

Проблема создания универсальной противогриппозной вакцины

А.Ю. Егоров[#]

HSC Development Ltd, Тульн, Австрия

[#]Для корреспонденции: Андрей Егоров, E-mail: aevirol@gmail.com

Ключевые слова: вирус гриппа, универсальная вакцина, вакцинация, иммунитет

DOI: 10.18527/2500-2236-2016-3-1-1-12

Получена 3 декабря 2015 г.

Принята к печати 26 января 2016 г.

Опубликована 4 февраля 2016 г.

АННОТАЦИЯ

Периодически появляющиеся новые пандемические штаммы вируса гриппа А, к которым отсутствует популяционный иммунитет, превращают грипп в особо опасную инфекцию. Сегментированная природа генома вируса гриппа способствует образованию реассортантов – вирусов, в состав которых входят геномные сегменты разных штаммов, принадлежащих одному роду. Именно механизм реассортации является основной причиной антигенного разнообразия вирусов гриппа в природе и появления штаммов, вызывающих пандемии в человеческой популяции. Лучшим средством предотвращения распространения гриппозной инфекции считается вакцинация. Однако эффективность известных на сегодняшний день вакцин недостаточна, особенно при иммунизации пожилых людей и маленьких детей. Специфический иммунитет, вырабатываемый после перенесенного заболевания или вакцинации одним подтипом вируса гриппа, слабо защищает от инфекции вирусом другого подтипа. В связи с этим не потерял актуальности вопрос разработки эффективной универсальной гриппозной вакцины, которая будет индуцировать широкий кросс-протективный длительный иммунитет как к вирусам гриппа А различных подтипов, так и к вирусам гриппа В. Основные подходы к созданию такой вакцины и проблемы их реализации рассматриваются в данном обзоре.

The challenges of creating a universal influenza vaccine

Andrej Y. Egorov[#]

HSC Development Ltd, Tulln, Austria

[#]Corresponding author: Andrej Egorov, E-mail: aevirol@gmail.com

Keywords: influenza virus, universal vaccine, vaccination, immunity

ABSTRACT

Periodically emerging new influenza strains along with the lack of population immunity to these new viruses can lead to a pandemic, making influenza infection especially dangerous. The fragmented nature of the influenza virus genome contributes to the formation of influenza virus reassortants containing genomic fragments from different strains. This mechanism is one of the reasons for the existing influenza virus antigenic diversity in nature and the occurrence of influenza pandemics. Vaccination is the best measure to prevent the spread of influenza infection, however, the efficacy of existing vaccines is not sufficient, especially for the elderly and small children. Specific immunity developed after disease or immunization poorly protects against infection by influenza viruses of another subtype. In this regard, there is an urgent need for a more effective universal influenza vaccine that provides a long-lasting wide cross-protective immunity, and is able to resist to influenza A and B viruses of all known subtypes. Basic approaches and challenges in creating such a vaccine are discussed in this review.

ВВЕДЕНИЕ

Из всех респираторных вирусных заболеваний гриппозная инфекция характеризуется наиболее тяжелой патологией и причиняет наибольший ущерб здоровью населения и экономике. Периодически появляющиеся новые пандемические штаммы, к которым отсутствует популяционный иммунитет, превращают грипп в особо опасную инфекцию. Известно, что испанский грипп 1918 года стал причиной смерти от

30 до 50 млн человек. В настоящее время, по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), во время сезонных эпидемий ежегодно во всем мире заболевает гриппом до 20% населения, в том числе 5–10% взрослых и 20–30% детей. Тяжелые формы отмечаются в 3–5 млн случаев, летальные исходы составляют от 250000 до 500000 случаев [1-3]. Экономические потери, вызванные гриппом и другими

острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ), составляют около 77% от ущерба, приходящегося на долю всех инфекционных болезней. Значительные убытки связаны как с прямыми расходами на лечение и реабилитацию, так и с косвенными потерями производственного характера, вызванными снижением производительности труда и сокращением прибыли предприятий. Из общего числа случаев временной нетрудоспособности на грипп и ОРВИ приходится 12-14% [2, 4].

Кроме того, гриппозная инфекция может вызвать скрытый, трудно поддающийся учету ущерб, связанный с тяжелыми клиническими осложнениями со стороны нервной и сердечно-сосудистой систем, а также с обострением хронических заболеваний (сахарный диабет, сердечная недостаточность, хронические обструктивные бронхопневмонии и т.п.), и стать причиной отсроченной смерти, особенно у детей до двух лет, пожилых людей и лиц с ослабленным здоровьем [5].

Вирус гриппа относится к семейству *Orthomyxoviridae*, в которое входит пять родов: грипп А, В, С, D (*Thogotovirus*) и *Isavirus*. Геномы вирусов гриппа А и В структурно схожи, они состоят из 8 геномных сегментов РНК негативной полярности, которые кодируют 12 белков и названы по продукту, транслируемому с основной открытой рамки считывания: PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M и NS [6]. Полимеразный комплекс PB2, PB1, PA транскрибирует одну мРНК с каждого геномного фрагмента, транслируемую в одноименный белок. Кроме того, мРНК геномных сегментов M и NS подвергается сплайсингу, кодируя белки M2 и NEP в дополнение к белкам M1 и NS1 соответственно. У отдельных штаммов с альтернативной рамки считывания сегмента PB1 транслируется белок PB1-F2 [7]. Все белки, за исключением NS1 и PB1-F2, являются структурными компонентами вирусных частиц. Неструктурный белок NS1 накапливается в цитоплазме зараженных клеток и выполняет функцию ингибитора системы интерферона. Предполагается, что белок PB1-F2 функционирует как проапоптотический фактор, который ингибирует функцию иммунокомпетентных клеток [8].

Сегментированность генома вируса гриппа служит неисчерпаемым источником новых штаммов, которые формируются в результате реассортации. Вирионы реассортантов содержат геномные сегменты от разных штаммов, относящихся к одному роду. Реассортация является одним из механизмов, лежащих в основе антигенного разнообразия вирусов гриппа в природе и возникновения гриппозных пандемий. Антигенные свойства вируса гриппа определяются поверхностными гликопротеинами – гемагглютинином (HA) и нейраминидазой (NA). На поверхности вируса HA и NA представлены шипами, образованными тримерами HA и тетрамерами NA. В процессе репликации вируса происходит расщепление (активация) HA клеточными протеазами на две субъединицы – HA1 и HA2, которые остаются соединенными дисульфидной связью [9]. Эктодомен HA состоит из

двух частей: глобулярной, образованной субъединицей HA1, и стволовой, которая состоит в основном из субъединицы HA2 и частично HA1. Глобулярная часть включает рецептор-связывающий сайт и пять антигенных сайтов и является основной мишенью для образования антител. Антитела, блокирующие связывание вируса с рецептором, являются нейтрализующими [10]. Для субъединицы HA1 характерна высокая изменчивость. Стволовая часть HA расположена в непосредственной близости от вирусной мембраны и отличается слабой иммуногенностью [11]. Субъединица HA2 играет основную роль в обеспечении слияния вирусной мембраны с эндосомальной и отличается высокой консервативностью. В соответствии с антигенной специфичностью, к настоящему моменту для вируса гриппа А известно 18 подтипов HA и 11 подтипов NA [12]. Подтипы HA H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17, H18 относят к первой группе, а H3, H4, H7, H10, H14 и H15 – ко второй группе. При этом только подтипы H1, H2 и H3 вируса гриппа А и различные антигенные варианты вируса гриппа В циркулируют в человеческой популяции, вызывая пандемии и сезонные эпидемии гриппа.

