

· 综 述 ·

硫柳汞对疫苗抗原活性的影响及其作用机制

张秀丽, 张志刚 综述, 赵勤俭 审校

厦门大学公共卫生学院分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室
国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 福建 厦门 361102

摘要: 硫柳汞作为防腐剂常被用于生物制品, 尤其是疫苗中。目前, 大多数国家已将硫柳汞从单剂量疫苗中移除, 但其仍广泛应用于多剂量疫苗中。硫柳汞作为疫苗制剂中的组分, 应与其他成分相互兼容, 尤其不能损害抗原的活性。但近年来多项研究报道, 硫柳汞可致疫苗抗原的抗原性和免疫原性降低, 尤其是含有或富含半胱氨酸(cysteine, Cys)的蛋白抗原, 提示将硫柳汞作为疫苗防腐剂时应充分考察其对疫苗抗原活性的影响。本文对硫柳汞对 2 种灭活疫苗和 3 种重组蛋白疫苗抗原性和免疫原性的影响及其可能的作用机制作一综述, 为疫苗防腐剂的合理选择提供参考。

关键词: 硫柳汞; 蛋白抗原; 抗原性; 免疫原性

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5503(2023)01-0119-05

Effect of thimerosal on vaccine antigen activity and its mechanism

ZHANG Xiu-li, ZHANG Zhi-gang, ZHAO Qin-jian

School of Public Health, Xiamen University, State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular
Diagnostics, National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases,
Xiamen 361102, Fujian Province, China

Corresponding author: ZHAO Qin-jian, E-mail: zhaqinjian@xmu.edu.cn

Abstract: Thimerosal is commonly used as a preservative in biological products, especially in vaccines. Although it has been removed from single-dose vaccines in most countries, thimerosal is still widely used in multi-dose vaccines at present. Thimerosal, as a component in vaccine preparation, should be compatible with other components, especially should not damage the activity of antigen. However, in recent years, many studies have reported that thimerosal can reduce the antigenicity and immunogenicity of vaccine antigens, especially protein antigens containing or rich in cysteine (Cys), suggesting that the effect of thimerosal on vaccine antigen activity should be fully evaluated when it is used as a vaccine preservative. In this paper, the effects of thimerosal on antigenicity and immunogenicity of two inactivated vaccines and three recombinant protein vaccines and the possible mechanisms were reviewed, in order to provide reference for rational selection of vaccine preservatives.

Keywords: Thimerosal; Protein antigen; Antigenicity; Immunogenicity

疫苗接种是预防、控制和根除传染病的最有利措施。自 20 世纪 30 年代起, 硫柳汞一直被用作疫苗的防腐剂, 通过预防有害微生物污染所致的潜在危害, 从而有助于疫苗的安全生产和使用^[1-2]。硫柳汞对于某些疫苗可能有灭活剂或类似佐剂的效果^[3-6], 也可通过减少疫苗生产过程中过氧化物的产生, 从而提高制剂的稳定性^[7-8]。作为疫苗的防腐剂, 硫柳汞应与疫苗抗原相容, 但研究表明, 硫柳汞可能与抗原发生反应。在某些情况下, 这可能限制疫苗的开发和抗原的体外免疫学评价^[9-10]。1956 年, DAVISSON

等^[11]报道, 硫柳汞降低了脊髓灰质炎灭活疫苗(inactivated poliovirus vaccine, IPV)的免疫原性, 提示开发百白破疫苗(diphtheria-tetanus-pertussis, DTP)和 IPV 联合疫苗存在硫柳汞兼容性问题^[9]。近年来, 随着分析技术和手段的不断进步, 有关硫柳汞对其他疫苗抗原性和免疫原性的影响陆续被报道。

1 硫柳汞

硫柳汞($C_9H_9HgNaO_2S$)化学名为硫代水杨酸乙基汞钠, 是一种含 49.55% 汞(以重量计)的有机化合物。硫柳汞不存在于自然界中, 是一种人造汞化合

