

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program:
Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor:
Speciální chemicko-biologické obory



Martina Satoriová

Inovativní vakcíny proti chřipkovému viru

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Alena Drda Morávková, Ph.D., MBA

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne

Děkuji své školitelce RNDr. Aleně Drda Morávkové, Ph.D., MBA za cenné rady, korektury a pomoc při zpracování bakalářské práce.

Obsah

Seznam zkratk.....	5
Abstrakt	6
1. Úvod.....	6
2. Orthomyxoviridae	7
3. Konvenční přístupy k chřipkovým vakcínám.....	11
3.1 Výběr kmenů pro vakcíny	11
3.2 Slabiny současných vakcín proti chřipkovému viru.....	12
4. Obměny stávajícího.....	14
4.1 Buněčné kultury	14
4.2 Reverzní genetika.....	16
4.3 Adjuvanty	17
4.4 Nové způsoby podání	18
4.4.1 Intradermální	19
4.4.2 Intranasální	19
4.4.3 Elektroporace a gene gun	20
4.5 Vysoké dávky hemagglutininu	20
5. Inovativní přístup	21
5.1 Bakulovirové expresní systémy.....	21
5.2 Viru podobné částice (VLPs)	21
5.3 Virové vektory.....	22
5.4 DNA vakcíny.....	22
6. Inovativní vakcíny s odlišným cílem.....	24
6.1 Vakcíny zaměřené na M1 protein.....	26
6.2 Vakcíny zaměřené na M2 protein.....	27
6.3 Vakcíny zaměřené na nukleoprotein	28
6.4 Vakcíny zaměřené na konzervovaný úsek HA.....	29
6.5 Kombinované vakcíny.....	31
7. Závěr.....	33
Seznam literárních zdrojů.....	34

Seznam zkratk

aa	Amino acid	Amino kyselina
Ad	Adenovirus	Adenovirus
CTL	Cytotoxic T lymphocyte	Cytotoxický T lymfocyt
DC	Dendritic cells	Dendritické buňky
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
HA	Hemagglutinin	Hemagglutinin
HA1	Hemagglutinin subunit 1	Hemagglutininová podjednotka 1
HA2	Hemagglutinin subunit 2	Hemagglutininová podjednotka 2
HPV	Human papillomavirus	Lidský papilomavirus
HSP70	Heat shock protein 70	Heat shock protein 70
IgG	Immunoglobulin G	Imunoglobulin G
ISAV	Infectious salmon anemia virus	Virus infekční anémie lososovitých
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin	Hemocyanin čeledi děrnatkovitých
L	Liposome	Liposom
mAbs	Monoclonal antibodies	Monoklonální protilátky
MAPs	Microtubule-associated proteins	Proteiny asociované s mikrotubuly
M1	Matrix protein 1	Matrixový protein 1
M2	Matrix protein 2	Matrixový protein 2
M2e	Ectodomain of matrix protein 2	Extracelulární doména membránového proteinu 2
MDCK	Madine-Darby canine kidney cells	Madin-Darbyho psí ledvinové buňky
NA	Neuraminidase	Neuraminidáza
nAbs	Neutralizing antibodies	Neutralizující protilátky
NP	Nucleoprotein	Nukleoprotein
NS1	Non-structural protein 1	Nestrukturní protein 1
NS2	Non-structural protein 2	Nesturkturní protein 2
PA, PB1, PB2	Polymerase acidic protein, Polymerase basic protein 1, Polymerase basic protein 2	Proteiny RNA polymerázového komplexu
PMK	Primary monkey kidney cells	Primární buňky z opičích ledvin
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleová kyselina
rNP	Recombinant nucleoprotein	Rekombinantní nukleoprotein
SA	Sialic acid	Sialová kyselina
TLR5	Toll-like receptor 5	Toll-like receptor 5
VLP	Virus-like particle	Viru podobná částice
VP22	Herpes simplex virus 1 protein VP22	Protein genu 22 lidského herpesviru 1
vRNA	Viral RNA	Virová RNA
vRNP	Viral ribonucleoprotein complex	Virový ribonukleoproteinový komplex
WHO	World Health Organization	Světová zdravotnická organizace

Abstrakt

Chřipkové viry ročně nakazí 3-5 milionů celosvětové populace, způsobí každoročně mnoho hospitalizací, 250 000-500 000 úmrtí a značné ekonomické ztráty. Nejúčinnější ochranou v boji s chřipkovými viry stále zůstávají vakcíny. Stávající vakcíny, produkované ve vejcích, jsou používány již přes 60 let. Ačkoliv jsou bezpečné, mají řadu nevýhod. Jejich hlavní nevýhodou je relativně nízká účinnost a časově omezená indukovaná imunita. Za nevýhodu lze také považovat nutnost každoroční aktualizace složení kvůli antigenní variabilitě povrchových proteinů viru. Navíc závislost na dodávce vajec a příliš dlouhá doba přípravy mohou být limitující a to obzvláště v případě pandemie. Vytvoření univerzální vakcíny, která by vyvolala imunitní odpověď vůči mnoha různým kmenům chřipkového viru a navodila dlouhotrvající ochranu, je tak celosvětovou prioritou.

Klíčová slova: chřipka, vakcíny

Abstract

Influenza viruses annually infect 3 to 5 millions of people worldwide, cause annually many hospitalizations, 250 000-500 000 deaths and significant economical losses. The vaccines still remain the most efficient way of prevention of this infectious disease. Conventional egg-based vaccines are used for more than 60 years. Although they are safe, they have many disadvantages. Their main disadvantage is the relatively low effectiveness and time-limited induced immunity. The need for annually updates of their composition due to an antigenic variability of viral surface proteins can be considered a disadvantage as well. What is more, the dependence on an egg supply and a way too long time of preparation might be limiting in the case of pandemic. The development of an universal vaccine that would induce a broad immune response against different strains of Influenza and longlasting protection is a worldwide priority.

Keywords: Influenza, vaccines

1. Úvod

Chřipka je akutní virové onemocnění způsobené virem chřipky (influenza virus), který můžeme rozdělit do tří rodů - A, B a C - na základě antigenních rozdílů mezi matrixovým proteinem a nukleoproteinem. Viry typu A se pak dále dělí do dalších podskupin dle kombinace povrchových proteinů viru. Nakažení typem C se objevují velmi sporadicky a to je důvod, proč jsou vakcíny zaměřeny pouze proti typům A a B (AUDSLEY & TANNOCK 2008).

Chřipka se vyskytuje celosvětově a ročně nakazí přibližně 5 až 10 % dospělých a 20 až 30 % dětí z celosvětové populace (AUDSLEY & TANNOCK 2008; Influenza fact sheet [online]). Nemoc může u rizikových skupin (u malých dětí, starších lidí a chronicky nemocných) vést až k hospitalizaci a úmrtí. Globálně dle WHO tyto roční epidemie způsobí průměrně 3 až 5 milionů onemocnění a kolem 250 000 až 500 000 úmrtí.

Bezpečné a relativně účinné vakcíny jsou používány již více než 60 let. Chřipkové vakcíny jsou nejúčinnější, pokud cirkulující viry odpovídají sérotypům, použitým při výrobě vakcíny. Viry ale podléhají neustálým antigenním změnám, a proto musí být použité vakcinační kmeny každoročně obměňovány dle právě kolujících kmenů viru na základě doporučení WHO¹.

Vakcíny i nadále zůstávají jednou z nejúčinnějších metod prevence chřipkových onemocnění. Nicméně, události na počátku tohoto tisíciletí nám ukázaly, že produkce vakcín by ani zdaleka nebyla při pandemii dostatečná k pokrytí celosvětových potřeb².

Celosvětovou prioritou v oblasti veřejného zdraví tak je nalezení nových vakcín, které by dokázaly navodit silnou a širokospektrální hostitelskou imunitu vůči chřipkovým virům.

V bakalářské práci se zaměřuji především na inovativní vakcíny a nové postupy v jejich přípravě.

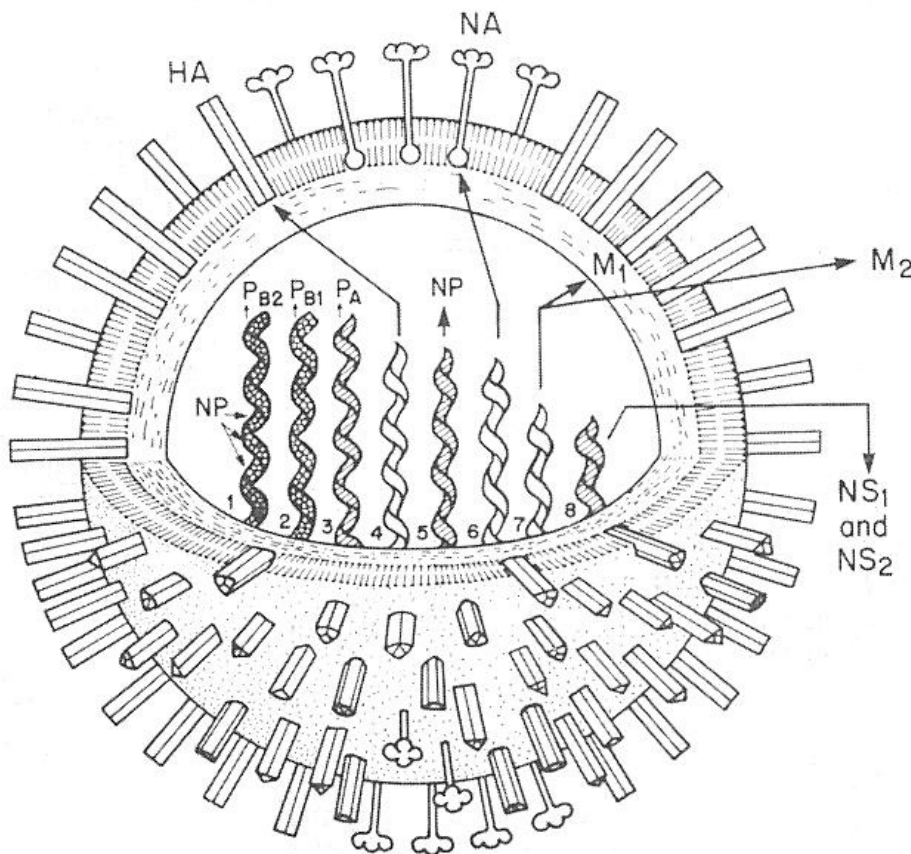
¹ WHO: Influenza fact sheet. Dostupné na: [<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs2011/en>]

² WHO: Global Action Plan for Influenza Vaccines: global progress report, January 2006 – September 2013. Dostupné na: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112307/1/9789241507011_eng.pdf?ua=1]

2. Orthomyxoviridae

Chřipkové viry jsou obalené, negativní jednořetězcové, segmentované RNA viry patřící mezi *Orthomyxoviridae* (NAYAK *et al.* 2009). Tato rodina se skládá z pěti rodů: *Influenzavirus A*; *Influenzavirus B*; *Influenzavirus C*; *Thogotovirus*, kam patří *Thogoto virus* a *Dhori virus*; a *Isavirus*, který zahrnuje virus infekční anémie lososovitých (ISAV) (PALESE & SHAW 2007).

Nejběžněji se vyskytujícím a také nejinfekčnějším virem chřipky je Influenza A. Struktura jeho virionu patří mezi jednu z nejlépe prostudovaných. Osm virových RNA segmentů Influenzy A kóduje 10 genových produktů. Těmi jsou PB1, PB2 a PA polymerázy, hemaglutinin (HA), nukleoprotein (NP), neuraminidáza (NA), matrixové M1 a M2 proteiny a nestrukturní NS1 a NS2 proteiny (Obr. 1) (WEBSTER *et al.* 1992; NAYAK *et al.* 2009).



Obr. 1: Diagram virionu Influenzy A. Glykoproteinové špičky jsou přibližně 16 nm dlouhé a jsou dvou typů: hemaglutinové (které převládají) a neuraminidázové (které se vyskytují ve shlucích). Pod lipidovou dvojvrstvou nalezneme osm segmentů jednořetězcové RNA. Každý z nich kóduje jeden (někdy dva) proteiny: 1. polymerázu PB2, 2. polymerázu PB1, 3. polymerázu PA, 4. hemaglutinin (HA), 5. nukleoprotein (NP), 6. neuraminidázu (NA), 7. matrixové proteiny M1 a M2 a 8. nestrukturní proteiny NS1 a NS2 (WEBSTER *et al.* 1992).