Специфический иммунитет, вырабатываемый после перенесенного заболевания или вакцинации одним подтипом вируса гриппа А, слабо защищает от заражения другим подтипом. Иммунитет к любому подтипу вируса гриппа А не защищает от вируса гриппа В, и наоборот, иммунизация против гриппа В неэффективна в отношении вируса гриппа А.

Лучшим средством предотвращения распространения гриппозной инфекции считается вакцинация. За последние 60 лет разработано множество вариантов живых и инактивированных гриппозных вакцин, имеющих определенные преимущества и недостатки, однако ни один из известных препаратов не решает проблемы контроля над заболеваемостью гриппом. Основная причина низкой эффективности гриппозных вакцин кроется в высокой изменчивости возбудителя. В основе необычайно быстрой изменчивости вируса гриппа, а значит, и его ускользания от действия нейтрализующих антител лежат два механизма: 1) накопление точечных мутаций, ведущих к изменению антигенной структуры поверхностных гликопротеинов (антигенный дрейф), и 2) реассортация геномных сегментов. Они приводят к появлению новых антигенных вариантов вируса (антигенный шифт), которые могут вызывать пандемию.

Для всех гриппозных вакцин, применяемых на современном этапе, характерна низкая эффективность при иммунизации пожилых людей и маленьких детей [13-16]. Кроме того, эти вакцины защищают от циркулирующих штаммов только в случае совпадения эпидемического вируса с вакцинным штаммом по антигенным свойствам. Именно высокой изменчивостью поверхностных антигенов вируса гриппа, HA и NA, обусловлена необходимость проведения ежегодной вакцинации и обновления состава вакцин.

Следует отметить, что сезонные вакцины, формируемые на основании рекомендаций ВОЗ, неэффективны в случае внезапного появления нового пандемического штамма, кардинально отличающегося от всех циркулирующих вариантов, как это произошло в 2009 г. при появлении пандемического вируса A/California/7/2009 (H1N1pdm09). Еще одним примером может служить низкая эффективность компонента H3N2 сезонной вакцины 2014 г., обусловленная появлением нового антигенного варианта этого подтипа в результате антигенного дрейфа [17]. Известны случаи инфицирования людей птичьими вирусами подтипов H5N1, H7N9, H9N2, H6N1, H7N3 и H10N8. Передачи птичьих вирусов от человека к человеку пока не наблюдалось, хотя при моделировании инфекции у хорьков было показано, что всего несколько мутаций в генах, кодирующих белки PB1, PB2 и HA, могут привести к появлению трансмиссивного варианта [18-20]. Учитывая высокую патогенность некоторых из этих вирусов с летальностью, достигающей 50% (вирусы подтипов H5N1 или H7N9), их распространение представляет чрезвычайную опасность. В связи с этим существует настоятельная необходимость в создании универсальной гриппозной вакцины, вызывающей широкий кросс-протективный длительный иммунитет, способный противостоять всем известным вирусам гриппа А и В. В настоящее время известно несколько примеров создания кросс-реактивных моноклональных антител, нейтрализующих HA как I, так и II группы вирусов гриппа А, а также антител, реагирующих как с вирусами гриппа А, так и В [21]. Эти факты позволяют надеяться на возможность создания универсальной гриппозной вакцины.

Защитная роль антител к консервативным антигенам вируса гриппа

Основной гуморальный иммунный ответ при гриппозной инфекции направлен против поверхностного гликопротеина HA, и главным образом – против наиболее изменчивой глобулярной его части, которая входит в состав субъединицы HA1 [22]. Белок HA выполняет две основные функции: связывание с клеточной мембраной для проникновения вируса в клетку и слияние вирусной и клеточной мембран, которое происходит в эндосомах [23]. При закислении эндосом происходит изменение конформации HA с выдвижением пептида слияния и появлением на поверхности тримера HA скрытых ранее участков второй субъединицы, HA2. Несмотря на постоянную изменчивость поверхности HA, участки его стволовой части, ответственные за слияние мембран, остаются консервативными на протяжении десятилетий, сохраняя свою функциональность. Кроме HA2, внутренние белки вириона вируса гриппа (полимеразы, NP, M1 и M2) также имеют участки консервативных последовательностей. Эти консервативные фрагменты полипептидных цепей упомянутых белков могут быть использованы при конструировании универсальной вакцины. В действительности большинство

антител, направленных против консервативных участков внутренних белков, не обладает нейтрализующей активностью *in vitro* в реакциях торможения гемагглютинирующей активности (РТГА) или нейтрализации [24], но, хотя антитела с данной специфичностью не предотвращают заражения организма вирусом, они могут приводить к торможению инфекционного процесса. Так, антитела к стволовой части HA могут блокировать слияние вирусной и эндосомальной мембран [25]. Антитела к структурным белкам могут вызывать опосредованный комплементом лизис инфицированных клеток и антителозависимую клеточную цитотоксичность (antibody-dependent cell cytotoxicity, ADCC) [26]. Взаимодействие натуральных киллеров (natural killers, NK) CD16 с Fc-фрагментом антител приводит к выделению гранзимов В или перфорина и элиминации зараженных клеток путем апоптоза [27]. Таким образом, антитела, участвующие в ADCC, могут индуцировать ускоренный клиренс вируса из тканей респираторного тракта, что приводит к быстрому выздоровлению больных гриппом.

Клеточный иммунитет при гриппозной инфекции

Хотя клеточный иммунитет также не предотвращает инфекции вирусом гриппа, он может существенно влиять на репродукцию вируса, снижая тяжесть заболевания и смертность. Известно, что Т-лимфоциты (CD4⁺ и CD8⁺) преимущественно узнают эпитопы наиболее консервативных белков вируса гриппа, поэтому при их эффективной презентации возможно формирование кросс-протективного иммунного ответа [28]. На животных моделях показано, что клеточный ответ играет защитную роль как при гомологичной, так и при гетерологичной инфекции [29-35]. Работы по изучению адаптивного переноса Т-клеток от праймированных мышей неиммунным реципиентам подтверждают роль клеток CD4⁺ и CD8⁺ в обеспечении защиты [36]. У людей защитная роль предсуществующих вирусоспецифических Т-клеток CD8⁺ и CD4⁺ также показана при экспериментальной [37, 38] и естественной инфекции пандемическим вирусом подтипа H1N1 2009 года [39]. Т-клетки CD4⁺ контролируют гриппозную инфекцию за счет продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов, лизиса инфицированных клеток и хелперной функции в отношении В-лимфоцитов и клеток CD8⁺ [27, 40, 41]. Кроме того, клетки CD4⁺ также играют важную роль в образовании и поддержании клеток памяти [42]. Показано, что Т-клетки CD8⁺ определяют ускоренное выведение вируса из организма [43], поэтому универсальная вакцина должна вызвать CD8⁺ Т-клеточный ответ [44]. Для эффективной индукции CD8⁺-ответа необходима продукция вирусных белков в цитоплазме зараженных клеток с последующим представлением CD8⁺-эпитопов в составе молекул главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, MHC) I класса. Наиболее

важную роль в обеспечении CD8⁺ Т-клеточного ответа при гриппозной инфекции играют белки вируса гриппа NP и M1 [45].

Вакцинация пептидами, так же как и цельной или расщепленной инактивированной вакциной, вызывает антительный и CD4⁺ Т-клеточный ответ за счет представления антигена клетками МНС II класса. В отличие от пептидов, при вакцинации реплицирующимся вирусом за счет репродукции и синтеза вирусных белков происходит процессинг и презентация антигена клеткам МНС как I, так и II классов, обеспечивая полноценный гуморальный и клеточный иммунитет. При интраназальном введении вируса, кроме гуморального и клеточного иммунитета, индуцируется также мукозальный иммунитет. Таким образом, наиболее полноценный иммунитет, близкий к ответу, формирующемуся при естественной инфекции, можно получить только при вакцинации живыми аттенуированными вакцинами или векторами, обеспечивающими цитоплазматический синтез вирусных белков. Кроме того, эффективная индукция Т-клеточного ответа может быть достигнута за счет механизма кросс-прайма при использовании таких адъювантов, как лиганды Toll-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLR) [46].