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32070925)。

通信作者: 赵勤俭, E-mail: zhaqinjian@xmu.edu.cn

物,由礼来公司于 1927 年研发作为一种高水溶性的防腐剂^[12]。20 世纪 90 年代,人们担忧硫柳汞的神经毒性及其与儿童自闭症的相关性,但尚无有效的科学数据表明其中的因果关系^[13]。目前,大多数国家已将硫柳汞从单剂量疫苗中移除,但其仍广泛存在于多剂量疫苗中。120 多个国家每年使用含硫柳汞的疫苗,为约 8 400 万儿童接种,可挽救至少 1 400 万人的生命^[14-15]。相比于单剂量疫苗,多剂量疫苗的每剂量制造成本较低,产生的医疗废物总量更少,更适合冷链短缺或储存能力有限的条件下使用^[16]。当发生疾病大流行时,多剂量疫苗有助于更快扩大免疫范围、控制疾病。出于安全性考虑,多剂量疫苗一般含有硫柳汞作为防腐剂,虽然 2-苯氧乙醇(2-phenoxy-ethanol, 2-PE)和苯酚已被用作一些疫苗的防腐剂,但其杀菌效果不如硫柳汞,目前尚无更好的化合物可在疫苗中完全取代硫柳汞^[17]。在含硫柳汞的疫苗中,硫柳汞的通常用量为 0.001% ~ 0.01% (w/v),其中汞的含量为每剂 12.5 ~ 25 μg ^[18]。有机汞主要包括甲基汞和乙基汞,甲基汞是一种环境来源的神经毒素;与甲基汞不同,硫柳汞的代谢产物之一是乙基汞。当硫柳汞作为疫苗制剂的一部分注射到人体时,其代谢产物之一的乙基汞能够逃脱人体的天然防御机制,迅速代谢转换成无机汞,不会长期滞留^[19]。世界卫生组织建议在全球免疫规划中使用含硫柳汞的疫苗,相关安全性研究也表明,使用此类产品的好处远超过任何理论上的毒性风险^[13, 20-21]。硫柳汞导致的免疫后不良事件主要是由于分子中的硫代水杨酸部分引起的硫柳汞过敏,但通常是轻微的反应,如注射部位红肿^[22]。在硫柳汞对抗原活性影响方面,相比于多克隆抗体血清,基于单克隆抗体的酶联免疫吸附实验更易发现硫柳汞对抗原性和免疫原性的损害作用,更有助于其作用机制的研究。

2 硫柳汞对灭活疫苗抗原活性的影响

硫柳汞作为灭活疫苗和重组蛋白疫苗的防腐剂。在人体中,硫柳汞代谢产物乙基汞易与细胞成分中的巯基结合,但当半胱氨酸(cysteine, Cys)上的巯基(-SH)为蛋白质分子的活性位点或重要功能位点时,这种相互结合作用很可能使酶、细胞器、离子通道、膜等失去正常功能^[23]。疫苗制剂中也存在硫柳汞与抗原中 Cys 的巯基相互作用的现象,这可能影响抗原结构完整性和稳定性,降低疫苗抗原性和免疫原性,使疫苗效力下降。

2.1 硫柳汞对 IPV 的影响 IPV 是一种包含脊髓灰

质炎病毒 I 型(Mahoney 株)、II 型(MEF-1 株)、III 型(Saukett 株)抗原的三价疫苗^[24]。在含 0.01% (w/v) 硫柳汞、4 °C 储存条件下,3 种脊髓灰质炎病毒抗原的稳定性均明显降低,其中 I 型 IPV 抗原性和免疫原性均出现明显降低现象^[25]。硫柳汞可加深高温对 IPV 免疫原性和抗原性的破坏作用。在 37 °C 储存条件下,与对照组相比,含硫柳汞的 IPV 组小鼠产生的中和抗体滴度明显较低^[11],3 种 IPV 的抗原性丧失速率均增大,这种损害作用在 I 型 IPV 抗原上最为明显^[25]。IPV 与硫柳汞在 37 °C 混合 5 min 后,II 型 IPV 抗原的一株单克隆抗体 7Ab 结合活性降低约 16 倍,但针对 II 型 IPV 抗原上另一株单克隆抗体 9Ab 或小鼠多抗血清的结合活性未见明显变化^[25]。表明硫柳汞可能对 IPV 抗原的部分构象产生影响,且这种影响可能具有表位特异性。但在 0.005% ~ 0.01% 浓度范围内,硫柳汞对 IPV 抗原性的损害作用具有剂量依赖性,而对 IPV 的免疫原性影响无明显差异。L-半胱氨酸与含硫柳汞的 IPV 混合后,可减少硫柳汞对 IPV 抗原性的负面影响^[26-27],表明 L-半胱氨酸可作为硫柳汞的消除剂用于疫苗生产或制剂中。在 DTP-IPV 组合疫苗中,通过将这两种疫苗隔离在同一注射器单独腔室中的方法,解决了 IPV 抗原和硫柳汞的兼容性问题^[28]。另一种方法是在 DTP-IPV 组合疫苗中使用不影响 IPV 效力的 2-PE 或苜蓿素氯铵作为防腐剂^[9, 29]。