Patogenita chřipkového viru je multigenní a její determinanty se mohou mezi druhy lišit. HA protein u mnoha druhů hraje důležitou roli právě v míře patogenity (NEUMANN *et al.* 2009). HA, jeden z hlavních obalových proteinů, je 135 Å dlouhý trimer s vazebnými místy pro sialo-konjugátové receptory. Jako virový fúzní protein má HA dvě hlavní funkce a to přichycení k buněčným receptorům a membránovou fúzi (SKEHEL & WILEY 2002).

Replikace a transkripce virových RNA (vRNAs) se uskutečňuje s pomocí tří polymerázových podjednotek PB2, PB1, PA a nukleoproteinu (NP). Nově syntetizované virové ribonukleoproteinové (vRNP) komplexy jsou exportovány z jádra do cytoplazmy. Následně jsou vRNPs zkompletovány do virionů na plazmatické membráně (NEUMANN *et al.* 2009). NA, jeden z hlavních povrchových proteinů, je tetramer (VARGHESE *et al.* 1983) s enzymatickou aktivitou esenciální pro replikaci viru a infekci. NA protein také zprostředkovává uvolnění viru z infikovaných buněk odstraněním sialových kyselin z buněčných a virových HA a NA proteinů (NEUMANN *et al.* 2009). Pro přehlednost jsou jednotlivé proteiny a jejich funkce shrnuty v tabulce 1 níže.

Číslo segmentu a jím kódovaný protein	Funkce proteinu
1. PB2; 2. PB1; 3. PA	Komplex těchto tří proteinů zajišťuje virovou replikaci a transkripci. Společně v komplexu s NP replikují virovou RNA. PB2 může být při replikaci hostitelsky specifický.
4. HA	Vazba viru na receptory SA (sialovou kyselinu). Zprostředkovává vstup viru do buňky endocytózou a zajišťuje fúzi virového obalu s endozomální membránou. Specifické HA sekvence a struktury kontrolují specifickou vazbu k sialové kyselině. HA musí být proteolyticky štěpen, aby mohl plnit fúzní funkci. HA je hlavním cílem neutralizujících protilátek, změny struktury mají za následek úspěšné vyhnutí se imunitní odpovědi.
5. NP	Kontrola replikace virové RNA v komplexu s PB2, PB1 a PA. A také doprava do jádra a z jádra (NP obsahuje jaderný lokalizační signál) a ochrana RNA před degradací v cytoplazmě.
6. NA	Enzym štěpící terminální SA z glykoproteinů buněčného povrchu a glykokonjugátů virového původu. Jak specifita pro určité typy vazeb kyseliny sialové tak aktivita se mohou lišit, ale závisí na mutacích v enzymaticky aktivním místě a také na délce stopky držící ji nad

	membránou. Odštěpení SA od virového HA brání agregaci virionů. NA je cílem imunitních reakcí, proto existuje několik antigenních variant.
7. M1/M2	M1: Kontroluje transport virového ribonukleoproteinového komplexu do a z jádra. M1 je zapojeno do pučení RNPs na plazmatické membráně během formování virionů. M2: Funguje jako iontový kanál, skrz nějž vstupují při endocytóze H ⁺ ionty do virionu a navozuje M/NP disociaci, která dovoluje přenos RNP do jádra; mění pH Golgiho aparátu a umožňuje tak na kyselém prostředí citlivým HA molekulám projít neporušeně na buněčný povrch. Stejně jako M1 je zapojen do pučení virionů.
8. NS1/NS2	NS1: Váže a odděluje RNA, brání aktivaci PKA a buněčné apoptóze. NS2: Zapojuje se do jaderného exportu virových RNPs.

Tabulka 1: Virové proteiny Influenzy A a jejich funkce (upraveno podle PARRISH & KAWAOKA 2005).

V porovnání s většinou dalších virů respiračního ústrojí mají chřipkové viry dva mechanismy, které jim umožňují opakovaně infikovat lidskou populaci – antigenní drift a antigenní shift (PALESE & SHAW 2007).

Antigenní drift

Antigenní drift se objevuje jako důsledek bodových mutací u virů chřipky A i B. Tento pojem označuje menší pozvolné antigenní změny u HA a NA proteinů (PALESE & SHAW 2007). Mutace, zahrnující substituce, delece a inserce, jsou jedním z nejdůležitějších mechanismů pro vznik odlišností u chřipkových virů (WEBSTER *et al.* 1992). Mutace v aminokyselinových sekvencích pro HA a NA lidských virů se objevují s frekvencí nižší než 1 % ročně. I přesto tyto varianty virů mohou způsobit epidemie a typicky kolují po následující 2 až 5 let než jsou nahrazeny jinou variantou (PALESE & SHAW 2007).

Antigenní shift

Antigenní shift se týká velkých antigenních změn, při kterých dojde k zavedení nového podtypu HA nebo NA do (z tohoto hlediska) imunologicky naivní lidské populace. Tyto nové proteiny jsou imunologicky vzdálené antigenům virů kolujících předtím a v imunologicky naivní populaci infikují velké množství lidí, což vede k pandemiím. Antigenní shift je způsoben genetickým reassortmentem, kdy dojde k nahrazení celého genu pro hemagglutinin nebo neuraminidázu. Typicky se tak děje mezi lidskými a ptačími viry. Druhý mechanismus

antigenního shiftu je možný s pomocí přímého přenosu ptačího nebo prasečího viru na člověka a jejich ustálením v lidské populaci (PALESE & SHAW 2007).

Během posledních 100 let nastalo 5 pandemií: v roce 1918 tzv. Španělská chřipka způsobená H1N1 virem, která zavinila úmrtí asi 50 milionů lidí po celém světě (TAUBENBERGER & MORENS 2006; NEUMANN *et al.* 2009); v roce 1957 tzv. Asijská chřipka způsobená virem H2N2; v roce 1968 tzv. Hong Kongská chřipka způsobená virem H3N2; a pandemie Ruské chřipky v roce 1977, ke které vedl opětovný výskyt podtypu H1N1 (KILBOURNE 2006; TAUBENBERGER & MORENS 2006; PALESE & SHAW 2007) a v roce 2009 pandemie prasečí chřipky způsobená H1N1, která vedla k asi 18 600 laboratorně potvrzeným úmrtím.³ Nicméně odhadovaný počet úmrtí je až desetkrát vyšší.

³ WHO: External review of pandemic response. Dostupné na:
http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA64/A64_10-en.pdf?ua=1

3. Konvenční přístupy k chřipkovým vakcínám

Lidské vakcíny proti chřipce jsou dostupné více než 60 let (AUDSLEY & TANNOCK 2008). Konvenční metody pro produkci chřipkových vakcín vždy zahrnovaly růst virů v kuřecích embryích. To je velice těžkopádný a složitý proces. Každé vejce se před odběrem malého množství alantoidní kapaliny a jejím shromážděním před purifikací sterilizuje, prosvicuje, inokuluje virem a inkubuje. Pro výrobu jedné dávky vakcíny je zapotřebí jedno až dvě vejce (KISTNER *et al.* 1998). Z těchto důvodů není výroba vakcín zahrnující vejce dostatečně flexibilní, zejména z hlediska rychlosti produkce vakcíny. To je limitující obzvláště v případě hrozící pandemie (AUDSLEY & TANNOCK 2008).

3.1 Výběr kmenů pro vakcíny

Mezinárodní sledovací systém WHO monitoruje výskyt kmenů chřipkového viru, které jsou potencionálními součástmi vakcín proti chřipce pro danou sezónu. Epidemiologická data jsou vyhodnocována dvakrát ročně na dvou setkáních (v únoru pro severní polokouli a v září pro jižní). To umožňuje WHO vytvořit aktuální doporučení pro složení vakcín pro každoroční vakcinaci severní a jižní polokoule (GERDIL 2003). Po těchto setkáních mají výrobci vakcín přibližně 6 měsíců na jejich produkci a včasné dodání lékařům.

Půlroční cyklus přípravy vakcín zahrnuje:

1. určení cirkulujících kmenů viru WHO
2. přípravu reasortantů pro produkci vakcín
3. standardizování těchto virů
4. produkci jednotlivých složek vakcíny
5. testování účinnosti a bezpečnosti vakcíny při klinických studiích (pouze v Evropě)

Pro sezónu 2014/2015 i pro 2015/2016 jsou za chřipková onemocnění u lidí odpovědné především dva podtypy Influenzy A H3N2 a H1N1 a (GERDIL 2003) a dvě linie Influenzy B (Yamagata a Victoria) (GROHSKOPF *et al.* 2014).

WHO pro sezónu 2014/2015 doporučilo toto složení vakcín (pro severní polokouli)⁴:

- A/California/7/2009 (H1N1)pdm09
- A/Texas/50/2012 (H3N2)
- B/Massachusetts/2/2012

⁴ WHO: Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2014-2015 northern hemisphere influenza season. Poslední aktualizace 2014-02-24. Dostupné na:
[http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2014_15_north/en/]

- U kvadrivalentní vakcíny pak navíc ještě B/Brisbane/60/2008

Pro sezónu 2015/2016 je doporučeno WHO toto složení vakcín (pro severní polokouli)⁵:

- A/California/7/2009 (H1N1)pdm09
- A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)
- B/Phuket/3073/2013
- Pro kvadrivalentní vakcínu pak opět B/Brisbane/60/2008.

3.2 Slabiny současných vakcín proti chřipkovému viru

Jak již bylo výše řečeno, hlavní slabinou současných vakcín proti chřipce je systém jejich výroby s použitím vajec. Mezi hlavní problémy spojené s užíváním kuřecích zárodků patří: 1) poskytují pouze limitovanou flexibilitu pro zvýšení výroby vakcín; 2) mohou nastat různá přerušení v dodávce vajec kvůli přítomnosti různých onemocnění v hejnech nosnic; 3) možnost problémů se sterilitou během zpracování infikovaných alantoidních tekutin; 4) nízký růst některých reasortovaných vakcínových kmenů ve vejcích, jakkoli výtěžky na vejce adaptovaných virů jsou obvykle vysoké. Navíc, růst epidemických virů ve vejcích často způsobuje vyselektování variant, které se liší typem glykosylace od původních klinických izolátů (AUDSLEY & TANNOCK 2008). K již zmíněným problémům připočítejme také narůstající obavy z přítomnosti endogenních virů přenesených do produktů (živých atenuovaných vakcín) získaných z kuřecích vajec (PETRICCIANI 1991).

Jak již bylo zmíněno, v případě pandemie by byla dodávka vajec limitujícím faktorem pro výrobu vakcín. A tak techniky pro výrobu vakcín založených na buněčných kulturách nebo rekombinantních vakcín, které nejsou závislé na pravidelné dodávce kvalitního vaječného materiálu zvenčí, nabízejí značnou výhodu nad konvenčními vakcínami⁶.

HA a NA jsou povrchové proteiny chřipkového viru a většina neutralizujících protilátek je zaměřena právě proti nim. Z tohoto důvodu jsou tradiční vakcíny zaměřeny právě na tyto antigeny. Hlavní nevýhodou spoléhání na HA jako antigen je kmenová specifita vakcíny. Specifikum chřipkových virů je opravdu to, že vnější aminokyseliny (pozn. měnit se mohou všechny, ale právě na těch vnějších víc záleží z hlediska rozpoznání imunitním systémem) dvou hlavních glykoproteinů, HA a NA, se mohou, jak bylo řečeno výše, v procesu

⁵ WHO: Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2015-2016 northern hemisphere influenza season. Poslední aktualizace 2015-02-26. Dostupné na: [http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2015_16_north/en/]

⁶ WHO: Global Action Plan for Influenza Vaccines: global progress report, January 2006 – September 2013. Dostupné na: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112307/1/9789241507011_eng.pdf?ua=1]

antigenního driftu a shiftu měnit, což poté vyústí téměř každoročně v epidemii a v případě driftu v pandemii (FIERS *et al.* 2009).

4. Obměny stávajícího

Během několika posledních let byly zkoumány různé strategie hledající inovativní způsoby, jak zlepšit chřipkové vakcíny a to buď směrem k vyšší a univerzálnější imunitní odpovědi, nebo ke snížení dávky antigenu a zachování bezpečnosti. Některé z těchto výzkumů již vedly k povolení nových chřipkových vakcín, jak sezónních tak i pre/pandemických, v různých zemích. Jiné jsou ve fázi vývoje (DURANDO *et al.* 2011).