Основные подходы к созданию универсальной вакцины

Все лицензированные противогриппозные вакцины – инактивированные (цельновирионные, сплит или субъединичные) или живые (аттенуированные холодоадаптированные) – в основном направлены на создание иммунитета к глобулярной части HA. В соответствии с этим, основным суррогатным маркером их иммуногенности считаются титры антител, определяемые в РТГА или реакции нейтрализации.

В отличие от изменчивой глобулярной части, стволовая часть HA отличается консервативностью среди вирусов гриппа А (I и II группы) и В. Для антител, индуцированных к этому району HA, известно несколько механизмов как прямой, так и непрямой нейтрализации. Один из механизмов прямой нейтрализации связан с предотвращением конформационного изменения HA, которое необходимо для высвобождения пептида слияния и последующего объединения эндосомальной и вирусных мембран для доставки вирусного генома в клетку. Второй механизм прямой нейтрализации связан с предотвращением активационного расщепления HA на субъединицы HA1 и HA2 с помощью антител, взаимодействующих с участком HA в непосредственной близости от сайта расщепления [47]. В механизмах непрямо́й нейтрализации задействованы антителозависимая и комплементзависимая цитотоксичность [48, 49].

Антитела к стволу HA при вакцинации практически не образуются и выявляются в небольшом количестве только после естественной инфекции [22, 50-54]. Исключение составляет инфекция пандемическим вирусом H1N1pdm09: перенесенное заболевание приводит к появлению

кросс-реактивных антител, направленных к консервативным участкам субъединицы HA2 [54, 55].

Необходимо отметить, что антительный ответ к стволу HA может оказывать не только защитное, но и негативное, провоцирующее инфекцию действие. Так, за счет взаимодействия комплекса вирус-антитело с Fc-рецептором клетки облегчалось проникновение вируса в клетку, что приводило к усилению инфекционного процесса *in vitro* [56]. Отрицательная роль кросс-реактивных ненейтрализующих антител к стволу HA *in vivo* проявляется при повторной инфекции антигенно гетерологичным вирусом гриппа. Усиление инфекции респираторного тракта отмечалось после вакцинации животных и людей инактивированной вакциной при последующем заражении гетерологичным штаммом [57-60]. Так, после двукратной иммунизации свиней цельновирионной инактивированной вакциной против гриппа H1N1 с адъювантом при последующем инфицировании вирусом H1N1pdm09 наблюдали усиление легочной патологии. При картировании эпитопов выявлено, что антитела, определяющие усиление, направлены к участку HA2 – с 32 по 77 аминокислотные остатки, – который находится в непосредственной близости от пептида слияния [61]. Необходимо отметить, что в параллельном эксперименте на свиньях вакцинация живой аттенуированной вакциной (холодоадаптированной или содержащей транскрибированный ген NS) не сопровождалась подобным усилением патологии при заражении H1N1pdm09 [62, 63].

Большинство разрабатываемых в настоящее время подходов к получению универсальной вакцины основано на использовании консервативных участков белков вируса гриппа. В Таблице 1 представлены собранные ВОЗ сведения об основных вирусных мишенях и предполагаемых механизмах действия вакцины, нацеленной на конкретную мишень [64]. При анализе первичной структуры белков различных штаммов обнаружено, что из одиннадцати белков пять (PB2, PB1, PA, NP и M1) содержат гомологичные участки длиной от 9 до 58 аминокислот для 80% штаммов вируса гриппа человека и птиц. Для белка HA известен участок из 9 аминокислотных остатков, который входит в состав пептида слияния (FGAIAFGIA) и идентичен для всех вирусов гриппа А [65].

Антитела к консервативным внутренним белкам PB2, PB1, PA, NP и M1 не относятся к нейтрализующим, но могут играть важную роль в обеспечении элиминации вируса за счет ADCC. Для белка NP показано, что он может быть временно экспрессирован на клеточной поверхности и поэтому антитела, индуцируемые этим белком, могут также обладать нейтрализующей активностью [66]. Кроме того, пептиды белка NP, презентированные на молекулах МНС I класса, представляют собой важнейшие мишени для цитотоксических клеток CD8⁺ [28].

Относительно высокая консервативность выявлена и для белка M2, образующего трансмембранный ионный канал. Участок белка M2 длиной в 23 аминокислотных остатка (M2e) находится на поверхности

Таблица 1. Вирусные мишени кросс-протективных гриппозных вакцин

Белок-антиген	Функциональная мишень	Предполагаемый механизм действия вакцины
Гемагглютинин (НА)	Связывание с клеточным сиаловым рецептором, слияние вирусной и клеточной мембран	Ингибирование слияния мембран, формирования структуры тримеров НА. Антителозависимая цитотоксичность.
Эктодомен белка М2 (М2е)	Ионный канал	Комлементзависимый лизис и атителозависимый лизис зараженных клеток.
Нейраминидаза (НА)	Освобождение созревающих вирусных частиц с клеточной поверхности	Ограничение распространения вирусной инфекции.
Матриксный белок (М1) Нуклеопротеин (NP)	Стимуляция Т-клеточного ответа	Лизис зараженных клеток CD8 ⁺ и CD4 ⁺ цитотоксическими лимфоцитами.

вирусной частицы и считается привлекательной мишенью для конструирования универсальной вакцины [67, 68]. Антитела к М2е также не нейтрализуют вирус, а действуют за счет ADCC. Наибольшее развитие (I фаза клинических испытаний) получил препарат, в котором несколько фрагментов М2е пришито к основному поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsAg) [69, 70].

Известно несколько примеров создания универсальной вакцины на основе субъединицы НА2. Трехкратная иммунизация мышей пептидами, представляющими эктодомен НА2 (23–185 аминокислотные остатки) или пептид слияния (1–38 аминокислотные остатки), в комбинации с адъювантами KLH (keyhole limpet hemocyanin) и Фрейнда индуцировала кросс-реактивный иммунитет, снижающий гибель животных при летальной инфекции гетерологичным штаммом [71].

Более эффективная защита развивалась при вакцинации химерными конструкциями НА. Grammer с соавт. показали, что гетеросубтипичный гуморальный иммунитет у мышей индуцируется при иммунизации химерными белками, содержащими глобулярные части НА от штаммов разных подтипов и одинаковую стволовую часть НА [72–76]. Так, иммунизация животных химерами с глобулярной частью НА подтипов H9, H6 и H5 и стволовой от вируса H1N1 (PR8/34, I группа) защищала животных от потери веса и гибели при заражении штаммами I группы подтипов H1N1, H5N1 и H6N1, но не защищала от вируса II группы подтипа H3N2. Аналогичные конструкции, содержащие стволовую часть НА от вируса II группы подтипа H3N2 и глобулярную часть от вирусов H4, H5 и H7, обладали протективной активностью при заражении животных как различными штаммами H3N2, так и вирусами II группы подтипов H7N1 и H10N7 [51]. Молекулярный механизм исследовали путем пассивного переноса антител от иммунных животных и показали, что антитела играют основную роль в обеспечении защиты. К недостаткам этого подхода следует отнести сложную схему иммунизации, которая включает электропорацию животных с помощью ДНК и двукратную иммунизацию белковыми конструкциями

внутримышечно и интраназально с адъювантом poly (I: C).