2.2 硫柳汞对流感病毒疫苗的影响 硫柳汞是多剂量流感疫苗中必要的防腐剂,可防止多剂量疫苗瓶在打开过程中可能发生的潜在微生物污染^[30]。但硫柳汞水解产物乙基汞能够与流感病毒疫苗的活性成分—血凝素结合^[31]。在动物实验中,乙基汞和血凝素形成的结合物可能在小鼠体内诱发汞相关免疫反应,降低流感病毒疫苗的免疫效力^[32]。体外细胞实验表明,硫柳汞可抑制流感病毒疫苗的 CD4⁺ T 细胞免疫反应,导致初始记忆 T 细胞凋亡和体外诱导 T 细胞活化失败,出现 ELISpot 实验假阳性结果,高估疫苗效力^[33-34]。

3 硫柳汞对重组蛋白疫苗抗原活性的影响

3.1 硫柳汞对人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)疫苗的影响 不同 HPV 型别的 L1 分子中含有几个在其衣壳结构和功能中发挥重要作用的 Cys 残基^[35]。CHEN 等^[36]研究发现,0.05% 硫柳汞处理导致五联苗[HPV6/11/16/18 病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)+戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)样颗粒 p239]中 4 种 HPV VLPs 抗原相应

的特异性单克隆抗体失去结合活性,抗原性均降低。将硫柳汞处理后的五联苗免疫小鼠,在免疫 2 针 2 周后采集血清进行抗体结合与中和滴度检测,结果发现 HPV18 VLPs 的免疫原性下降最为明显,该组结合滴度比对照组降低了约 25 倍,血清中和假病毒的能力明显减弱,中和滴度低于检测阈值,其次是 HPV16 VLPs。相比之下,硫柳汞对 HPV6/11 VLPs 和 HEV p239 的免疫原性未见明显影响。HPV6/11/16/18 VLPs 所含的 Cys 分别为 11、11、12、14 个,而 HEV p293 不含 Cys, HPV18 VLPs 为五联苗中对硫柳汞处理最敏感的型别, HPV16 VLPs 次之,由此可见,硫柳汞对蛋白抗原性的负面影响可能与疫苗蛋白抗原中 Cys 的数量存在一定的相关性。HPV16/18 双价苗的 I 期临床研究表明,将 HPV16 VLPs 与硫柳汞孵育后, V5 单克隆抗体识别的结构表位被破坏^[37]。通过冷冻扫描电镜和差示扫描荧光法也观察到硫柳汞处理后的 HPV18 VLPs 结构变化,尺寸扩展约 2%,重组病毒衣壳显著失稳,且这种负面影响呈硫柳汞浓度依赖性。两种具有高中和活性 HPV18 特异性单克隆抗体(13H12 和 3C3)与硫柳汞处理后的 HPV18 VLPs 结合活性明显下降。两株抗体监测 HPV18 抗原性损失的动力学虽均遵循双相指数衰减模型,但两模型间有显著性差异。表明免疫反应性损失可能具有表位特异性^[38]。