4.1 Buněčné kultury

Přiměřenou náhradou za kuřecí embrya by mohlo být množení viru v buněčných kulturách. To by poskytlo několik výhod v porovnání s vejci. V první řadě všechny kroky výroby probíhají za sterilních podmínek a snižuje se tak možnost kontaminace materiálu, která je spojená s růstem virových kultur ve vejcích. Díky tomu dochází i k snížení nepříznivých vedlejších účinků vakcíny (GROHSKOPF *et al.* 2014). Vakcíny produkované v buněčných kulturách by také měly být účinnější, jelikož se více podobají běžným divokým kmenům viru. Robertson *et al.* (1991) ukázali, že viry lidské chřipky ve vejcích selektují varianty, které mají aminokyselinové substituce v hemaglutinových shlucích kolem receptor-vazebného místa. Takovéto varianty jsou často antigenně vzdálené sobě navzájem a také od virů izolovaných v savčích buňkách. HA přirozeně se vyskytujícího viru je relativně homogenní a v podstatě je shodný s virem izolovaným v laboratoři na MDCK buňkách. Zatímco varianty izolované ve vejcích jsou v klinickém materiálu přítomné pouze v malém množství (ROBERTSON *et al.* 1991). Výhody vakcín pěstovaných na buněčných kulturách jsou uvedeny v tabulce 2.

Dalším benefitem je také možnost podání vakcíny osobám s alergií na vejce (GROHSKOPF *et al.* 2014; AUDSLEY & TANNOCK 2008). U osob s alergií na vejce se doposud podání vakcín řešilo podle jednoduchého schématu. Pokud osoba neměla v běžném životě žádnou alergickou reakci po pozření lehce vařených vajec, postupovalo se dle obvyklého protokolu. Při lehčích i těžších alergických reakcích se osobám ve věku 18-49 let podává rekombinantní trivalentní chřipková vakcína. U ostatních dochází k podání inaktivované vakcíny. V obou případech je pak potřeba dohled po následujících 30 minut po vakcinaci (GROHSKOPF *et al.* 2014).

Nové buněčné linie, které mají sloužit pro tyto účely, musí být plně v souladu s regulačními požadavky. Ty zahrnují především proliferaci do vysokých hustot a to i v suspenzních kulturách v médiu bez živočišných složek a možnost přípravy vysokých titrů viru (FENG *et al.* 2011).

Buněčné linie, které jsou v současné době využívány pro výrobu vakcín, jsou založeny především na ledvinových buňkách kočkodana zeleného (Vero), Madin-Darbyho psích ledvinových buňkách (MDCK), PER.C6 linii (buňky z lidské fetální sliznice) (KATZ & WEBSTER 1989), WI-38 (lidská diploidní buněčná linie), MRC5 (sekundární lidské plicní fibroblasty) a PMK buňkách (primární buňky z opičích ledvin) (PERDUE *et al.* 2011).

Ačkoliv byl objev Vero a MDCK buněčných linií pro produkci chřipkových vakcín významný, jejich neznámá minulost, co se týče transformujících událostí, spolu s jejich požadavky pro pevnou matrix podporu pro růst v bioreaktorech, je činí méně atraktivními kandidáty pro výrobu chřipkových vakcín (PAU *et al.* 2001).

Tato technologie se již používá k produkci některých vakcín v USA, včetně vakcín proti následujícím: rotavirům, poliomyelitidě, neštovicím, hepatitidě, zarděnkám a planým neštovicím. Od listopadu roku 2012 je v USA dostupná vakcína Flucelvax, která se tak stala první v USA licensovanou (trivalentní inaktivovanou) chřipkovou vakcínou vytvořenou společností Novartis s pomocí buněčných (MDCK) kultur. Několik takových vakcín bylo již povoleno i v Evropské Unii.⁷ V České republice je takovou vakcínou Optaflu společnosti Novartis.⁸ V sezóně 2011/2012 byla dostupná také vakcína Preflucel (produkovaná ve Vero buňkách) společnosti Baxter, která byla později stažena z trhu pro své vedlejší účinky.⁹

Studie Tree *et al.* (2001) porovnávala data z pěstování chřipkového viru s pomocí různých (porózních a pevných) nosičů a výsledkem je, že nejvýhodnější je produkce viru v MDCK buňkách z optimalizovaného 1000litrového bioreaktoru za použití pevných mikronosičů (takovéto mikronosiče mají podobu mikrokuliček, přičemž jejich kultivační povrch je velmi vhodný k laboratornímu nebo i velkokapacitnímu pěstování i těch nejnáročnějších živočišných buněk). Výtěžek s touto technikou je srovnatelný s výtěžkem viru z 30 800 vajec (TREE *et al.* 2001).

Savčí buněčné linie však nejsou jediné, které jsou využívány pro výrobu vakcín. Různé studie nyní zapojují do přípravy vakcín i jiné systémy - hmyzí (COX & HOLLISTER 2009; COX 2012; KLAUSBERGER *et al.* 2014), rostlinné (METT *et al.* 2008; SHOJI *et al.* 2008; D'AOUST *et al.* 2008) či bakteriální (YANG *et al.* 2014). Od roku 2013 je v USA povolena

⁷Centers for Disease Control and Prevention. Cell-based Flu Vaccines. Dostupné na:
<http://www.cdc.gov/flu/protect/vaccine/cell-based.htm>

⁸Státní zdravotnický úřad. Očkování proti chřipce –sezóna 2014/2015. Dostupné na:
<http://www.szu.cz/tema/prevence/ockovani-proti-chripce-sezona-2014-2015-vaccination-against?lang=1>

⁹European Medicines agency. Preflucel. Dostupné na:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/referrals/Preflucel/human_referral_000320.jsp&mid=WC0b01ac0580024e99

trivalentní chřipková vakcína FluBlok společnosti Protein Sciences Corporation produkována v linii hmyzích buněk (*expresSF+*) odvozených od *Spodoptera frugiperda*.¹⁰

Potencionální výhody (hodnoceno + až +++)	Potencionální časové úspory	Potencionální zlepšení kvality	Potencionální zvýšení kvantity (peněžní úspory)
Jistota zásob: Buněčné linie mohou být pouze vyndány z mrazícího boxu -> nezávislost na dodávce vajec	+++	+++	+
Diverzita růstového substrátu (různé buněčné linie z různých živočišných druhů poskytují různé propagační vlastnosti, různá úspěšnost růstu viru)	+	++	+++
Dostupnost zařízení používaného pro buněčné kultury i pro jiná použití	+++	+	+++
Snadné navýšení produkční kapacity	+++	+	+++
Uzavřený sterilní výrobní proces -> žádné výdaje na živočišnou produkci, farmy, transport vajec, zpracování a podobně	+++	++	+++
Savčí replikační systém -> není nutná adaptace viru na vejce	++++	++	++
Potenciál pro zkrácení trvání produkčního cyklu	++++	++	++

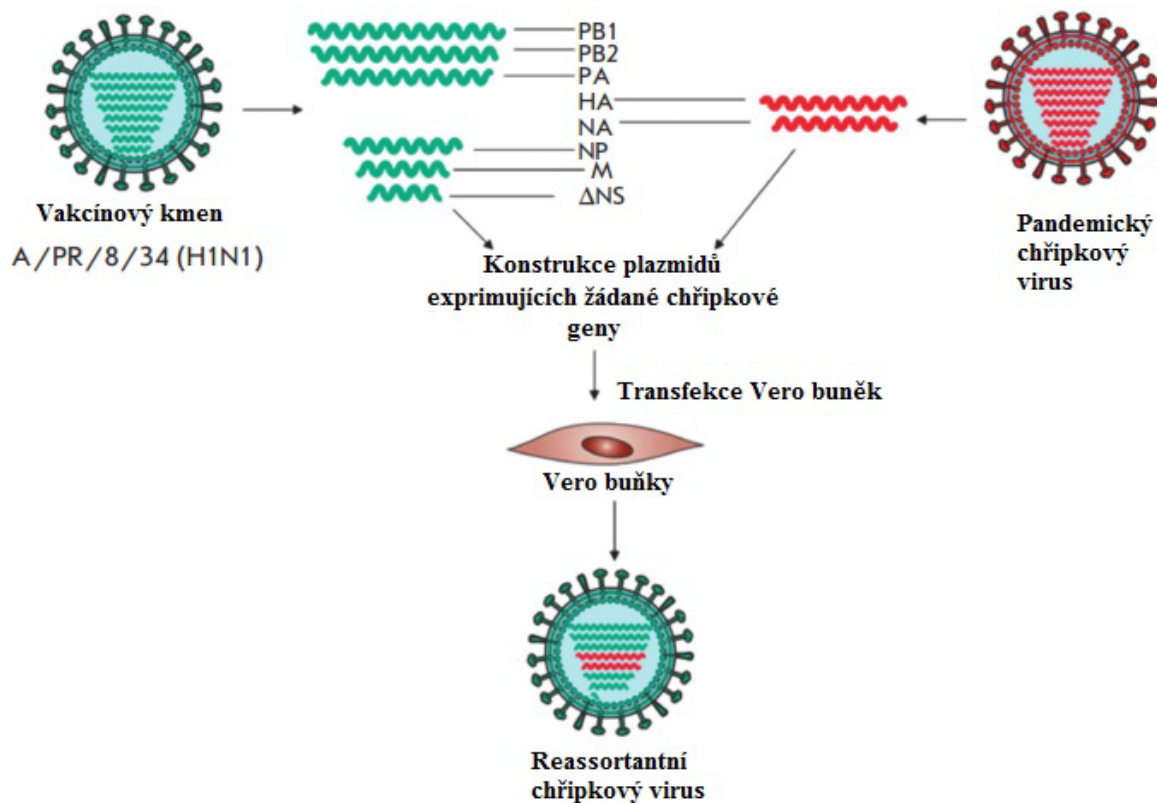
Tabulka 2: Výhody vakcín produkovaných v buněčných kulturách ve srovnání s vakcínami produkovanými ve vejcích. (PERDUE *et al.* 2011).

4.2 Reverzní genetika

Generace vakcín založená na virech definovaného genového složení může být vytvořena s pomocí reverzní genetiky (Obr. 2) (NEUMANN *et al.* 2005). Reverzní genetika je velmi

¹⁰ U.S. Food and Drug Administration: Flublok.
<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM336020.pdf>

užitečná, jelikož může urychlit výrobu typických reassortovaných sezónních a málo patogenních kmenů (ELLEBEDY & WEBBY 2009), ale její aplikace může být obzvláště výhodná během epidemií vysoce patogenních ptačích H5 a H7 kmenů (NEUMANN et al. 2005; SUBBARAO et al. 2003; WEBBY et al. 2004).



Obr. 2: Konstruování chřipkového viru pomocí metod reverzní genetiky (upraveno podle SEDOVA *et al.* 2012).

4.3 Adjuvanty

Vakcínové adjuvanty se používají již desítky let k posílení imunitních reakcí vůči antigenům podaným společně s adjuvancem (TRITTO *et al.* 2009) a to především k zvýšení účinnosti inaktivovaných a živých atenuovaných vakcín (ZHANG *et al.* 2015). Zařazení adjuvantů může posílit imunologickou paměť, snížit množství použitého antigenu pro úspěšnou imunizaci, snížit počet dávek vakcíny (TRITTO *et al.* 2009) a zlepšit imunitní odpověď u starších osob.

Optimální adjuvanty by měly být bezpečné, dobře tolerované, jednoduše připravitelné a to z jednoduchých a poměrně levných složek, biologicky odbouratelné, kompatibilní s mnoha různými vakcínovými antigeny a vhodné pro podání zároveň s antigenem (O'HAGAN & DE GREGORIO 2009).

V konečném produktu může být přítomný více než jeden adjuvant. Mohou být kombinovány s jedním antigenem a nebo se všemi antigeny ve vakcíně, nebo může být každý adjuvant kombinovaný s jedním určitým antigenem.¹¹

Různé biologické a chemické sloučeniny, molekuly a částice se během pre-klinických testů projevují jako adjuvanty; mezi nimi bakteriální produkty, minerální soli (hliníkové), emulze, mikročástice, nukleové kyseliny, malé molekuly, saponiny a liposomy. Nicméně, pouze několik z nich již získalo licenci (TRITTO *et al.* 2009). Používané adjuvanty a adjuvanty ve fázích vývoje jsou uvedeny v Tab. 3.

Kategorie adjuvantu	Typ
Minerální soli	Alum*
Olejovo-vodné emulze	MF59*, AS03*, AF03*, CoVaccineHT
Saponiny a glykolipidy	QS-21, ISCOMATRIX, Alpha-GalCer (alfa-galaktosylceramid)
Liposomy	Virosomy*, CCS (ceramid karbamoylspermin), CAF01, Vaxfectin
Bakteriální toxiny/složky	Cholera toxin, LT (enterotoxin <i>E. coli</i>), Chitosan, flageliny <i>E. coli</i> a salmonely
Cytokiny	IL-12, IL-23, IL-28B (isoleuciny), GM-CSF, IFN α
TLR antagonisti/immunomodulátory	Syntetický lipid A, bakteriální flagelin, CpG (oligodeoxynukleotid), PolyI:polyC12U (syntetická dvojřetězcová RNA), IC31 (oligodeoxynukleotid), sLAG-3 (ligand pro MHC třídy II)
Biomedicínské polymery	PCPP (polyfosfazen)

Tabulka 3: Adjuvanty používané (označené *) a ve vývoji v kontextu chřipkových vakcín (DURANDO *et al.* 2011).