Другим примером служит использование стабильных конструкций (мини-НА), полученных генно-инженерным способом на основе аминокислотной последовательности стволовой части НА вируса подтипа H1N1. Из большой коллекции отбирали только конструкции с самой высокой аффинностью к антителам, обладающим нейтрализующей активностью широкого спектра. Иммунизация мышцей такими конструкциями также защищала животных от гибели при инфицировании штаммом I группы – высокопатогенным вирусом гриппа птиц подтипа H5N1 [77]. Стопроцентная защита мышцей от гибели достигалась в результате двукратной внутримышечной иммунизации очищенным белком мини-НА в дозе 30 мкг с адъювантом Matrix-M производства компании Novavax. Протективная эффективность этого препарата также доказана в эксперименте на яванских макаках (*cynomolgus monkey, Macaca fascicularis*) после трех внутримышечных иммунизаций 150 мкг белка с 50 мкг адъюванта Matrix-M (не лицензирован для людей): после заражения сублетальной дозой вируса A/Mexico/InDRE4487/2009 (H1N1) температура тела иммунизированных животных была гораздо ниже, чем в контрольной группе.

Еще одно из перспективных направлений в разработке универсальной гриппозной вакцины основано на создании самособирающихся наночастиц, которые, как показано ранее, значительно повышают иммуногенные свойства НА [78]. Наночастицы получали из генно-инженерных конструкций на основе нуклеотидной последовательности, кодирующей субъединицу НА2 вируса A/New Caledonia/20/1999. Использованный участок не содержал ни трансмембранной, ни цитоплазматической области НА2, но содержал дополнительные мутации, стабилизирующие тример. Для обеспечения самосборки к С-концу полученной структуры пришивали субъединицу белка ферритина, полученного из *Helicobacter pylori* [79]. В результате образовывались сферические частицы с 8 шипами на поверхности. Их протективную активность изучали на модели мышцей и хорьков.

Животным двукратно или трехкратно внутримышечно вводили наночастицы с добавлением нового адъюванта SAS (Sigma Adjuvant System). Индуцированные иммунизацией антитела детектировали в ИФА и определяли их специфичность. Показано, что антитела связывались со штаммами вирусов гриппа I группы (H1, H2, H5 и H9) и – в меньшей степени – с вирусами II группы (H3 и H7). Хотя антител, участвующих в РТГА, выявлено не было, обнаружили нейтрализующие антитела к вирусам A/California/04/2009 и A/Singapore/6/1986 подтипа H1N1. Антитела к вирусам подтипов H5N1, H2N2 и H9N2 не обнаружены ни у мышей, ни у хорьков. Несмотря на отсутствие нейтрализующих антител, как мыши, так и хорьки оказались полностью защищены от гибели при заражении высокопатогенным вирусом гриппа птиц подтипа H5N1.

Одна из современных технологий получения живой вакцины основана на конструировании вакцинного вектора, в котором один вирус экспрессирует антигены другого вируса. В качестве векторов, экспрессирующих гриппозные антигены, используют различные ДНК-содержащие вирусы, а именно: аденовирус [80], герпесвирус [81], бакуловирус [82] или поксвирус [83]. Так, при применении аденовирусного вектора показано, что трехкратная иммунизация плазмидой (50 мкг), содержащей последовательности консервативных белков NP и M2 вируса гриппа А, с последующим интраназальным заражением двумя аденовирусными векторами, экспрессирующими эти же белки, полностью защищала мышей и хорьков от гибели и потери веса при заражении вирулентным вирусом A/FM/1/47 (H1N1) или высокопатогенным штаммом вируса гриппа птиц подтипа H5N1 [84, 85]. В настоящее время известны разработки аденовирусных векторов, экспрессирующих консервативные антигены вируса гриппа для интраназальной иммунизации людей [86].

Все перечисленные подходы подтверждают возможность создания вакцины, которая будет защищать от заражения вирусами гриппа как первой, так и второй группы. Однако ни один из описанных выше препаратов не включает компонента, обеспечивающего защиту против вируса гриппа В. Вирусы гриппа А и В исходно были разделены на основе антигенных различий в белках NP и М. Гомология последовательностей этих белков между вирусами А и В составляет только 36% и 27% соответственно. Гомология между последовательностями HA и NA еще ниже и составляет 18% и 20% соответственно. Единственный участок HA, почти полностью совпадающий для вирусов обоих родов, – это пептид слияния, представленный последовательностью (L/I/F)FGAIAGFIE(G/N)GW. Показано, что антитела, полученные при иммунизации этим пептидом, связываются как с HA вируса А

(H1–H13), так и с вирусами В [85]. В стволовой части HA также обнаружен протективный эпитоп, кросс-реактивный между вирусами гриппа А и В. Моноклональное антитело CR9114, узнающее этот эпитоп, защищало мышей от инфекции вирусами гриппа А и В [87]. Кроме того, в пептиде слияния также идентифицированы Т-клеточные эпитопы CD4⁺ [69] и CD8⁺ (узнающий мотив HLA-A2.1) [88].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании анализа приведенных литературных данных можно говорить о возможности создания универсальной противогриппозной вакцины, способной обеспечивать защиту от всех известных антигенных вариантов вирусов гриппа А и В. В настоящее время в разработке находится целый ряд таких препаратов. Прогресс в этих исследованиях контролируется ВОЗ. В Таблице 2 представлены основные компании-разработчики и принципы действия разрабатываемых ими препаратов [89].

В идеале универсальная вакцина должна индуцировать антительный и Т-клеточный иммунный ответ к консервативным эпитопам вируса гриппа. Очевидно, что эффективность такой вакцины будет зависеть от спектра задействованных эпитопов и Th1-поляризации иммунного ответа. С точки зрения автора обзора, наиболее перспективным представляется конструирование живых интраназальных векторных вакцин с использованием самого вируса гриппа в качестве вектора для экспрессии консервативных антигенных детерминант. Такие вакцины способны вызывать усиленный Th1 системный и локальный мукозальный иммунный ответ во входных воротах инфекции. Полученные к настоящему времени результаты свидетельствуют, что векторная технология на основе модификаций сегмента NS вируса гриппа позволяет получать высокоиммуногенные рекомбинантные штаммы, экспрессирующие посторонние антигенные последовательности с рамки считывания белка NS1 [90–96]. Вирусы с модифицированным геном NS прошли клинические испытания, в которых показана их безопасность и высокая иммуногенность [97]. Векторные штаммы на основе вируса гриппа А, экспрессирующие участки HA2 вирусов А и В с рамки считывания белка NS1, обеспечивают защиту животных от гибели не только при заражении вирусами гриппа А других подтипов, но и вирусом гриппа В/Lee/40 после однократной иммунизации мышей (*неопубликованные данные*). Таким образом, конструирование гриппозных векторов, дополнительно экспрессирующих консервативные эпитопы вместе с белком NS1, представляется перспективным направлением для создания универсальной гриппозной вакцины.