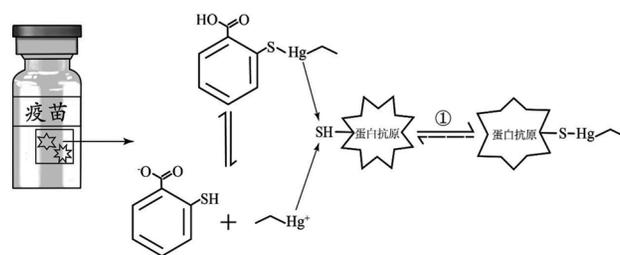
3.2 硫柳汞对乙型肝炎疫苗的影响 接种重组乙型肝炎疫苗是预防和控制慢性乙型肝炎病毒感染的最有效策略^[39]。目前,硫柳汞仍被用作乙型肝炎疫苗的防腐剂。但研究表明,在酵母生产的表面抗原制成的乙型肝炎疫苗中,与含硫柳汞的乙型肝炎疫苗组相比,不含防腐剂组的免疫原性较高,抗体几何平均滴度增加约 63%,体内相对效力提高 11% 以上, ED₅₀ 下降约 41%^[40]。血清阳转率和血清保护率数据也表明,不含硫柳汞的疫苗配方具有更高的免疫原性^[40]。姚伟等^[41]的体外研究表明,移除硫柳汞后,在 4 °C 贮存 12 个月、22 °C 贮存 6 个月和 37 °C 贮存 4 周后,乙型肝炎疫苗(CHO 细胞)的效力和稳定性仍符合《中国药典》(2005 版)的要求。基于硫柳汞对乙型肝炎疫苗免疫原性、体外效力和稳定性的影响,可考虑移除或替换硫柳汞,同时,硫柳汞对乙型肝炎疫苗抗原性的影响,仍需进一步研究。

3.3 硫柳汞对轮状病毒疫苗的影响 轮状病毒感染是幼儿严重腹泻和脱水的最常见原因,但可通过疫苗免疫接种来预防^[43]。截至 2019 年 11 月,全球轮状病毒疫苗的接种覆盖率约为 35%,相应疾病负担减少了 50% 以上^[44]。在将含有 3 种重组蛋白抗原(血

清型 P[4]、P[6] 和 P[8]) 的三价重组亚单位轮状病毒疫苗引入到儿童五联苗(DTP、乙型流感嗜血杆菌疫苗和 HBV 疫苗)的研究中发现,硫柳汞对 3 种抗原稳定性均有明显的破坏作用,且这种作用呈温度依赖性, 37 °C > 25 °C > 4 °C。硫柳汞导致的 P[4] 和 P[8] 抗原结构失稳与两者的抗原性降低高度相关,但在 P[6] 抗原上出现这种结构变化后,其抗原性却未受到明显影响^[45-47]。尽管观察到硫柳汞导致的抗原性改变,但这对体内免疫原性的影响仍有待于在动物模型中确定。

4 硫柳汞对疫苗效力影响的可能作用机制

在水溶液和生物体环境中,硫柳汞可迅速水解为乙基汞和硫代水杨酸盐,前者易通过 S-Hg 配位键与蛋白质游离或表面暴露的 Cys 残基反应形成蛋白质-乙基汞加合物^[48-50]。这种相互作用是硫柳汞抑菌作用的潜在机制^[51],同时也可能是其影响含 Cys 抗原的构象完整性和稳定性,降低抗原性和免疫原性的原因之一,尤其是当 Cys 参与构成或临近关键抗原表位时^[36,38,47]。基于单克隆抗体的酶联免疫吸附试验有助于发现基于多克隆抗血清难以发现的表位特异性修饰和抗原活性损失。研究表明,硫柳汞本身也可直接通过与抗原的 Cys 反应影响疫苗效力^[52]。硫柳汞对疫苗效力影响的可能作用机制见图 1。但硫柳汞或其水解产物乙基汞与疫苗抗原 Cys 的巯基相互作用可能是可逆或至少部分可逆^[27,47,52]。常见的生物化学巯醇,如 Cys、N-乙酰半胱氨酸和谷胱甘肽,降低硫柳汞因高巯基反应性而导致的细胞毒性已被证实^[53]。添加游离 Cys 可在后续工序中用于疫苗抗原关键 Cys 残基的再生,则硫柳汞对疫苗的一些不利影响可能被逆转^[38],或在设计和优化疫苗抗原时,可通过突变 Cys,如将 Cys 突变成丝氨酸,来避免 Cys 的巯基反应性^[47]。



注:图中①代表该反应过程可能为可逆过程。

图 1 硫柳汞与蛋白抗原相互作用的可能作用机制图

Fig. 1 Diagram of possible mechanisms of thimerosal interaction with protein antigens

5 小结与展望

综上所述,疫苗常用防腐剂硫柳汞可对部分疫苗抗原产生负面影响,抗原上的 Cys 与硫柳汞或其水解产物乙基汞的相互作用是降低抗原活性的可能机制。因此,在疫苗防腐剂为硫柳汞,抗原 Cys 侧链上的巯基参与构成抗原关键表位或临近抗原关键表位时,应充分深入研究硫柳汞对疫苗抗原性和免疫原性的影响。此外,当疫苗制剂需要添加防腐剂而硫柳汞与抗原无法兼容时,可考虑使用 2-PE、苯酚等替代,并进行可行性研究。未来应拓宽硫柳汞对不同疫苗(包括兽用疫苗)抗原活性影响的研究,并对其作用机制进行深入探索,为疫苗防腐剂的选择提供理论支持。