4.4 Nové způsoby podání

Podání vakcín můžeme rozdělit na dva typy: klasické injekční podání a „fyzikální“ podání, kam můžeme zařadit elektroporaci a tzv. gene gun (WANG & LU 2014).

¹¹ European Medicines Agency: Guideline on adjuvants in vaccines for human use. Dostupné na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003809.pdf

4.4.1 Intradermální

Lidské vakcíny jsou obvykle podávány injekčně a většina z nich je injikována do podkožního tuku nebo do svalstva pod kůží. Imunizace prostřednictvím kožní vrstvy – intradermálně, transkutánně nebo epidermálně – jsou vysoce atraktivní nejen díky snadnému přístupu ke kůži, ale také pro jedinečné imunologické vlastnosti tohoto orgánu (NICOLAS & GUY 2008). Každý z těchto způsobů aplikace (intramuskulární, podkožní, intradermální, epikutánní) vyžaduje přítomnost dendritických buněk (DC) ve tkáni. DC převezmou vakcínu, zpravují ji, transportují a prezentují ji T lymfocytům v lymfoidních orgánech (ROMANI et al. 2012; NICOLAS & GUY 2008). Intanza (Sanofi Pasteur) byla v Evropě povolena v roce 2009.¹² Jedná se o první trivalentní inaktivovanou intradermální chřipkovou vakcínu používající Soluvia™ mikroinjekční systém (Becton Dickinson) (PRYMULA et al. 2012). Výhodou užití takto krátké jehly (pouze 1,5 mm) je minimalizování rizika mechanického poškození nervů a krevních cév (DHONT et al. 2012).

4.4.2 Intranasální

Lidské tělo má přes 400 m² mukózního povrchu, který slouží jako bariéra vůči prostředí, ve kterém patogeny zahajují replikační procesy. Indukování imunitních odpovědí na této mukózní hranici je kritické pro prevenci potencionálně nebezpečných infekcí. Mukózní vakcinace nevyžaduje jehly (stačí pouze inhalace nebo pozření vakcinace), což ji činí obecně velmi atraktivní. Hodí se taky pro masovou imunizaci, jelikož pro její podání není zapotřebí trénovaného lékařského personálu. Nasální imunizace proti chřipce je v současnosti jediným způsobem mukózní vakcinace dýchacího traktu, který byl již povolen ke komerčnímu užití (ROSE et al. 2012). V roce 2003 byla v USA povolena trivalentní intranasální živá atenuovaná chřipková vakcína (FluMist)¹³; v roce 2011 pak byla povolena pod názvem Fluenz v Evropské Unii a v roce 2014 z marketingových důvodů z trhu stažena.¹⁴ Nyní je dostupná její kvadrivalentní verze pod názvem Fluenz Tetra.¹⁵

¹²European Medicines Agency: Intanza. Dostupné na:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000957/WC500033848.pdf

¹³U.S. Food and Drug Administration: Flumist. Dostupné na:
<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM123743.pdf>

¹⁴European Medicines Agency: Fluenz. Dostupné na:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Public_statement/2014/12/WC500177966.pdf

¹⁵European Medicines Agency: Fluenz Tetra. Dostupné na:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002617/WC500158415.pdf

4.4.3 Elektroporace a gene gun

Design a konstrukce DNA vakcín hrají nejdůležitější roli, co se týká výsledné imunogenicity DNA vakcíny. Během procesu elektroporace jsou DNA vakcíny nejprve podány klasicky injekčně a po tomto kroku následuje elektroporace s pomocí elektroporační jehly nebo elektrod (WANG & LU 2014). Použití elektroporace, bez ohledu na místo injekce, by mělo příznivě ovlivnit transfekci velkého množství různých buněk (WANG et al. 2008). Základním konceptem imunizace prostřednictvím gene gun je přímé dodání DNA plazmidů cílovým buňkám za využití urychlených částic fungujících jako nosiče vakcíny (WANG & LU 2014). Výsledkem je o mnoho vyšší úspěšnost transfekce. Obě metody jsou vysoce efektivní v indukování antigenně-specifické imunitní odpovědi a obě jsou imunogennější než tradiční injekční metoda (WANG et al. 2008).

4.5 Vysoké dávky hemagglutininu

S chřipkou spojená míra morbidity, úmrtnosti a hospitalizací zůstává i nadále vysoká a naopak i přes narůstající míru proočkování obyvatelstva se u starších osob (≥ 65 let) zvyšuje (McELHANEY et al. 2012). Lidský imunitní systém s věkem ochabuje, což staví starší populaci do velkého rizika spojeného s vážným průběhem chřipkových onemocnění (DIAZGRANADOS *et al.* 2013). Stárnutí také snižuje schopnost těla na očkování proti chřipce správně imunitně zareagovat (McELHANEY *et al.* 2012).

Pro zlepšení imunogenity chřipkové vakcíny u této části populace, byla vyvinuta vysokodávková trivalentní inaktivovaná vakcína, Fluzone HD. Tato vakcína firmy Sanofi Pasteur obsahuje čtyřnásobnou dávku (60mg) stejných antigenů jaké má klasická vakcína (FALSEY et al. 2009). Fluzone HD je bezpečná a dobře tolerovaná. Navozuje lepší imunitní reakce než standartní Fluzone vakcína (DIAZGRANADOS *et al.* 2013). Na základě toho získala v prosinci roku 2009 tato vakcína licenci ve Spojených státech.¹⁶

¹⁶ U.S. Food and Drug Administration: Approval Letter - Fluzone High-Dose. Dostupné na: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm195481.htm>

5. Inovativní přístup

5.1 Bakulovirové expresní systémy

Jednou z potencionálních alternativních metod pro produkci chřipkových vakcín je exprimování chřipkového HA za použití rekombinantních DNA technik (TREANOR *et al.* 2007). Bakulovirovo-hmyzí buněčné expresní systémy jsou dobře známým nástrojem pro výrobu komplexních proteinů (COX *et al.* 2012). Tento systém je obzvlášť vhodný pro produkci chřipkových vakcín díky rychlosti s jakou mohou být geny naklonovány a insertovány do vektorů. To usnadňuje aktualizování vakcín v pravidelných intervalech (TREANOR *et al.* 2007). Bakulovirové expresní systémy mají spoustu výhod, co se týká bezpečnosti, univerzálnosti a nákladové efektivity. Výroba nevyžaduje vejce, oslabený chřipkový virus, biokontrolu na vysoké úrovni a dodatečné purifikační kroky (YANG 2013). K tomu ještě připočteme překvapivě vysoké výtěžky proteinů, které jsou s tímto systémem možné a jež nám dávají příležitost k užití mnohem vyšších a potencionálně efektivnějších dávek vakcíny (TREANOR *et al.* 2007). Mezi takovéto vakcíny obsahující rekombinantní proteiny patří i vakcína Flublok, o které již byla zmínka v podkapitole Buněčné kultury.

5.2 Viru podobné částice (VLPs)

VLPs jsou nanočástice složené z neinfekčních podjednotek virových složek, které napodobují strukturu viru divokého typu (wild-type), ale neobsahují virový genetický materiál. Tudíž prezentují hostiteli sice celou ale neaktivní virovou částici (LÓPEZ-MACÍAS 2012). Co je však důležité zmínit, obsahují funkční virové proteiny odpovědné za úspěšný vstup viru do buňky. Stejně jako klasické viry, VLPs mohou být buď obalené nebo neobalené a sférické nebo vláknité. VLPs jsou systémem pro podání vakcín, který je bezpečný a zároveň silně imunogenní (CHROBOCZEK *et al.* 2014). Vedle žádoucích bezpečnostních prvků (nereplikování se, neinfekčnost), jsou VLPs schopné poskytnout univerzálnější rozsah ochrany proti různým antigenním variantám viru. Dokáží také vyvolat buněčnou imunitní odpověď, o které je známo, že navyšuje ochranu, což je obzvlášť výhodné u rizikových skupin jako jsou starší osoby (KANG *et al.* 2009).

Stránka *clinicaltrials.gov* uvádí několik chřipkových VLPs vakcín v různých fázích klinických testů, jmenovitě: pandemickou H5N1 VLP vakcínu (společnosti Novavax), H1N1 2009 VLP vakcínu a sezónní VLP vakcíny (trivalentní a kvadrivalentní, obě od společnosti Novavax), vakcíny produkované v rostlinných systémech proti H1, H5, H7 (společnosti

Medicago) a také H5-VLP + GLA-AF vakcínu (společnosti IDRI) (CHROBOCZEK *et al.* 2014).

5.3 Virové vektory

V současné době jsou vyvíjeny různé virové vektory, jako jsou rekombinantní atenuované nebo schopnost replikace postrádající viry, sloužící k podání chřipkových vakcín (LAMBE 2012). Virové vektory jsou rekombinantní viry s inkorporovaným požadovaným genem a kombinací různých regulačních prvků v jejich genomu (SEDOVA *et al.* 2012). Vakcinace rekombinantními vektory nabízí spoustu výhod oproti vakcinaci inaktivovanými chřipkovými viry. Inaktivované vakcíny navozují krátkodobou protilátkami zprostředkovanou imunitu, zatímco rekombinantní vektory vyvolávají dlouhotrvající imunitní odpovědi, které stimulují jak paměťové B tak T buňky (KOPECKY-BROMBERG & PALESE 2009).

Virové vektory musí být snadno geneticky manipulovatelné a schopné inkorporace velkých fragmentů cizích genů a epitopů (SEDOVA *et al.* 2012). Proteiny vektorů by neměly vyvolávat silnou imunitní reakci, jelikož by mohla interferovat s indukcí odpovědi vůči cizím proteinům a snížit tak úspěšnost vakcinace. U lidí by se také neměly předem vůči vektorům vyskytovat protilátky. To by zamezilo replikaci vektoru a následovně pak i navození imunitní reakce vůči cizím proteinům (KOPECKY-BROMBERG & PALESE 2009). V současné době je již tímto způsobem využíváno několika různých vektorů včetně Poxvirů, Adenovirů, Bakuloviru, Paramyxoviru, Rhabdoviru a dalších. Nicméně většina klinických pokusů, zaměřujících se na takto dodávané chřipkové vakcíny, využívá především poxvirových a adenovirových vektorů (TRIPP & TOMPKINS 2014).

5.4 DNA vakcíny

Plazmidové DNA vakcíny reprezentují poměrně novou a silnou alternativu ke konvenčním vakcínám (SMITH *et al.* 2004).

DNA vakcínové vektory se skládají z plazmidové kostry (složené z replikačního počátku a genu pro rezistenci vůči antibiotikům) a transkripční jednotky (obsahující silný promotér a transkripční terminační/polyadenylační sekvence) (WANG & LU 2014).

Výhodou DNA vakcín (obzvláště v případě chřipkové pandemie) je rychlost a jednoduchost produkce vakcíny v *E. coli* bez jakýchkoli zvláštních požadavků ohledně manipulace s patogenními viry, genetického reassortmentu, kuřecích vajec nebo buněčných kultur (SMITH *et al.* 2004). Jejich užitečnost pramení také z faktu, že nejsou infekční, nereplikují se, jsou extrémně stabilní a mohou být produkovány ve velkém množství a za nízkou cenu (KIM & JACOB 2009).

DNA vakcíny jsou dobře imunogenní u zvířecích modelů, u lidí však méně (WANG & LU 2014; KIM & JACOB 2009). Během posledních dvou desetiletí bylo vyvinuto několik vylepšení k navýšení imunogenity DNA vakcín. Mezi taková zdokonalení patří optimalizování designů DNA vakcín a vývoj nových způsobů podání vakcíny, které se vyvinuly z tradičních intramuskulárních a intradermálních injekcí až ke škále pokročilejších systémů zahrnujících genové dělo (gene gun) a elektroporaci. K dalšímu navýšení imunogenity těchto vakcín mohou sloužit různé molekulární adjuvanty jako jsou chemokiny nebo cytokiny (ABDULHAQQ & WEINER 2008).