Таблица 2. Статус разработки кандидатов на универсальную гриппозную вакцину

Компания-разработчик	Способ, мишень, адъювант	Фаза исследований			
		Доклини- ческая	1	2	3
Novartis (США)	Адъювант MF59				X
	Рациональный дизайн набора консервативных эпитопов HA2 для антительного ответа	X			
VaxInnate (США)	Белок, включающий M2 и флагеллин (лиганд TLR-5), добавка к сезонной вакцине			X	
Medicago (Канада)	Рекомбинантный HA в форме вирусоподобных частиц, получаемых в растениях табака (требует адъюванта)			X	
Immune Targeting Systems (Великобритания)	Пептидная коктейльная вакцина (HA, NP и M1) для праймирования перед вакцинацией сезонной вакциной			X	
BiondVax Pharmaceuticals (Израиль)	Пептидная коктейльная вакцина (HA, NP и M1) для праймирования перед вакцинацией сезонной вакциной			X	
SEEK (Великобритания)	Пептидная коктейльная вакцина: M1, NPA, NPВ и M2			X	
Flanders Institute (Бельгия)	Белок M2e, соединенный со структурным белком гепатита В		X		
Inovio (США)	ДНК-вакцина на основе HA, NA и NP		X		
Dynavax (США)	Соединенные белки NP и M2e		X		
Antigen Express (США)	Синтетические пептиды в контексте молекул МНС второго класса как добавка к сезонной вакцине		X		
National Institute of Allergy and Infectious Diseases (США)	Аденовирусный вектор, экспрессирующий HA, в комбинации с сезонной вакциной		X		
	HA в форме наночастиц	X			
Jenner Institute, University of Oxford (Великобритания)	Дефектный по репликации вектор MVA (Ankara)*, экспрессирующий NP и M1 с адъювантным эффектом		X		
	Не реплицирующийся аденовирус обезьян, экспрессирующий NP и M1, предназначен для сильного кросс-реактивного Т-клеточного ответа		X		
	MVA вектор, экспрессирующий NP и M1 и консервативный участок HA2	X			
Wistar Institute (США)	Белки M2e и NP, экспрессируемые аденовирусным вектором шимпанзе	X			
Gamma Vaccines (Австралия)	Цельновирсионная вакцина, инактивированная γ -излучением, для интраназального применения. Индуцирует кросс-протективный Т- и В-клеточный ответ; с адъювантным эффектом	X			
Florida Vaccine and Gene Therapy Institute (США)	Белковая вакцина на основе оптимизированного HA с адъювантом	X			
FluGen (США)	Дефектная по репликации аттенуированная вакцина с дефектом в белке M2	X			
University of Maryland, College Park (США)	Модифицированный рекомбинантный аттенуированный вирус гриппа, экспрессирующий HA с другого сегмента	X			
Icahn School of Medicine at Mount Sinai (США)	Множественные стратегии индукции иммунного ответа к стеблю HA; требует адъюванта	X			
CureVac (Германия)	Синтетическая мРНК, кодирующая HA и NP. Вызывает Т- и В-клеточный ответ; с адъювантным эффектом	X			
University of Pennsylvania (США)	Аденовирусный вектор, экспрессирующий моноклональное антитело против HA при интраназальном введении	X			
Sanofi Pasteur (США)	Белковая вакцина «оптимизированный HA»	X			
Georgia State University (США)	Эктодомен M2 в составе вирусоподобных частиц	X			
Merck (США)	Эктодомен M2 на белковом носителе KLH	X			
Bionor (Норвегия)	Пептидная вакцина	X			
VBI (ранее: Variation Biotechnologies)	Пептидная вакцина	X			
University of Wisconsin (США)	Стволовой участок HA вместе с белками NA и M1; наработка в клетках насекомых	X			

*MVA (Ankara) – аттенуированный штамм вируса осповакцины.

ЛИТЕРАТУРА

- Bhat N, Wright JG, Broder KR, Murray EL, Greenberg ME, Glover MJ, Likos AM, Posey DL, Klimov A, Lindstrom SE, Balish A, Medina MJ, Wallis TR, Guarner J, Paddock CD, Shieh WJ, Zaki SR, Sejvar JJ, Shay DK, Harper SA, Cox NJ, Fukuda K, Uyeki TM. Influenza-associated deaths among children in the United States, 2003-2004. *N Engl J Med* 2005; 353, 2559-67.
- Molinari NA, Ortega-Sanchez IR, Messonnier ML, Thompson WW, Wortley PM, Weintraub E, Bridges CB. The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs. *Vaccine* 2007; 25, 5086-96.
- Estimates of deaths associated with seasonal influenza - United States, 1976-2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010; 59, 1057-62.
- Girard MP, Cherian T, Pervikov Y, Kieny MP. A review of vaccine research and development: human acute respiratory infections. *Vaccine* 2005; 23, 5708-24.
- Shah NS, Greenberg JA, McNulty MC, Gregg KS, Riddell J, Mangino JE, Weber DM, Hebert CL, Marzec NS, Barron MA, Chaparro-Rojas F, Restrepo A, Hemmige V, Prasadthratsint K, Cobb S, Herwaldt L, Raabe V, Cannavino CR, Hines AG, Bares SH, Antiporta PB, Scardina T, Patel U, Reid G, Mohazabnia P, Kachhdiya S, Le BM, Park CJ, Ostrowsky B, Robicsek A, Smith BA, Schied J, Bhatti MM, Mayer S, Sikka M, Murphy-Aguilu I, Patwari P, Abeles SR, Torriani FJ, Abbas Z, Toya S, Doktor K, Chakrabarti A, Doblecki-Lewis S, Looney DJ, David MZ. Severe Influenza in 33 US Hospitals, 2013-2014: Complications and Risk Factors for Death in 507 Patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2015; 36, 1251-60.
- Zheng W, Tao YJ. Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. *FEBS Lett* 2013; 587, 1206-14.
- Buehler J, Navi D, Lorusso A, Vincent A, Lager K, Miller CL. Influenza A virus PB1-F2 protein expression is regulated in a strain-specific manner by sequences located downstream of the PB1-F2 initiation codon. *J Virol* 2013; 87, 10687-99.
- Zamarin D, Garcia-Sastre A, Xiao X, Wang R, Palese P. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog* 2005; 1, e4.
- Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 1994; 371, 37-43.
- Ekiert DC, Bhabha G, Elsliger MA, Friesen RH, Jongeneelen M, Throsby M, Goudsmit J, Wilson IA. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science* 2009; 324, 246-51.
- Krystal M, Elliott RM, Benz EW, Jr., Young JF, Palese P. Evolution of influenza A and B viruses: conservation of structural features in the hemagglutinin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79, 4800-4.
- Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen LM, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, Donis RO. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 2013; 9, e1003657.
- Jefferson T, Rivetti A, Di Pietrantonj C, Demicheli V, Ferroni E. Vaccines for preventing influenza in healthy children. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 8, CD004879.
- Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2011; 12, 36-44.
- Pfleiderer M, Trouvin JH, Brasseur D, Granstrom M, Shivji R, Mura M, Cavaleri M. Summary of knowledge gaps related to quality and efficacy of current influenza vaccines. *Vaccine* 2014; 32, 4586-91.
- Andersohn F, Bornemann R, Damm O, Frank M, Mittendorf T, Theidel U. Vaccination of children with a live-attenuated, intranasal influenza vaccine - analysis and evaluation through a Health Technology Assessment. *GMS Health Technol Assess* 2014; 10, Doc03.
- Skowronski DM, Chambers C, Sabaiduc S, De Serres G, Dickinson JA, Winter AL, Drews SJ, Fonseca K, Charest H, Gubbay JB, Petric M, Krajden M, Kwindt TL, Martineau C, Eshaghi A, Bastien N, Li Y. Interim estimates of 2014/15 vaccine effectiveness against influenza A(H3N2) from Canada's Sentinel Physician Surveillance Network, January 2015. *Euro Surveill* 2015; 20.
- Herfst S, Schrauwen EJ, Linster M, Chutinimitkul S, de Wit E, Munster VJ, Sorrell EM, Bestebroer TM, Burke DF, Smith DJ, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science* 2012; 336, 1534-41.
- Linster M, van Boheemen S, de Graaf M, Schrauwen EJ, Lexmond P, Manz B, Bestebroer TM, Baumann J, van Riel D, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Matrosovich M, Fouchier RA, Herfst S. Identification, characterization, and natural selection of mutations driving airborne transmission of A/H5N1 virus. *Cell* 2014; 157, 329-39.
- Imai M, Watanabe T, Hatta M, Das SC, Ozawa M, Shinya K, Zhong G, Hanson A, Katsura H, Watanabe S, Li C, Kawakami E, Yamada S, Kiso M, Suzuki Y, Maher EA, Neumann G, Kawaoka Y. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* 2012; 486, 420-8.
- Terajima M, Babon JA, Co MD, Ennis FA. Cross-reactive human B cell and T cell epitopes between influenza A and B viruses. *Virol J* 2013; 10, 244.
- Wrammert J, Smith K, Miller J, Langley WA, Kokko K, Larsen C, Zheng NY, Mays I, Garman L, Helms C, James J, Air GM, Capra JD, Ahmed R, Wilson PC. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal

- antibodies against influenza virus. *Nature* 2008; 453, 667-71.
23. Skehel JJ, Bayley PM, Brown EB, Martin SR, Waterfield MD, White JM, Wilson IA, Wiley DC. Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79, 968-72.
 24. Carragher DM, Kaminski DA, Moquin A, Hartson L, Randall TD. A novel role for non-neutralizing antibodies against nucleoprotein in facilitating resistance to influenza virus. *J Immunol* 2008; 181, 4168-76.
 25. Vareckova E, Mucha V, Wharton SA, Kostolansky F. Inhibition of fusion activity of influenza A haemagglutinin mediated by HA2-specific monoclonal antibodies. *Arch Virol* 2003; 148, 469-86.
 26. Terajima M, Co MD, Cruz J, Ennis FA. High Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Antibody Titers to H5N1 and H7N9 Avian Influenza A Viruses in Healthy US Adults and Older Children. *J Infect Dis* 2015; 212, 1052-60.
 27. Jegaskanda S, Job ER, Kramski M, Laurie K, Isitman G, de Rose R, Winnall WR, Stratov I, Brooks AG, Reading PC, Kent SJ. Cross-reactive influenza-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity antibodies in the absence of neutralizing antibodies. *J Immunol* 2013; 190, 1837-48.
 28. Thomas PG, Keating R, Hulse-Post DJ, Doherty PC. Cell-mediated protection in influenza infection. *Emerg Infect Dis* 2006; 12, 48-54.
 29. Kreijtz JH, de Mutsert G, van Baalen CA, Fouchier RA, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF. Cross-recognition of avian H5N1 influenza virus by human cytotoxic T-lymphocyte populations directed to human influenza A virus. *J Virol* 2008; 82, 5161-6.
 30. Kreijtz JH, Bodewes R, van Amerongen G, Kuiken T, Fouchier RA, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF. Primary influenza A virus infection induces cross-protective immunity against a lethal infection with a heterosubtypic virus strain in mice. *Vaccine* 2007; 25, 612-20.
 31. van de Sandt CE, Kreijtz JH, de Mutsert G, Geelhoed-Mieras MM, Hillaire ML, Vogelzang-van Trierum SE, Osterhaus AD, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF. Human cytotoxic T lymphocytes directed to seasonal influenza A viruses cross-react with the newly emerging H7N9 virus. *J Virol* 2013; 88, 1684-93.
 32. Hillaire ML, Vogelzang-van Trierum SE, Kreijtz JH, de Mutsert G, Fouchier RA, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF. Human T-cells directed to seasonal influenza A virus cross-react with 2009 pandemic influenza A (H1N1) and swine-origin triple-reassortant H3N2 influenza viruses. *J Gen Virol* 2012; 94, 583-92.
 33. Bodewes R, Kreijtz JH, Geelhoed-Mieras MM, van Amerongen G, Verburgh RJ, van Trierum SE, Kuiken T, Fouchier RA, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF. Vaccination against seasonal influenza A/H3N2 virus reduces the induction of heterosubtypic immunity against influenza A/H5N1 virus infection in ferrets. *J Virol* 2011; 85, 2695-702.
 34. Florek NW, Weinfurter JT, Jegaskanda S, Brewoo JN, Powell TD, Young GR, Das SC, Hatta M, Broman KW, Hungnes O, Dudman SG, Kawaoka Y, Kent SJ, Stinchcomb DT, Osorio JE, Friedrich TC. Modified vaccinia virus Ankara encoding influenza virus hemagglutinin induces heterosubtypic immunity in macaques. *J Virol* 2014; 88, 13418-28.
 35. Nakayama M, Shichinohe S, Itoh Y, Ishigaki H, Kitano M, Arikata M, Pham VL, Ishida H, Kitagawa N, Okamoto M, Sakoda Y, Ichikawa T, Tsuchiya H, Nakamura S, Le QM, Ito M, Kawaoka Y, Kida H, Ogasawara K. Protection against H5N1 highly pathogenic avian and pandemic (H1N1) 2009 influenza virus infection in cynomolgus monkeys by an inactivated H5N1 whole particle vaccine. *PLoS ONE* 2014; 8, e82740.
 36. Hillaire ML, van Trierum SE, Kreijtz JH, Bodewes R, Geelhoed-Mieras MM, Nieuwkoop NJ, Fouchier RA, Kuiken T, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF. Cross-protective immunity against influenza pH1N1 2009 viruses induced by seasonal influenza A (H3N2) virus is mediated by virus-specific T-cells. *J Gen Virol* 2011; 92, 2339-49.
 37. Wilkinson TM, Li CK, Chui CS, Huang AK, Perkins M, Liebner JC, Lambkin-Williams R, Gilbert A, Oxford J, Nicholas B, Staples KJ, Dong T, Douek DC, McMichael AJ, Xu XN. Preexisting influenza-specific CD4+ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans. *Nat Med* 2012; 18, 274-80.
 38. McMichael AJ, Gotch FM, Noble GR, Beare PA. Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *N Engl J Med* 1983; 309, 13-7.
 39. Sridhar S, Begom S, Bermingham A, Hoschler K, Adamson W, Carman W, Bean T, Barclay W, Deeks JJ, Lalvani A. Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. *Nat Med* 2013; 19, 1305-12.
 40. McKinstry KK, Strutt TM, Kuang Y, Brown DM, Sell S, Dutton RW, Swain SL. Memory CD4+ T cells protect against influenza through multiple synergizing mechanisms. *J Clin Invest* 2012; 122, 2847-56.
 41. Boonnak K, Subbarao K. Memory CD4+ T cells: beyond «helper» functions. *J Clin Invest* 2012; 122, 2768-70.
 42. Altenburg AF, Rimmelzwaan GF, de Vries RD. Virus-specific T cells as correlate of (cross-)protective immunity against influenza. *Vaccine* 2014; 33, 500-6.
 43. LaMere MW, Lam HT, Moquin A, Haynes L, Lund FE, Randall TD, Kaminski DA. Contributions of antinucleoprotein IgG to heterosubtypic immunity against influenza virus. *J Immunol* 2011; 186, 4331-9.
 44. Hillaire ML, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes as a basis for the development of broadly protective influenza vaccines. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011, 939860.
 45. Gianfrani C, Oseroff C, Sidney J, Chesnut RW, Sette A. Human memory CTL response specific for influenza