参考文献

- [1] ORENSTEIN W A, PAULSON J A, BRADY M T, *et al.* Global vaccination recommendations and thimerosal [J]. *Pediatrics*, 2013, 131 (1): 149-151.
- [2] HERMAN L M, GERBERT D A, LARSON L W, *et al.* Vaccines, thimerosal, and neurodevelopmental outcomes [J]. *JAAPA*, 2006, 19 (1): 16, 18-19.
- [3] DAVIS R B, RIMLER R B, SHOTTS E B. Efficacy studies on *Haemophilus gallinarum* bacterin preparations [J]. *Am J Vet Res*, 1976, 37 (2): 219-222.
- [4] GOLDSTEIN M A, TAURASO N M. Effect of formalin, beta-propiolactone, merthiolate, and ultraviolet light upon influenza virus infectivity chicken cell agglutination, hemagglutination, and antigenicity [J]. *Appl Microbiol*, 1970, 19 (2): 290-294.
- [5] GUPTA R K, SHARMA S B, AHUJA S, *et al.* The effects of different inactivating agents on the potency, toxicity and stability of pertussis vaccine [J]. *J Biol Stand*, 1987, 15 (1): 87-98.
- [6] NI J, BIS, XU W, *et al.* Improved immune response to an attenuated pseudorabies virus vaccine by ginseng stem-leaf saponins (GSLs) in combination with thimerosal (TS) [J]. *Antiviral Res*, 2016, 13 (2): 92-98.
- [7] GARDNER R A, PITTMAN M. relative stability of pertussis vaccine preserved with Merthiolate, Benzethonium Chloride, or the Parabens [J]. *Appl Microbiol*, 1965, 135 (5): 564-569.
- [8] TOWNE V, OSWALD C B, MOGG R, *et al.* Measurement and decomposition kinetics of residual hydrogen peroxide in the presence of commonly used excipients and preservatives [J]. *J Pharm Sci*, 2009, 98 (11): 3987-3996.
- [9] SUTTER R W, PALLANSCH M A, SAWYER L A, *et al.* Defining surrogate serologic tests with respect to predicting protective vaccine efficacy: poliovirus vaccination [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, 75 (4): 289-299.
- [10] BABIUK S, SKOWRONSKI D M, DE SERRES G, *et al.* Aggregate content influences the Th1 / Th2 immune response to influenza vaccine: evidence from a mouse model [J]. *J Med Virol*, 2004, 72 (1): 138-142.
- [11] DAVISSON E O, POWELL H M, MACFARLANE J O, *et al.* The preservation of poliomyelitis vaccine with stabilized merthiolate [J]. *J Lab Clin Med*, 1956, 47 (1): 8-19.
- [12] GOLOS A, LUTYNSKA A. Thiomersal-containing vaccines-a review of the current state of knowledge [J]. *Przegl Epidemiol*, 2015, 69 (1): 59-64, 157-161.
- [13] HE P, LIANG Z L. Application of thiomersal preservative in human vaccine [J]. *Chin J Biologicals*, 2013, 26 (1): 135-138. (in Chinese)
何鹏, 梁争论. 硫柳汞防腐剂在人用疫苗中的应用 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2013, 26 (1): 135-138.
- [14] KING K, PATERSON M, GREEN S K. Global justice and the proposed ban on thimerosal-containing vaccines [J]. *Pediatrics*, 2013, 131 (1): 154-156.
- [15] SIVA N. Thiomersal vaccines debate continues ahead of UN meeting [J]. *Lancet*, 2012, 379 (9834): 2328.
- [16] DRAIN P K, NELSON C M, LLOYD J S. Single-dose versus multi-dose vaccine vials for immunization programmes in developing countries [J]. *Bull World Health Organ*, 2003, 81 (10): 726-731.
- [17] CLEMENTS C J, MCINTYRE P B. When science is not enough-a risk / benefit profile of thiomersal-containing vaccines [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2006, 5 (1): 17-29.
- [18] MEYER B K, NI A, HU B, *et al.* Antimicrobial preservative use in parenteral products: past and present [J]. *J Pharm Sci*, 2007, 96 (12): 3155-3167.
- [19] PICHICHERO M E, CERNICHIARI E, LOPREIATO J, *et al.* Mercury concentrations and metabolism in infants receiving vaccines containing thiomersal: a descriptive study [J]. *Lancet*, 2002, 360 (9347): 1737-1741.
- [20] DIMASI J A, HANSEN R W, GRABOWSKI H G. The price of innovation: new estimates of drug development costs [J]. *J Health Econ*, 2003, 22 (2): 151-185.
- [21] KNEZEVIC I, GRIFFITHS E, REIGEL F, *et al.* Thiomersal in vaccines: a regulatory perspective WHO Consultation, Geneva, 15-16 April 2002 [J]. *Vaccine*, 2004, 22 (15-16): 1836-1841.
- [22] WATTANAKRAI P, RAJATANAVIN N. Thimerosal allergy and clinical relevance in Thailand [J]. *J Med Assoc Thai*, 2007, 90 (9): 1775-1779.
- [23] FARINA M, AVILA D S, DA ROCHA J B, *et al.* Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury [J]. *Neurochem Int*, 2013, 62 (5): 575-594.
- [24] THOMASSEN Y E, VAN SPRANG E N, VAN DER POL L A, *et al.* Multivariate data analysis on historical IPV production data for better process understanding and future improvements [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 107 (1): 96-104.
- [25] SAWYER L A, MCINNIS J, PATEL A, *et al.* Deleterious effect of thimerosal on the potency of inactivated poliovirus vaccine [J]. *Vaccine*, 1994, 12 (9): 851-856.
- [26] ZIEMINSKA E, TOCZYLOWSKA B, STAFIEJ A, *et al.* Low molecular weight thiols reduce thimerosal neurotoxicity in vitro:

- modulation by proteins [J]. *Toxicology*, 2010, 276 (3): 154-163.
- [27] KRAAN H, TEN HAVE R, VAN DER MAAS L, *et al.* Incompatibility of lyophilized inactivated polio vaccine with liquid pentavalent whole-cell-pertussis-containing vaccine [J]. *Vaccine*, 2016, 34 (38): 4572-4578.
- [28] FALK L A, ARCINIEGA J, MCVITTIE L. Manufacturing issues with combining different antigens: a regulatory perspective [J]. *Clin Infect Dis*, 2001, 33 (Suppl 4): S351-355.
- [29] PUZISS M, WRIGHT G G. Studies on immunity in anthrax. X. Gel-adsorbed protective antigen for immunization of man [J]. *J Bacteriol*, 1963, 85 (1): 230-236.
- [30] GOSBELL I B, GOTTLIEB T, KESSON A M, *et al.* Immunisation and multi-dose vials [J]. *Vaccine*, 2010, 28 (40): 6556-6561.
- [31] STROHMIDEL P, SPERLING M, KARST U. Investigations on the binding of ethylmercury from thiomersal to proteins in influenza vaccines [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2018, 50 (12): 100-104.
- [32] WESTHOFF C M, LOPEZ O, GOEBEL P, *et al.* Unusual amino acid usage in the variable regions of mercury-binding antibodies [J]. *Proteins*, 1999, 37 (3): 429-440.
- [33] LOISON E, POIRIER-BEAUDOIN B, SEFFER V, *et al.* Suppression by thiomersal of ex-vivo CD4+ T cell response to influenza vaccine and induction of apoptosis in primary memory T cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (4): e92705.
- [34] CHAUVAT A, BENHAMOUDA N, LOISON E, *et al.* Pitfalls in anti-influenza T cell detection by Elispot using thiomersal containing pandemic H1N1 vaccine as antigen [J]. *J Immunol Methods*, 2012, 378 (1-2): 81-87.
- [35] VOLPERS C, SCHIRMACHER P, STREECK R E, *et al.* Assembly of the major and the minor capsid protein of human papillomavirus type 33 into virus-like particles and tubular structures in insect cells [J]. *Virology*, 1994, 200 (2): 504-512.
- [36] CHEN S Y, HUANG X F, LI Y K, *et al.* Altered antigenicity and immunogenicity of human papillomavirus virus-like particles in the presence of thiomersal [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, 141 (8): 221-231.
- [37] INGLIS S, SHAW A, KOENIG S. Chapter 11: HPV vaccines: commercial research & development [J]. *Vaccine*, 2006, 24 (S3): 99-105.
- [38] HUANG X F, NIE M F, YUE M X, *et al.* Capsid destabilization and epitope alterations of human papillomavirus 18 in the presence of thiomersal [J]. *J Pharmaceutical Analysis*, 2020. DOI: 10.1016/j.jpha.2020.08.007.
- [39] ZHAO H, ZHOU X, ZHOU Y H. Hepatitis B vaccine development and implementation [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2020, 16 (7): 1533-1544.
- [40] MAHBOUBI A, FAZELI M R, SAMADI N, *et al.* Evaluation of thiomersal removal on immunogenicity of aluminum salts adjuvanted recombinant hepatitis B vaccine [J]. *Iran J Pharm Res*, 2012, 11 (1): 39-46.
- [41] YAO W, LI Y, ZHANG Y R, *et al.* Immunogenicity and stability of thiomersal-free recombinant hepatitis B vaccine (CHO cells) [J]. *Chin J Biologicals*, 2007 (11): 834-836. (in Chinese)