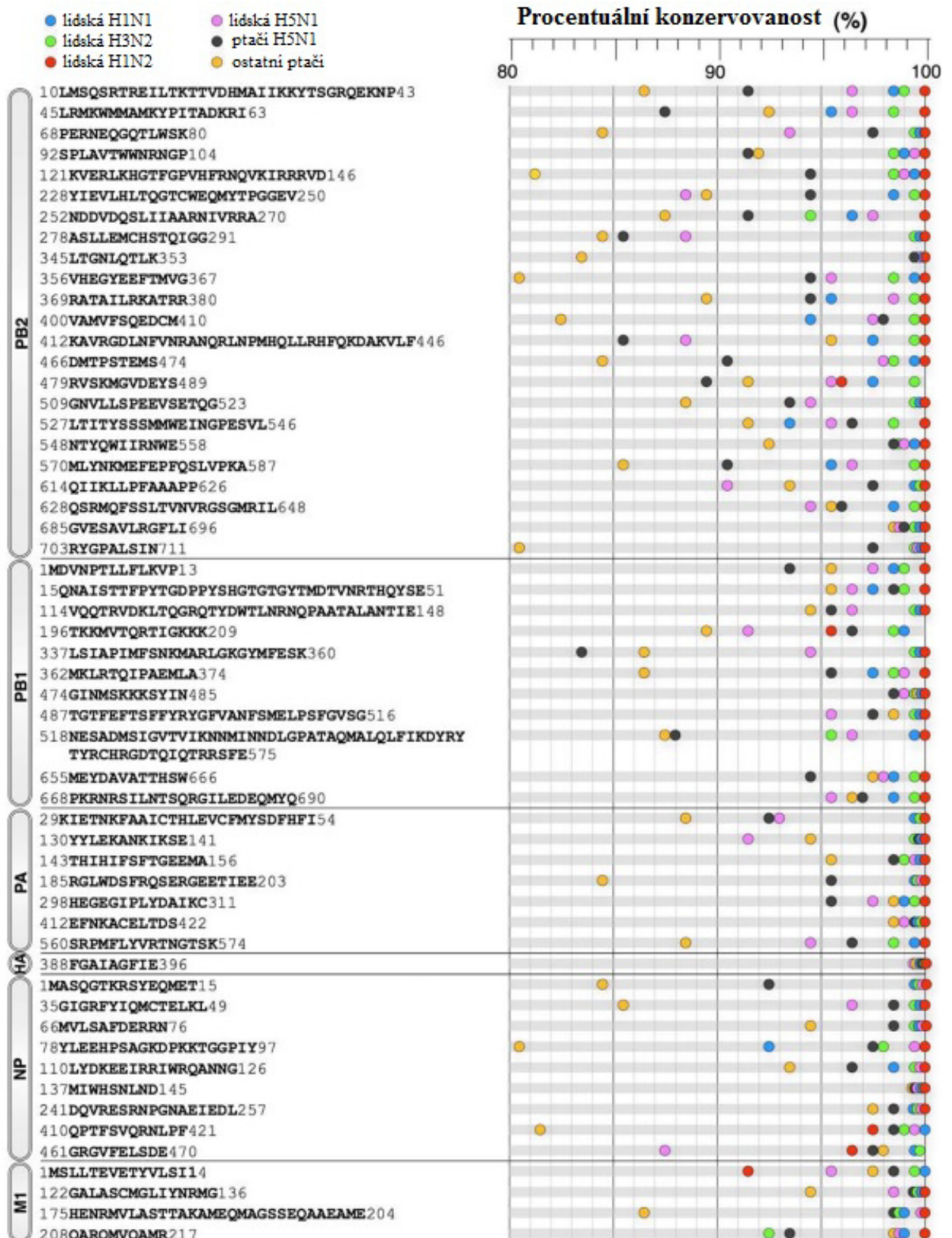
V současné době jsou DNA chřipkové vakcíny ještě ve fázi klinických testování.¹⁷

¹⁷ Nature Reviews Drug Discovery: Table 1: Overview of established and novel influenza virus vaccine technologies. Dostupné na: http://www.nature.com/nrd/journal/v14/n3/fig_tab/nrd4529_T1.html

6. Inovativní vakcíny s odlišným cílem

V porovnání s ostatními typy vakcín, jsou ty podjednotkové díky absenci infekčních virů nejbezpečnější. Podjednotkové vakcíny proti chřipkovým virům s pandemickým potenciálem jsou v různých fázích vývoje. Antigenem takových vakcín nemusí být nutně jen povrchové proteiny. PB2, PB1, PA, NP, M1 a M2 proteiny všech zaznamenaných virů chřipky A, ptačích i lidských, obsahují i přes rozdílnosti v evoluci, podtypech a hostitelských druzích, sekvence nízké variability a vysoké konzervovanosti (Obr. 3). Tyto sekvence se známou historií a relativně předpověditelnou budoucností, co se týče nízké variability jsou hlavními cíli pro na epitopech založené vakcíny (HEINY *et al.* 2007).

Univerzální chřipková vakcína, která aktivuje specifické paměťové buňky rozpoznávající konzervované části viru, by mohla být efektivní jak vůči sezónním variantám chřipky, tak vůči nově se vyvíjejícím potencionálně pandemickým kmenům. Taková vakcína bude muset zároveň obsahovat bezpečný a účinný adjuvant (MACLEOD *et al.* 2013) nebo využít jiné strategie pro zlepšení své účinnosti a imunogenity jako například fúze několika virových proteinů (ZHANG *et al.* 2015).



Obr. 3: Vysoce konzervované sekvenční viry Influenzy A u lidské H1N1, H3N2, H1N2, H5N1, u ptačí H5N1 a ostatních ptačích kmenů cirkulujících mezi lety 1997 a 2006. Region je považován za vysoce konzervovaný, pokud je identických alespoň 9 aa a to v 80 % nebo více procentech. Vysvětlivky barevných symbolů jsou ukázány v horní části obrázku (upraveno podle HEINY *et al.* 2007).

6.1 Vakcíny zaměřené na M1 protein

Matrixový protein (M1) chřipkového A viru tvoří střední vrstvu mezi virovým obalem, integrovanými membránovými proteiny a ribonukleoproteiny (RPNs) (NOTON *et al.* 2007; PALESE & SHAW 2007). M1 se skládá z 252 aminokyselinových zbytků (SHTYKOVA *et al.* 2013) a je to multifunkční protein, který hraje zásadní strukturní a funkční role v životním cyklu viru (NOTON *et al.* 2007; PALESE & SHAW 2007). Mezi ty patří: (a) interakce M1 s RNP a NS2 a regulace transportu RNP mezi cytoplazmou a jádrem; (b) regulace transkripce a replikace RNP; (c) interakce s virovými obalovými proteiny (HA, NA, M2); (d) kompletace virových komponent a iniciace pučení viru; (e) shromáždění hostitelských složek pro dokončení pučení viru a jeho uvolnění (NAYAK *et al.* 2004).

M1 protein je lokalizovaný spíš uvnitř viru než na jeho povrchu a není tak dobrým cílem pro navození tvorby neutralizujících protilátek. U již infikovaných buněk, jsou ale části tohoto proteinu vystavovány v MHC I kontextu a tedy volba tohoto proteinu pro aktivaci CTL důležitých pro překonání infekce je opodstatněná (OKUDA *et al.* 2001).

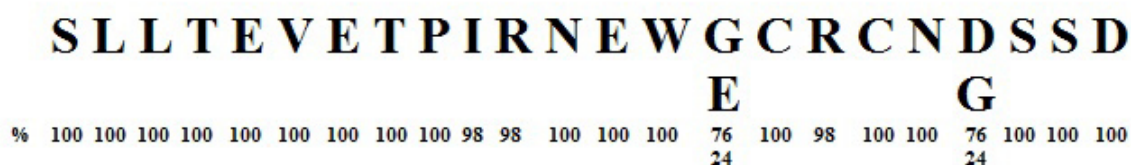
Téměř 100% konzervovanost některých úseků M1 mezi viry Influenzy A (HEINY *et al.* 2007) je velmi lákavá. Využitím M1 různými způsoby pro výrobu vakcín se zabývá mnoho studií s různou úspěšností. Většinou se jedná o vakcíny konjugované s dalšími chřipkovými proteiny. DNA vakcíny kódující celý M protein (OKUDA *et al.* 2001) stejně jako plazmidové konstrukty kódující pouze konzervovanou část M1 proteinu poskytly úspěšně ochranu. Nicméně DNA vakcíny s více jak jedním epitopem různých virových proteinů by mohly lépe aktivovat imunitní odpověď (KUMAR *et al.* 2012). MVA-NP+M1 je vakcína využívající virový vektor. Skládá se z modifikovaného viru Vakcínie Ankara (MVA) exprimujícího fúzní protein složený z NP a M1. Tato vakcína je bezpečná a vysoce imunogenní (MULLARKEY *et al.* 2013; ANTROBUS *et al.* 2014). Její účinnost může být ještě navýšena primingem s pomocí rekombinantního adenoviru (Ad) (LAMBE *et al.* 2013). VLPs obsahující M1 a NA (QUAN *et al.* 2012), případně ještě HA (PUSHKO *et al.* 2005) jsou slibnými kandidáty. Stejně tak VLPs zahrnující GP5 (reprodukčního a respiračního syndromu prasat), HA a M1 proteiny je potencionálně strategií pro vývoj účinné vakcíny pro kontrolu tohoto syndromu stejně jako chřipkového viru (XUE *et al.* 2014).

6.2 Vakcíny zaměřené na M2 protein

V posledních letech se vědci a farmakologové soustředí na M2 protein. Nové vakcíny a léky zaměřené na tento protein by měly být univerzálnější než ty v současné době používané (EBRAHIMI & TEBIANIAN 2011; FIERS *et al.* 2009).

M2 je tvořen translací ze sestřižené mRNA odvozené od genového segmentu 7 chřipky, který také kóduje matrixový protein M1 (EBRAHIMI & TEBIANIAN 2011). M2 tvoří tetramery, které se vyznačují pH-navoditelnou proton transportní aktivitou. Regulují pH virové částice po absorpci viru do hostitelského endosomálního kompartmentu v počátku infekce a následovně váčků, které transportují virové transmembránové proteiny na buněčný povrch během pozdní fáze infekce (GERHARD *et al.* 2006).

Antigenní odchylky u chřipkového viru představují obrovský problém. Nicméně, extracelulární doména virem kódovaného M2 proteinu (M2e) je téměř neměnná u všech kmenů Influenzy A (NEIRYNCK *et al.* 1999). Tento podivuhodný stupeň strukturní konzervace M2e lze přičíst především genetické spojitosti s proteinem M1. Ten je nejkonzervovanějším proteinem Influenza A virů (GERHARD *et al.* 2006). Vnější doména, M2e, je 23 aminokyselin dlouhá (FIERS *et al.* 2004). Prvních 9 aa zbytků je téměř kompletně stejných u lidských i ptačích Influenza A virů. Sedm z 15 zbývajících aminokyselinových zbytků se může lišit podle toho, jestli se jedná o lidské nebo jiné Influenza A viry (NEIRYNCK *et al.* 1999).



Obr. 4: Vnější doména M2e je 23 aa dlouhá. Od roku 1933 bylo sebráno 55 různých M2e sekvencí izolátů lidské Influenzy A. Nejsou zahrnuty ty u nichž nebyl zjištěn přenos z člověka na člověka (A/HK/97, A/HK/99 H9N2; A/Hong Kong/1774/99 H3N2). Na obrázku je vyjádřena procentuální konzervovanost tohoto úseku mezi těmito izoláty (upraveno podle FIERS *et al.* 2004).

Nízká imunogenicita M2e může být překonána fúzí s vhodným nosičem. Tím mohou být například od viru Hepatitis B odvozené VLPs produkované v jednoduchých bakteriálních expresních systémech jako je *E. coli* (FIERS *et al.* 2009), HPV (lidský papillomavirus) VLPs, VLPs odvozené od RNA fága Q β (BESSA *et al.* 2008; IONESCU *et al.* 2006), dále konjugované vakcíny s KLH (Hemocyanin čeledi děrnatkovitých) nebo s vnějším membránovým komplexem *Neisseria meningitidis* (FAN *et al.* 2004).

