti-HA 抗体效价几何平均倍率	4,36	3,89	3,89	2,63	2,51	2,55
弗里德曼规则	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	<0,05	<0,05

注：* 接种 Ultrix 疫苗后，流感病毒不同抗原变异的志愿者血清中抗体效价的平均几何值的多重增加