- A virus is broad and multispecific. *Hum Immunol* 2000; 61, 438-52.
46. Taylor DN, Treanor JJ, Sheldon EA, Johnson C, Umlauf S, Song L, Kavita U, Liu G, Tussey L, Ozer K, Hofstaetter T, Shaw A. Development of VAX128, a recombinant hemagglutinin (HA) influenza-flagellin fusion vaccine with improved safety and immune response. *Vaccine* 2012; 30, 5761-9.
 47. Steel J, Lowen AC, Pena L, Angel M, Solorzano A, Albrecht R, Perez DR, Garcia-Sastre A, Palese P. Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza. *J Virol* 2009; 83, 1742-53.
 48. Terajima M, Cruz J, Co MD, Lee JH, Kaur K, Wrammert J, Wilson PC, Ennis FA. Complement-dependent lysis of influenza A virus-infected cells by broadly cross-reactive human monoclonal antibodies. *J Virol* 2011; 85, 13463-7.
 49. Jegaskanda S, Weinfurter JT, Friedrich TC, Kent SJ. Antibody-dependent cellular cytotoxicity is associated with control of pandemic H1N1 influenza virus infection of macaques. *J Virol* 2013; 87, 5512-22.
 50. Moody MA, Zhang R, Walter EB, Woods CW, Ginsburg GS, McClain MT, Denny TN, Chen X, Munshaw S, Marshall DJ, Whitesides JF, Drinker MS, Amos JD, Gurley TC, Eudailey JA, Foulger A, DeRosa KR, Parks R, Meyerhoff RR, Yu JS, Kozink DM, Barefoot BE, Ramsburg EA, Khurana S, Golding H, Vandergrift NA, Alam SM, Tomaras GD, Kepler TB, Kelsoe G, Liao HX, Haynes BF. H3N2 influenza infection elicits more cross-reactive and less clonally expanded anti-hemagglutinin antibodies than influenza vaccination. *PLoS ONE* 2011; 6, e25797.
 51. Margine I, Hai R, Albrecht RA, Obermoser G, Harrod AC, Banchereau J, Palucka K, Garcia-Sastre A, Palese P, Treanor JJ, Krammer F. H3N2 influenza virus infection induces broadly reactive hemagglutinin stalk antibodies in humans and mice. *J Virol* 2013; 87, 4728-37.
 52. Corti D, Suguitan AL, Jr., Pinna D, Silacci C, Fernandez-Rodriguez BM, Vanzetta F, Santos C, Luke CJ, Torres-Velez FJ, Temperton NJ, Weiss RA, Sallusto F, Subbarao K, Lanzavecchia A. Heterosubtypic neutralizing antibodies are produced by individuals immunized with a seasonal influenza vaccine. *J Clin Invest* 2010; 120, 1663-73.
 53. Krammer F, Pica N, Hai R, Tan GS, Palese P. Hemagglutinin Stalk-Reactive Antibodies Are Boosted following Sequential Infection with Seasonal and Pandemic H1N1 Influenza Virus in Mice. *J Virol* 2012; 86, 10302-7.
 54. Pica N, Hai R, Krammer F, Wang TT, Maamary J, Eggink D, Tan GS, Krause JC, Moran T, Stein CR, Banach D, Wrammert J, Belshe RB, Garcia-Sastre A, Palese P. Hemagglutinin stalk antibodies elicited by the 2009 pandemic influenza virus as a mechanism for the extinction of seasonal H1N1 viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109, 2573-8.
 55. He XS, Sasaki S, Baer J, Khurana S, Golding H, Treanor JJ, Topham DJ, Sangster MY, Jin H, Dekker CL, Subbarao K, Greenberg HB. Heterovariant cross-reactive B-cell responses induced by the 2009 pandemic influenza virus A subtype H1N1 vaccine. *J Infect Dis* 2012; 207, 288-96.
 56. Tamura M, Webster RG, Ennis FA. Antibodies to HA and NA augment uptake of influenza A viruses into cells via Fc receptor entry. *Virology* 1991; 182, 211-9.
 57. Gauger PC, Vincent AL, Loving CL, Henningson JN, Lager KM, Janke BH, Kehrl ME, Jr., Roth JA. Kinetics of lung lesion development and pro-inflammatory cytokine response in pigs with vaccine-associated enhanced respiratory disease induced by challenge with pandemic (2009) A/H1N1 influenza virus. *Vet Pathol* 2012; 49, 900-12.
 58. Gauger PC, Vincent AL, Loving CL, Lager KM, Janke BH, Kehrl ME, Jr., Roth JA. Enhanced pneumonia and disease in pigs vaccinated with an inactivated human-like (delta-cluster) H1N2 vaccine and challenged with pandemic 2009 H1N1 influenza virus. *Vaccine* 2011; 29, 2712-9.
 59. Kitikoon P, Nilubol D, Erickson BJ, Janke BH, Hoover TC, Sornsen SA, Thacker EL. The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 112, 117-28.
 60. Vincent AL, Lager KM, Janke BH, Gramer MR, Richt JA. Failure of protection and enhanced pneumonia with a US H1N2 swine influenza virus in pigs vaccinated with an inactivated classical swine H1N1 vaccine. *Vet Microbiol* 2008; 126, 310-23.
 61. Khurana S, Loving CL, Manischewitz J, King LR, Gauger PC, Henningson J, Vincent AL, Golding H. Vaccine-induced anti-HA2 antibodies promote virus fusion and enhance influenza virus respiratory disease. *Sci Transl Med* 2013; 5, 200ra114.
 62. Vincent AL, Ma W, Lager KM, Richt JA, Janke BH, Sandbulte MR, Gauger PC, Loving CL, Webby RJ, Garcia-Sastre A. Live attenuated influenza vaccine provides superior protection from heterologous infection in pigs with maternal antibodies without inducing vaccine-associated enhanced respiratory disease. *J Virol* 2012; 86, 10597-605.
 63. Gauger PC, Loving CL, Khurana S, Lorusso A, Perez DR, Kehrl ME, Jr., Roth JA, Golding H, Vincent AL. Live attenuated influenza A virus vaccine protects against A(H1N1)pdm09 heterologous challenge without vaccine associated enhanced respiratory disease. *Virology* 2014; 471-473, 93-104.
 64. WHO Product Development for Vaccines Advisory Committee (PD-VAC) meeting – 2015. Available: http://who.int/immunization/research/meetings_workshops/pdvac/en/
 65. Heiny AT, Miotto O, Srinivasan KN, Khan AM, Zhang GL, Brusica V, Tan TW, August JT. Evolutionarily conserved protein sequences of influenza A viruses,