Jak již bylo zmíněno dříve, M2e je atraktivním cílem mnoha výzkumů, které jej úspěšně využívají různými způsoby: De Filette *et al.* připojili modifikované formy leucinového zipu kvasinkového transkripčního faktoru k M2e (DE FILETTE *et al.* 2008), Ebrahimi & Tebianian spojili M2e peptid s HSP70 *Mycobacterium tuberculosis* poté jej insertovali do pQE-60 a exprimovali v *E. coli* (EBRAHIMI & TEBIANIAN 2010), Huleatt *et al.* vytvořili rekombinantní protein z TLR5 ligandu flagelinu a čtyř kopií M2e a exprimovali jej v *E. coli* (HULEATT *et al.* 2008). Stejně tak přinesly úspěch fúze M2e s glutation-S-transferázou jako antigenem (LIU *et al.* 2004) nebo liposomální M2e vakcíny (ERNST *et al.* 2006). A v neposlední řadě také DNA vakcína exprimující celý M2 (M2-DNA) poskytla širokospektrální ochranu proti testování letální chřipkou A (TOMPKINS *et al.* 2007).

Obrovskou výhodou M2e vakcín je bez pochyb konzervanost, která by potencionálně mohla umožnit navození imunity chránící proti jakémukoliv epidemickému nebo dokonce pandemickému chřipkovému kmenu, který by se mohl v lidské populaci objevit (FIERS *et al.* 2009).

6.3 Vakcíny zaměřené na nukleoprotein

NP, kódovaný RNA segmentem 5 Influenzy A, je 498 aa dlouhý (PORTELA & DIGARD 2002) a jeho struktura je převážně α -helikální. Každý monomer má zahnutý půlměsíkový tvar. Celková struktura NP může být rozdělená na dvě domény: hlavičku a tělo, které jsou spojené na třech místech polypeptidovými řetězci (YE *et al.* 2006).

NP Influenzy A, multifunkční RNA-vázající protein a hlavní proteinová složka RNP komplexu, je také relativně konzervovaný (ZHOU *et al.* 2010; NAHAMPUN *et al.* 2015). Širokospektrální chřipková vakcína proti mnoha virovým kmenům založená na virovém NP je cílem, kterému se věnuje mnoho výzkumů. Nedávné výsledky naznačují, že NP chřipky je přímo excelentním kandidátem pro vývoj univerzální vakcíny založené na vyvolání buněčné imunity (CARGNELUTTI *et al.* 2013).

Vakcinace s NP poskytují střídavě úspěšné i neúspěšné výsledky. V jedné z nedávných studií byl NP gen H3N2 chřipkového viru prasečího původu exprimován v endospermu kukuřice. Orální podání této vakcíny vyvolalo u myši úspěšně humorální imunitní odpověď (NAHAMPUN *et al.* 2015). Také vakcinace NP podaným s adjuvantem tvořeným z aluminiových solí, poskytuje ochranu i proti heterologním virům. Oproti tomu imunizace

s NP podaným s alum a detoxikovaným bakteriálním lipopolysacharidovým adjuvantem, monofosforylovaným lipidem A, poskytla pouze ochranu proti homolognímu virovému kmenu (MACLEOD *et al.* 2013). NP ve spojení s RAS indukuje vyšší celkové protilátkové titry než neadjuvantovaný protein (CARGNELUTTI *et al.* 2013). Mnoho dalších perspektivních studií testujících nejrůznější možnosti a postupy již proběhlo a stále probíhá. Jmenovitě například studie Huang *et al.* a Altstein *et al.* využívající NP rekombinantního viru vakcínie nebo experiment Li *et al.* z roku 2013 testující účinnost rekombinantního viru parainfluenzy 5 (PIV5) obsahující NP umístěný na různých pozicích PIV5 genomu (HUANG *et al.* 2012; ALTSTEIN *et al.* 2006; LI *et al.* 2013). Za zmínku stojí také NP DNA vakcíny, které jsou účinné v indukovaní širokého spektra buněčných imunitních reakcí (ULMER *et al.* 1998). VP22/NP DNA vakcinace (Protein genu 22 lidského herpesviru 1) s pomocí elektroporace poskytla ochranu proti heterosubtypovým chřipkovým kmenům (SAHA *et al.* 2006) a stejně tak DNA vakcína kódující NP se signální sekvencí tkáňového plasminogenového aktivátoru za použití plazmidového vektoru pVAX1 (LUO *et al.* 2008). Další ze studií zjišťovala schopnost rekombinantního adenovirového vektoru sérotypu 5 zesílit imunizaci nukleoproteinu. Ochrana byla podstatně silnější než DNA vakcinace samotná (EPSTEIN *et al.* 2005), nicméně adenovirový vektor AdC7 exprimující NP vykazoval určité zlepšení i oproti adenovirovému vektoru sérotypu 5 (ROY *et al.* 2007).

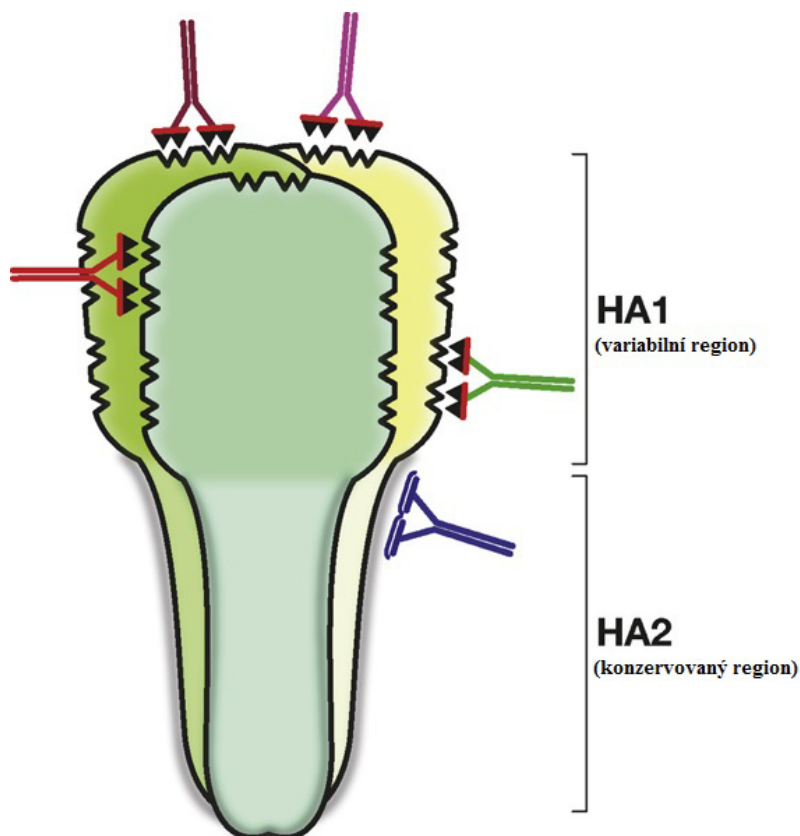
6.4 Vakcíny zaměřené na konzervovaný úsek HA

Povrchový protein hemagglutinin (HA) chřipkového viru je vysoce imunogenní a tak je obecně považován za vhodný antigen pro přípravu chřipkových vakcín (LUO *et al.* 2008). HA je hlavním determinantem rozpoznávaným hostitelským adaptivním imunitním systémem. Po infekci a replikaci následuje imunitní odpověď, která indukuje tvorbu nAbs. Ty vedou k selekci variant HA, které jsou schopné uniknout těmto nAbs. Aminokyseliny, kterých se to týká, se téměř výlučně nacházejí na hlavičce HA. Mnoho těchto změn je v genomu zafixováno (antigenní drift) (PALESE & SHAW 2007). HA je tedy vysoce antigenně variabilní, což snižuje jeho vhodnost pro užití ve vakcínách koncipovaných k poskytování širokospektrální ochrany (LUO *et al.* 2008).

HA je trimerická molekula tyčkovitého tvaru s uhlíkovým koncem vsunutým do virové membrány a hydrofilním koncem vyčnívajícím jako špička na povrchu viru. Hlavními funkcemi HA jsou aktivity spojené s vazbou receptorů a fúzí (PALESE & SHAW 2007). Každý HA polypeptid je během maturace viru proteolyticky štěpený na dva disulfidicky spojené řetězce, HA1 a HA2 (OKUNO *et al.* 1993). HA1 se skládá převážně z membráně-

distální receptor vázající a zbytkové esterázové domény. Jeho C- a N- terminální oblasti se rozšiřují směrem k virové membráně a jsou propletené s vnějším povrchem HA2. HA2 tvoří jádro fúzní mašinerie v oblasti stopky a je tvořen dlouhým centrálním CD helixem (zbytky 75-126), který formuje trimerický coiled-coil a kratší alfa helix (zbytky 38-58), který se sbaluje směrem k centrálnímu helikálnímu svazku (EKIERT *et al.* 2009).

Doména na stopce HA je oproti hlavové doméně konzervovaná mezi A i B chřipkovými viry (KRAMMER & PALESE 2013). Vakcína založená na tomto regionu by tudíž mohla vyvolat širokospektrální ochranou imunitní odpověď (WANG *et al.* 2010a). Tato skutečnost nám tak nabízí novou příležitost k indukovaní heterosubtypových odpovědí a přidává tak další cíl, na který se zaměřit, k těm již stávajícím jako jsou NP, M1 či M2 (HUGHES *et al.* 2012). V porovnání s HA1 podjednotkou, může být HA2 podjednotka méně imunogenní a nemusí vyvolávat produkci opravdu silných neutralizujících protilátek (ZHANG *et al.* 2015).



Obr. 5: Schéma chřipkového hemaglutininu ukazující konzervovaný HA2 a variabilní HA1 region. Obrázek ukazuje, že povrch, kde dochází ke kontaktu s protiláčkami, je u HA2 v podstatě „plochý“ a nedovoluje tak HA2 (ve srovnání s imunodominantním HA1 regionem s mnoha dutinami) vázat různé protilátky s vysokou afinitou (upraveno podle RAPPUOLI 2011).

Vývoj na HA2 založených vakcín nyní nabývá velkého významu díky informacím o anti-HA2 monoklonálních protilátkách (mAbs) s široce neutralizujícími účinky proti chřipkovým virům (WANG *et al.* 2010b). Mnohé z těchto protilátek proti stopce HA inhibují vstup viru do buňky tím, že zamezují pH-indukované konformační změně vedoucí k fúzi virové a endosomální membrány. Porozumění struktuře široce neutralizujících protilátek (nAbs) a jejich epitopů poskytuje rozhodující informace pro tvorbu efektivních a široce aplikovatelných vakcín (DREYFUS *et al.* 2013). Protilátka C179 byla izolována z myši po imunizaci H2N2 již v roce 1993 a stala se tak první anti-HA monoklonální Ab neutralizující více různých chřipkových podtypů (OKUNO *et al.* 1993). Sui *et al.* izolovali v roce 2009 rodinu širokospektrálních lidských nAbs proti HA, které ukázaly velkou účinnost jak *in vitro* tak *in vivo* proti vysoce patogením H5N1 a H1N1. Tyto protilátky inhibují proces fúze po přichycení viru tak, že rozpoznávají vysoce konzervované epitopy uvnitř stopky HA v momentě, kdy jsou klíčové elementy této konformační změny dány do těsné apozice (SUI *et al.* 2009) a brání tak změně konformace způsobené nízkým pH, která je vyžadovaná pro fúzi (WANG *et al.* 2010b).

Steel *et al.* 2010 popisují nový vakcínový koncept, který pracuje s konstruktem bez vysoce imunogenní globulární hlavy HA proteinu a prezentuje tak konzervovanou oblast stopky HA imunitním buňkám. Imunizace myši takovýmto bezhlavičkovým konstruktem v plazmidové DNA nebo VLP formě vyvolala, v porovnání s imunizací s celým HA, tvorbu imunního séra s širší reaktivitou (STEEL *et al.* 2009). Bommakanti *et al.* v roce 2010 ohlásili úspěšný design a popis rozpustného imunogenu, který se z velké části skládá z HA2 v konformaci při neutrálním pH. Jelikož je tento imunogen exprimován v *E. coli*, může být produkován levně a rychle ve velkém množství. Tento protein je u myši vysoce imunogenní, poskytuje ochranu proti homologním virům a lišícím se kmenům v rámci téhož podtypu (BOMMAKANTI *et al.* 2010). Syntetický peptidový konstrukt Wang *et al.* 2010 zaměřený na tvorbu protilátek proti stopkovému regionu HA, prokázal ochranou aktivitu proti antigeneticky vzdáleným virovým podtypům, které způsobují sezónní a pandemická onemocnění u lidí (WANG *et al.* 2010a).

6.5 Kombinované vakcíny

Ne úplně překvapivě studie ukázaly, že preventivní vakcína, která je zaměřena na indukování ochranné imunity vůči rychle mutujícím patogenům jako je virus chřipky, vyžaduje komplexní přístup, u kterého je potřeba zapojit více antigenů pro stimulaci různých částí imunitního systému najednou (ZHOU *et al.* 2010). Některé takové vakcíny byly již zmíněny

v předchozích kapitolách. Na další studie zabývající se konjugovanými vakcínami bych ráda upozornila v následujícím odstavci.