- 姚伟, 李玉, 张岩锐, 等. 不含硫柳汞重组乙型肝炎疫苗 (CHO 细胞) 的免疫原性及稳定性 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2007 (11): 834-836.
- [42] GLORIANI N G, SRINIVASA K, BOCK H L, *et al.* Immunogenicity of HBV vaccine during stated shelf-life [J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2010, 41 (4): 876-882.
- [43] BURNETT E, PARASHAR U, TATE J. Rotavirus vaccines: effectiveness, safety, and future directions [J]. *Paediatr Drugs*, 2018, 20 (3): 223-233.
- [44] CLARK A, VAN ZANDVOORT K, FLASCHE S, *et al.* Efficacy of live oral rotavirus vaccines by duration of follow-up: a meta-regression of randomised controlled trials [J]. *Lancet Infect Dis*, 2019, 19 (7): 717-727.
- [45] DORO R, LASZLO B, MARTELLA V, *et al.* Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure? [J]. *Infect Genet Evol*, 2014, 28 (12): 446-461.
- [46] SAWANT N, KAUR K, HOLLAND D A, *et al.* Rapid developability assessments to formulate recombinant protein antigens as stable, low-cost, multi-dose vaccine candidates: case-study with non-replicating rotavirus (NRRV) vaccine antigens [J]. *J Pharm Sci*, 2021, 110 (3): 1042-1053.
- [47] KAUR K, XIONG J, SAWANT N, *et al.* Mechanism of thiomersal-induced structural destabilization of a recombinant rotavirus P [4] protein antigen formulated as a multi-dose vaccine [J]. *J Pharm Sci*, 2021, 110 (3): 1054-1066.
- [48] TAN M, PARKIN J E. Route of decomposition of thiomersal (thiomersal) [J]. *Int J Pharm*, 2000, 208 (1-2): 23-34.
- [49] JANZEN R, SCHWARZER M, SPERLING M, *et al.* Adduct formation of thiomersal with human and rat hemoglobin: a study using liquid chromatography coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry (LC / ESI-TOF-MS) [J]. *Metallomics*, 2011, 3 (8): 847-852.
- [50] SANTOS J C N, DA SILVA I M, BRAGA T C, *et al.* Thiomersal changes protein conformation and increase the rate of fibrillation in physiological conditions: Spectroscopic studies using bovine serum albumin (BSA) [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 113 (7): 1032-1040.
- [51] GEIER D A, SYKES L K, GEIER M R. A review of thiomersal (Merthiolate) and its ethylmercury breakdown product: specific historical considerations regarding safety and effectiveness [J]. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2007, 10 (8): 575-596.
- [52] DE MAGALHAES SILVA M, DE ARAUJO DANTAS M D, DA SILVA FILHO R C, *et al.* Toxicity of thiomersal in biological systems: Conformational changes in human hemoglobin, decrease of oxygen binding capacity, increase of protein glycation and amyloid's formation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 154 (7): 661-671.
- [53] WU X, LIANG H, O'HARA K A, *et al.* Thiol-modulated mechanisms of the cytotoxicity of thiomersal and inhibition of DNA topoisomerase II alpha [J]. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21 (2): 483-493.