- avian and human, as vaccine targets. *PLoS ONE* 2007; 2, e1190.
66. Virelizier JL, Allison AC, Oxford JS, Schild GC. Early presence of ribonucleoprotein antigen on surface of influenza virus-infected cells. *Nature* 1977; 266, 52-4.
 67. Fiers W, De Filette M, El Bakkouri K, Schepens B, Roose K, Schotsaert M, Birkett A, Saelens X. M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine* 2009; 27, 6280-3.
 68. Stepanova LA, Kotlyarov RY, Kovaleva AA, Potapchuk MV, Korotkov AV, Sergeeva MV, Kasianenko MA, Kuprianov VV, Ravin NV, Tsybalova LM, Skryabin KG, Kiselev OI. Protection against multiple influenza A virus strains induced by candidate recombinant vaccine based on heterologous M2e peptides linked to flagellin. *PLoS ONE* 2015; 10, e0119520.
 69. Neiryck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med* 1999; 5, 1157-63.
 70. De Filette M, Ramne A, Birkett A, Lycke N, Lowenadler B, Min Jou W, Saelens X, Fiers W. The universal influenza vaccine M2e-HBc administered intranasally in combination with the adjuvant CTA1-DD provides complete protection. *Vaccine* 2006; 24, 544-51.
 71. Stanekova Z, Kiraly J, Stropkovska A, Mikuskova T, Mucha V, Kostolansky F, Vareckova E. Heterosubtypic protective immunity against influenza A virus induced by fusion peptide of the hemagglutinin in comparison to ectodomain of M2 protein. *Acta Virol* 2011; 55, 61-7.
 72. Krammer F, Palese P, Steel J. Advances in universal influenza virus vaccine design and antibody mediated therapies based on conserved regions of the hemagglutinin. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014; 386, 301-21.
 73. Krammer F, Hai R, Yondola M, Tan GS, Leyva-Grado VH, Ryder AB, Miller MS, Rose JK, Palese P, Garcia-Sastre A, Albrecht RA. Assessment of influenza virus hemagglutinin stalk-based immunity in ferrets. *J Virol* 2014; 88, 3432-42.
 74. Krammer F, Palese P. Universal influenza virus vaccines: need for clinical trials. *Nat Immunol* 2013; 15, 3-5.
 75. Krammer F, Palese P. Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines. *Curr Opin Virol* 2013; 3, 521-30.
 76. Krammer F, Pica N, Hai R, Margine I, Palese P. Chimeric hemagglutinin influenza virus vaccine constructs elicit broadly protective stalk-specific antibodies. *J Virol* 2013; 87, 6542-50.
 77. Impagliazzo A, Milder F, Kuipers H, Wagner MV, Zhu X, Hoffman RM, van Meersbergen R, Huizingh J, Wanningen P, Verspuij J, de Man M, Ding Z, Apetri A, Kukrer B, Sneekes-Vriese E, Tomkiewicz D, Laursen NS, Lee PS, Zakrzewska A, Dekking L, Tolboom J, Tettero L, van Meerten S, Yu W, Koudstaal W, Goudsmit J, Ward AB, Meijberg W, Wilson IA, Radošević K. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen. *Science* 2015; 349, 1301-6.
 78. Kanekiyo M, Wei CJ, Yassine HM, McTamney PM, Boyington JC, Whittle JR, Rao SS, Kong WP, Wang L, Nabel GJ. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies. *Nature* 2013; 499, 102-6.
 79. Yassine HM, Boyington JC, McTamney PM, Wei CJ, Kanekiyo M, Kong WP, Gallagher JR, Wang L, Zhang Y, Joyce MG, Lingwood D, Moin SM, Andersen H, Okuno Y, Rao SS, Harris AK, Kwong PD, Mascola JR, Nabel GJ, Graham BS. Hemagglutinin-stem nanoparticles generate heterosubtypic influenza protection. *Nat Med* 2015; 21, 1065-70.
 80. Coughlan L, Mullarkey C, Gilbert S. Adenoviral vectors as novel vaccines for influenza. *J Pharm Pharmacol* 2015; 67, 382-99.
 81. Dudek T, Knipe DM. Replication-defective viruses as vaccines and vaccine vectors. *Virology* 2006; 344, 230-9.
 82. He F, Madhan S, Kwang J. Baculovirus vector as a delivery vehicle for influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8, 455-67.
 83. Draper SJ, Cottingham MG, Gilbert SC. Utilizing poxviral vectored vaccines for antibody induction-progress and prospects. *Vaccine* 2013; 31, 4223-30.
 84. Price GE, Soboleski MR, Lo CY, Misplon JA, Pappas C, Houser KV, Tumpey TM, Epstein SL. Vaccination focusing immunity on conserved antigens protects mice and ferrets against virulent H1N1 and H5N1 influenza A viruses. *Vaccine* 2009; 27, 6512-21.
 85. Chun S, Li C, Van Domselaar G, Wang J, Farnsworth A, Cui X, Rode H, Cyr TD, He R, Li X. Universal antibodies and their applications to the quantitative determination of virtually all subtypes of the influenza A viral hemagglutinins. *Vaccine* 2008; 26, 6068-76.
 86. Sedova ES, Shcherbinin DN, Migunov AI, Smirnov Iu A, Logunov D, Shmarov MM, Tsybalova LM, Naroditskii BS, Kiselev OI, Gintsburg AL. Recombinant influenza vaccines. *Acta Naturae* 2013; 4, 17-27.
 87. Dreyfus C, Laursen NS, Kwaks T, Zuijdsgeest D, Khayat R, Ekiert DC, Lee JH, Metlagel Z, Bujny MV, Jongeneelen M, van der Vlugt R, Lamrani M, Korse HJ, Geelen E, Sahin O, Sieuwerts M, Brakenhoff JP, Vogels R, Li OT, Poon LL, Peiris M, Koudstaal W, Ward AB, Wilson IA, Goudsmit J, Friesen RH. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. *Science* 2012; 337, 1343-8.
 88. Kosor Krnic E, Gagro A, Drazenovic V, Kuzman I, Jeren T, Cecuk-Jelicic E, Kerhin-Brkljacic V, Gjenero-Margan I, Kaic B, Rakusic S, Sabioncello A, Markotic A, Rabatic S, Mlinaric-Galinovic G, Dekaris D. Enumeration of haemagglutinin-specific CD8+ T cells after influenza vaccination using MHC class I peptide tetramers. *Scand J Immunol* 2008; 67, 86-94.
 89. Status of Vaccine Research and Development of Universal Influenza Vaccine Prepared for WHO PD-VAC. Available: <http://who.int/immunization/>

- research/meetings_workshops/Universal_Influenza_VaccineRD_Sept2014.pdf
90. Tabynov K, Sansyzybay A, Kydyrbayev Z, Yespembetov B, Ryskeldinova S, Zinina N, Assanzhanova N, Sultankulova K, Sandybayev N, Khairullin B, Kuznetsova I, Ferko B, Egorov A. Influenza viral vectors expressing the Brucella OMP16 or L7/L12 proteins as vaccines against *B. abortus* infection. *Virol J* 2014; 11, 69.
 91. Sereinig S, Stukova M, Zabolotnyh N, Ferko B, Kittel C, Romanova J, Vinogradova T, Katinger H, Kiselev O, Egorov A. Influenza virus NS vectors expressing the mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein induce CD4+ Th1 immune response and protect animals against tuberculosis challenge. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13, 898-904.
 92. Stukova MA, Sereinig S, Zabolotnyh NV, Ferko B, Kittel C, Romanova J, Vinogradova TI, Katinger H, Kiselev OI, Egorov A. Vaccine potential of influenza vectors expressing Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein. *Tuberculosis (Edinb)* 2006; 86, 236-46.
 93. Kittel C, Ferko B, Kurz M, Voglauer R, Sereinig S, Romanova J, Stiegler G, Katinger H, Egorov A. Generation of an influenza A virus vector expressing biologically active human interleukin-2 from the NS gene segment. *J Virol* 2005; 79, 10672-7.
 94. Kittel C, Sereinig S, Ferko B, Stasakova J, Romanova J, Wolkerstorfer A, Katinger H, Egorov A. Rescue of influenza virus expressing GFP from the NS1 reading frame. *Virology* 2004; 324, 67-73.
 95. Ferko B, Stasakova J, Sereinig S, Romanova J, Katinger D, Niebler B, Katinger H, Egorov A. Hyperattenuated recombinant influenza A virus nonstructural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type 1 Nef-specific systemic and mucosal immune responses in mice. *J Virol* 2001; 75, 8899-908.
 96. Ferko B, Katinger D, Grassauer A, Egorov A, Romanova J, Niebler B, Katinger H, Muster T. Chimeric influenza virus replicating predominantly in the murine upper respiratory tract induces local immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in the genital tract. *J Infect Dis* 1998; 178, 1359-68.
 97. Wacheck V, Egorov A, Groiss F, Pfeiffer A, Fuehrer T, Hoeflmayer D, Kundi M, Popow-Kraupp T, Redlberger-Fritz M, Mueller CA, Cinatl J, Michaelis M, Geiler J, Bergmann M, Romanova J, Roethl E, Morokutti A, Wolschek M, Ferko B, Seipelt J, Dick-Gudenus R, Muster T. A novel type of influenza vaccine: safety and immunogenicity of replication-deficient influenza virus created by deletion of the interferon antagonist NS1. *J Infect Dis* 2009; 201, 354-62.