Ve studii Thueng-In *et al.* 2010 byly vakcíny tvořené celým rekombinantním NP a M2 viru H5N1 zachyceny zvlášť nebo společně do liposomu (L) vytvořeného z fosfatidylcholinu a cholesterolu. Vakcíny (L-NP, L-M2 nebo L-NP+M2) se prokázaly jako bezpečné a vysoce imunogenní. Výsledky naznačují, že ačkoliv tyto tři vakcíny vyvolávají odlišné imunologické efekty - L-M2 především humorální odpověď a v případě L-NP a L-NP+M2 CTL, mohou poskytnout ať už samostatně nebo jako kombinace imunitu vůči homologním i heterologním infekcím (THUENG-IN *et al.* 2010). Adenovirové vakcíny exprimující M2e a NP vyvolávají u myši silné NP-specifické CD8+ T-buněčné odpovědi a mírné protilátkové odpovědi vůči M2e sekvencím (H1N1, H5N1 a H7N2). Oočkované mladé myši byly chráněny proti mortalitě následující po vystavení vysokým dávkám různých chřipkových virů. U starých myši sice došlo k navození silných imunitních odpovědí, ale selhaly v ochraně před infekcí (ZHOU *et al.* 2010).

7. Závěr

Chřipkové viry ročně nakazí několik milionů lidí po celém světě, způsobí mnoho hospitalizací, úmrtí a značné ekonomické ztráty. A jako takové stojí ve středu celosvětového zájmu. Nejúčinnější ochranou v boji s chřipkovými viry jsou vakcíny. Tradiční vakcíny jsou zaměřeny především na vyvolání tvorby neutralizujících protilátek vůči povrchovým proteinům HA a NA. Obzvláště tyto proteiny ovšem podléhají antigennímu driftu a shiftu, proto je nutné konvenční vakcíny každoročně aktualizovat. Vytvoření univerzální vakcíny, která by vyvolala imunitní odpověď proti různým kmenům chřipkového viru a navodila dlouhotrvající ochranu, je cílem mnoha laboratoří po celém světě. Rozmanitost v předchozích kapitolách zmíněných studií a postupů v nich uvedených poukazuje na nezměrné možnosti, co se týče objevování a užívání nových metod a technologií, které v budoucnu zajisté povedou k vývoji takovéto univerzální chřipkové vakcíny. Univerzální vakcína zaměřující se na konzervované oblasti jednotlivých chřipkových proteinů se jeví v současnosti jako nejslibnější postup a obzvláště potom vakcíny založené na kombinaci těchto epitopů. V této práci byl podán přehled shrnující stávající i inovativní přístupy k produkci chřipkových vakcín a její cíle tak byly naplněny.

Seznam literárních zdrojů

- Abdulhaqq S.A., Weiner D.B. (2008): DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. *Immunol Res*, 42: 219-232.
- Altstein A.D., Gitelman A.K., Smirnov Y.A., Piskareva L.M., Zakharova L.G., Pashvykina G.V., Shmarov M.M., Zhirnov O.P., Varich N.P., Ilyinskii P.O., Shneider A.M. (2006): Immunization with influenza A NP-expressing vaccinia virus recombinant protects mice against experimental infection with human and avian influenza viruses. *Arch Virol*, 151: 921-931.
- Antrobus R.D., Berthoud T.K., Mullarkey C.E., Hoschler K., Coughlan L., Zambon M., Hill A.V.S., Gilbert S.C. (2014): Coadministration of Seasonal Influenza Vaccine and MVA-NP+M1 Simultaneously Achieves Potent Humoral and Cell-Mediated Responses. *Molecular Therapy*, 2, 1: 233-238.
- Audsley J.M., Tannock G.A. (2008): Cell-based Influenza Vaccines: Progress to date. *Drugs*, 68, 11: 1483.
- Bessa J., Schmitz N., Hinton H.J., Schwarz K., Jegerlehner A., Bachmann M.F. (2008): Efficient induction of mucosal and systemic immune responses by virus-like particles administered intranasally: implications for vaccine design. *Eur. J. Immunol.*, 38: 114-126.
- Bommakanti G., Citron M.P., Hepler R.W., Callahan Ch., Heidecker G.J., Najjar X.L., Lu X., Joyce J.G., Shiver J.W., Casimiro D.R., ter Meulen J., Liang X., Varadarajan R. (2010): Design of an HA2-based Escherichia coli expressed influenza immunogen that protects mice from pathogenic challenge. *PNAS*, 107, 31: 13701-13706.
- Cargnelutti D.E., Sanchez M.V., Alvarez P., Boado L., Mattion N., Scodeller E.A. (2013): Enhancement of Th1 immune responses to recombinant influenza nucleoprotein by Ribi adjuvant. *New Microbiologica*, 36: 145-151.
- Cox M.M.J. (2012): Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine*, 30: 1759-1766.
- Cox M.M.J., Hollister J.R. (2009): FluBlok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. *Biologicals*, 37: 182-189.
- D'Aoust M., Lavoie P., Couture M.M.J., Trépanier S., Guay J., Dargis M., Mongrand S., Landry N., Ward B.J., Vézina L. (2008): Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice. *Plant Biotechnology Journal*, 6: 930-940.
- De Filette M., Martens W., Roose K., Deroo T., Vervalle F., Bentahir M., Vandekerckhove J., Fiers W., Saelens X. (2008): Ann Influenza A Vaccine Based on Tetrameric Ectodomain of Matrix Protein 2. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 17: 11382-11387.
- Dhont P.A., Albert A., Brenders P., Podwapinska A., Pollet A., Scheveneels D., Tihon F., Verheyden I., Victor J., Samson S.I. (2012): Acceptability of Intanza 15µg Intradermal Influenza Vaccine in Belgium During the 2010-2011 Influenza Season. *Adv Ther*, 29, 6: 562-577.
- DiazGranados C.A., Dunning A.J., Jordanov E., Landolfi V., Denis M., Talbot H.K. (2013): High-dose trivalent influenza vaccine compared to standard dose vaccine in elderly adults: Safety, immunogenicity and relative efficacy during 2009-2010 season. *Vaccine*, 31: 861-866.
- Dreyfus C., Ekiert D.C., Wilson I.A. (2013): Structure of a Classical Broadly Neutralizing Stem Antibody in Complex with a Pandemic H2 Influenza Virus Hemagglutinin. *Journal of Virology*, 87, 12: 7149-7154.
- Durando P., Iudici R., Alicino C., Alberti M., de Florentis D., Ansaldi F., Icardi G. (2011): Adjuvants and alternative routes of administration towards the development of the ideal influenza vaccine. *Human vaccines*, 7: S29-S40.
- Ebrahimi S.M., Tebianian M. (2010): Heterologous expression, purification and characterization of the influenza A virus M2e gene fused to Mycobacterium tuberculosis HSP70₃₅₉₋₆₁₀ in prokaryotic system as a fusion protein. *Mol Biol Rep*, 37: 2877-2883.
- Ebrahimi S.M., Tebianian M. (2011): Influenza A viruses: why focusing on M2e-based universal vaccines. *Virus Genes*, 42: 1-8.
- Ekiert D.C., Bhabha G., Elsliger M., Friesen R.H., Jongeneelen M., Throsby M., Goudsmit J., Wilson I.A. (2009): Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope: implications for universal prevention and therapy. *Science*, 324 (5924): 246-251.
- Ellebedy A.H., Webby R.J. (2009): Influenza vaccines. *Vaccine*, 27: D65-D68.
- Epstein S.L., Kong W., Misplon J.A., Lo CH., Tumpey T.M., Xu L., Nabel G.J. (2005): Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein. *Vaccine*, 23: 5404-5410.

- Ernst W.A., Kim H.J., Tumpey T.M., Jansen A.D.A., Tai W., Cramer D.V., Adler-Moore J.P., Fujii G. (2006): Protection against H1, H5, H6 and H9 influenza A infection with liposomal matrix 2 epitope vaccines. *Vaccine*, 24: 5158-5168.
- Falsey A.R., Treanor J.J., Tornieporth N., Capellan J., Gorse G.J. (2009): Randomized, Double-Blind Controlled Phase 3 Trial Comparing the Immunogenicity of High-Dose and Standard-Dose Influenza Vaccine in Adults 65 Years of Age and Older. *Journal of Infectious Diseases*, 200:172-180.
- Fan J., Liang X., Horton M.S., Perry H.C., Citron M.P., Heidecker G.J., Fu T., Joyce J., Przysiecki C.T., Keller P.M., Garsky V.M., Ionescu R., Rippeon Y., Shi L., Chastain M.A., Condra J.H., Davies M., Liao J., Emini E.A., Shiver J.W. (2004): Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets, and rhesus monkeys. *Vaccine*, 22: 2993-3003.
- Feng S., Jiao P., Qi W., Fan H., Liao M. (2011): Development and strategies of cell-culture technology for influenza vaccine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 89: 893-902.
- Fiers W., De Filette M., Birkett A., Neiryck S., Min Jou W. (2004): A“universal“ human influenza A vaccine. *Virus Research*, 103: 173-176.
- Fiers W., De Filette M., El Bakkouri K., Schepens B., Roose K., Schotsaert M., Birkett A., Saelens X. (2009): M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine*, 27: 6280-6283.
- Gerdil C. (2003): The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine*, 21: 1776-1779.
- Gerhard W., Mozdzanowska K., Zharikova D. (2006): Prospects for Universal Influenza Virus Vaccine. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 4: 569-574.
- Grohskopf L., Olsen S.J., Sokolow L.Z., Bresee J.S., Cox N.J., Broder K.R., Karron R.A., Walter E.B., and the Centres for Disease Control and Prevention (CDC) (2014): Prevention and control of seasonal influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) – United States, 2014-15 Influenza Season. *MMWR Recom Rep*, 63: 691-697.
- Heiny A.T., Miotto O., Srinivasan K.N., Khan A.M., Zhang G.L., Brusica V., Tan T.W., August J.T. (2007): Evolutionarily Conserved Protein Sequences of Influenza A Viruses, Avian and Human, as Vaccine Targets. *PLoS ONE*, 2, 11: e1190.
- Huang B., Wang W., Li R., Wang X., Jiang T., Qi X., Gao Y., Tan W., Ruan L. (2012): Influenza A virus nucleoprotein derived from *Escherichia coli* or recombinant vaccinia (Tiantan) virus elicits robust cross-protection in mice. *Virology Journal*, 9: 322.
- Hughes B., Hayden F., Perikow Y., Hombach J., Tam J.S. (2012): Report of the 5th meeting on influenza vaccines that induce broad spectrum and long-lasting immune responses, World Health Organization, Geneva, 16-17 November 2011. *Vaccine*, 30: 6612-6622.
- Huleatt J.W., Nakaar V., Desai P., Huang Y., Hewitt D., Jacobs A., Tang J., McDonald W., Song L., Evans R.K., Umlauf S., Tussey L., Powell T.J. (2008): Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine*, 26: 201-214.
- Chroboczek J., Szurgot I., Szolajska E. (2014): Virus-like particles as vaccine. *Acta Biochimica Polonica*, 61, 3: 531-539.
- Ionescu R.M., Przysiecki C.T., Liang X., Garsky V.M., Fan J., Wang B., Troutman R., Rippeon Y., Flanagan E., Shiver J., Shi L. (2006): Pharmaceutical and Immunological Evaluation of Human Papillomavirus Viruslike Particle as an Antigen Carrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95: 70-79.
- Kang S.M., Song J.M., Quan F.S., Compans R.W. (2009): Influenza vaccines based on virus-like particles. *Virus Res.*, 142, 2: 140-146.
- Katz J.M., Webster R.G. (1989): Efficacy of inactivated Influenza A virus (H3N2) vaccines grown in mammalian cells or embryonated eggs. *The Journal of Infectious Diseases*, 160, 2: 191-198.
- Kilbourne E.D. (2006): Influenza Pandemics of the 20th century. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 1: 9-14.
- Kim J.H., Jacob J. (2009): DNA Vaccines Against Influenza Viruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 333: 197-210.
- Kistner O., Barrett P.N., Mundt W., Reiter M., Schrober-Bendixen S., Dorner F. (1998): Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. *Vaccine*, 16, 9/10: 960-968.
- Klausberger M., Wilde M., Palmberger D., Hai R., Albrecht R.A., Margine I., Hirsh A., García-Sastre A., Grabherr R., Krammer F. (2014): One-shot vaccination with an insect cell-derived low-dose influenza A H7 virus-like particle preparation protects mice against H7N9. *Vaccine*, 32: 355-362.
- Kopecky-Bromberg S.A., Palese P. (2009): Recombinant vectors as influenza vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 333: 243-267.

- Krammer F., Palese P. (2013): Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines. *Current Opinion in Virology*, 3, 5: 521-530.
- Kumar P., Khanna M., Kumar B., Rajput R., Banerjee A.C. (2012): A conserved matrix epitope based DNA vaccine protects mice against influenza A virus challenge. *Antiviral Research*, 93: 78-85.
- Lambe T. (2012): Novel Viral Vectored Vaccines for the Prevention of Influenza. *Mol Med*, 18: 1153-1160.
- Lambe T., Carey J.B., Li Y., Spencer A.J., van Laarhoven A., Mullarkey C.E., Vrdoljak A., Moore A.C., Gilbert S.C. (2013): Immunity Against Heterosubtypic Influenza Virus Induced By Adenovirus and MVA Expressing Nucleoprotein And Matrix Protein-1. *Scientific Reports*, 3: 1443.
- Li Z., Gabbard J.D., Mooney A., Gao X., Chen Z., Place R.J., Tompkins S.M., He B. (2013): Single-Dose Vaccination of a Recombinant Parainfluenza Virus 5 Expressing NP from H5N1 Virus Provides Broad Immunity against Influenza A Viruses. *Journal of Virology*, 87, 10: 5985-5993.
- Liu W., Peng Z., Liu Z., Lu Y., Ding J., Chen Y. (2004): High epitope density in a single recombinant protein molecule of the extracellular domain of influenza A virus M2 protein significantly enhances protective immunity. *Vaccine*, 23: 366-371.
- López-Macías C. (2012): Virus-like particle (VLP)-based vaccines for pandemic influenza. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 8, 3: 411-414.
- Luo M., Tao P., Li J., Zhou S., Guo D., Pan Z. (2008): Immunization with plasmid DNA encoding influenza A virus nucleoprotein fused to a tissue plasminogen activator signal sequence elicits strong immune responses and protection against H5N1 challenge in mice. *Journal of Virological Methods*, 154: 121-127.
- MacLeod M.K.L., David A., Jin N., Noges L., Wang J., Kappler J.W., Marrack P. (2013): Influenza Nucleoprotein Delivered with Aluminium Salts Protects Mice from an Influenza A Virus That Expresses an Altered Nucleoprotein Sequence. *PLoS One*, 8, 4: e61775.
- McElhaney J.E., Zhou X., Talbot H.K., Soethout E., Bleackley R.C., Granville D.J., Pawelec G. (2012): The unmet need in the elderly: How immunosenescence, CMV infection, co-morbidities and frailty are a challenge for the development of more effective influenza vaccines. *Vaccine*, 30: 2060-2067.
- Mett V., Musiychuk K., Bi H., Farrance Ch.E., Horsey A., Ugulava N., Shoji Y., de la Rosa P., Palmer G.A., Rabindran S. *et al.* (2008): A plant-produced influenza subunit vaccine protects ferrets against virus challenge. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2, 1: 33-40.
- Mullarkey C.E., Boyd A., van Laarhoven A., Lefevre E.A., Carr B.V., Baratelli M., Molesti E., Temperton N.J., Butter C., Charleston B., Lambe T., Gilbert S.C. (2013): Improved adjuvanting of seasonal influenza vaccines: Preclinical studies of MVA-NP+M1 coadministration with inactivated influenza vaccine. *Eur. J. Immunol.*, 43: 1940-1952.
- Nahampun H.N., Bosworth B., Cunnick J., Mogler M., Wang K. (2015): Expression of H3N2 nucleoprotein in maize seed and immunogenicity in mice. *Plant Cell Rep.* (doi:10.1007/s00299-015-1758-0)
- Nayak D.P., Hui E.K.W., Barman S. (2004): Assembly and budding of influenza virus. *Virus Research*, 106: 147-165.
- Nayak D.P., Balogun R.A., Yamada H., Zhou Z.H., Barman S. (2009): Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research* 147: 147-161.
- Neiryneck S., Deroo T., Saelens X., Vanlandschoot P., Jou W.M., Fiers W. (1999): A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nature Medicine*, 5, 10: 1157 – 1163.
- Neumann G., Noda T., Kawaoka Y. (2009): Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, 459: 931-939.
- Nicolas J.F., Guy B. (2008): Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. *Expert Rev. Vaccines*, 7, 8: 1201-1214.
- O'Hagan D.T., De Gregorio E. (2009): The path to a successful vaccine adjuvant – The long and winding road. *Drug Discovery Today*, 14, 11/12: 541-551.
- Okuda K., Ihata A., Watabe S., Okada E., Yamakawa T., Hamajima K., Yang J., Ishii N., Nakazawa M., Okuda K. *et al.* (2001): Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene. *Vaccine*, 19: 3681-3691.
- Okuno Y., Isegawa Y., Sasao F., Ueda S. (1993): A Common Neutralizing Epitope Conserved between the Hemagglutinins of Influenza A Virus H1 and H2 Strains. *Journal of Virology*, 67, 5: 2552-2558.
- Palese P., Shaw M.L. (2007): *Orthomyxoviridae*: The viruses and their replication. In: Knipe D.M., Howley P.M. editors. *Fields Virology*. 5th Edition. Lippincott. Williams & Wilkins, Philadelphia. 1647-1689.
- Parrish C.R., Kawaoka Y. (2005): The Origins of New Pandemic Viruses: The Acquisition of New Host Ranges by Canine Parvovirus and Influenza A Viruses. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59: 553-586.

- Pau M.G., Ophorst C., Koldijk M.H., Schouten G., Mehtali M., Uytdehaag F. (2001): The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. *Vaccine*, 19: 2716-2721.
- Perdue M.L., Arnold F., Li S., Donabedian A., Cioce V., Warf T., Huebner R. (2011): The future of cell culture-based influenza vaccine production. *Expert Rev. Vaccines*, 10, 8: 1183-1194.
- Petricciani J.C. (1991): Regulatory philosophy and acceptability of cells for the production of biologicals. *Dev. Biol. Stand.*, 75: 9-15.
- Portela A., Digard P. (2002): The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *Journal of General Virology*, 83: 723-734.
- Prymula R., Usluer G., Altinel S., Sichova R., Weber F. (2012): Acceptance and Opinions of Intanza/IDflu Intradermal Influenza Vaccine in the Czech Republic and Turkey. *Adv Ther*, 29, 1: 41-52.
- Pushko P., Tumpey T.M., Bu F., Knell J., Robinson R., Smith G. (2005): Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice. *Vaccine*, 23: 5751-5759.
- Quan F.S., Kim M.C., Lee B.J., Song J.M., Compans R.W., Kang S.M. (2012): Influenza M1 VLPs containing neuraminidase induce heterosubtypic cross-protection. *Virology*, 430: 127-135.
- Rappuoli R. (2011): The challenge of developing universal vaccines. *F1000 Medicine Reports*, 3: 16. doi: 10.3410/M3-16
- Robertson J.S., Nicolson C., Bootman J.S., Major D., Robertson E.W., Wood J.M. (1991): Sequence analysis of the haemagglutinin (HA) of influenza A (H1N1) viruses present in clinical material and comparison with the HA of laboratory-derived virus. *Journal of General Virology*, 72: 2671-2677.
- Romani N., Flacher V., Tripp C.H., Sparber F., Ebner S., Stoitzner P. (2012): Targeting Skin Dendritic Cells to Improve Intradermal Vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol*, 351: 113-138.
- Rose M.A., Zielen S., Baumann U. (2012): Mucosal immunity and nasal influenza vaccination. *Expert Rev. Vaccines*, 11, 5: 595-607.
- Roy S., Kobinger G.P., Lin J., Figueredo J., Calcedo R., Kobasa D., Wilson J.M. (2007): Partial protection against H5N1 influenza in mice with a single dose of a chimpanzee adenovirus vector expressing nucleoprotein. *Vaccine*, 25: 6845-6851.
- Saha S., Yoshida S., Ohba K., Matsui K., Matsuda T., Takeshita F., Umeda K., Tamura Y., Okuda K., Klinman D., Xin K., Okuda K. (2006): A fused gene of nucleoprotein (NP) and herpes simplex virus genes (VP22) induces highly protective immunity against different subtypes of influenza virus. *Virology*, 354: 48-57.
- Sedova E.S., Shcherbinin D.N., Migunov A.I., Smirnov I.A., Logunov D.I., Shmarov M.M., Tsybalova L.M., Naroditskii B.S., Kiselev O.I., Gintsburg A.L. (2012): Recombinant Influenza Vaccines. *Acta Naturae*, 4, 4: 17-27.
- Shoji Y., Chichester J.A., Bi H., Musiyuchuk K., de la Rosa P., Goldshmidt L., Horsey A., Ugulava N., Palmer G.A., Mett V., Yusibov V. (2008): Plant-expressed HA as a seasonal influenza vaccine candidate. *Vaccine*, 26: 2930-2934.
- Shtykova E.V., Baratova L.A., Fedorova N.V., Radyukhin V.A., Ksenofontov A.L., Volkov V.V., Shishkov A.V., Dolgov A.A., Shilova L.A., Batishchev O.V. et al. (2013): Structural Analysis of Influenza A Virus Matrix Protein M1 and Its Self-Assemblies at Low pH. *PLoS ONE*, 8, 12: e82431. doi:10.1371/journal.pone.0082431
- Skehel J.J., Wiley D.C. (2002): Influenza haemagglutinin. *Vaccine*, 20: S51-S54.
- Smith L.R., Wloch M.K., Ye M., Reyes L.R., Boutsaboualoy S., Dunne C.E., Chaplin J.A., Rusalov D., Rolland A.P., Fisher C.L. et al. (2010): Phase 1 clinical trials of the safety and immunogenicity of adjuvanted plasmid DNA vaccines encoding influenza A virus H5 hemagglutinin. *Vaccine*, 28: 2565-2572.
- Steel J., Lowen A.C., Wang T.T., Yondola M., Gao Q., Haye K., Garcia-Sastre A., Palese P. (2010): Influenza Virus Vaccine Based on the Conserved Hemagglutinin Stalk Domain. *mBio*, 1, 1: e00018-10. doi:10.1128/mBio.00018-10
- Subbarao K., Chen H., Swaine D., Mingay L., Fodor E., Brownlee G., Xu X., Lu X., Katz J., Cox N., Matsuoka Y. (2003): Evaluation of a Genetically Modified Reassortant H5N1 Influenza A Virus Vaccine Candidate Generated by Plasmid-Based Reverse Genetics. *Virology*, 305: 192-200.
- Sui J., Hwang W.C., Perez S., Wei G., Aird D., Chen L., Santelli E., Stec B., Cadwell G., Ali M., Wan H., Murakami A., Yammanuru A., Han T. Cox N., Bankston L.A., Donis R.O., Liddington R.C., Marasco W.A. (2009): Structural and Functional Bases for Broad-Spectrum Neutralization of Avian and Human Influenza A Viruses. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 3: 265-273.

- Taubenberger J.K., Morens D.M. (2006): 1918 Influenza: the Mother of All Pandemics. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 1: 15-22.
- Thueng-in K., Maneewatch S., Srimanote P., Songserm T., Tapchaisri P., Sookrung N., Tongtawe P., Channarong S., Chaicumpa W. (2010): Heterosubtypic immunity to influenza mediated by liposome adjuvanted H5N1 recombinant protein vaccines. *Vaccine*, 28: 6765-6777.
- Tompkins S.M., Zhao Z., Lo Ch., Misplon J.A., Liu T., Ye Z., Hogan R.J., Wu Z., Benton K.A., Tumpey T.M., Epstein S.L. (2007): Matric Protein 2 Vaccination and Protection against Influenza Viruses, Including subtype H5N1. *Emerging Infectious Diseases* 13,3: 426-435.
- Treanor J.J., Schiff G.M., Hayden F.G., Brady R.C., Hay C.M., Meyer A.L., Holden-Wiltse J., Liang H., Gilbert A., Cox M. (2007): Safety and Immunogenicity of a Baculovirus-Expressed Hemagglutinin Influenza Vaccine. *Jama*, 297,14: 1577-1582.
- Tree J.A., Richardson C., Fooks A.R., Clegg J.Ch., Looby D. (2001): Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. *Vaccine*, 19: 3444-3450.
- Tripp R.A., Tompkins S.M. (2014): Virus-Vectored Influenza Virus Vaccines. *Viruses*, 6: 3055-3079.
- Tritto E., Mosca F., De Gregorio E. (2009): Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine*, 27: 3331-3334.
- Ulmer J.B., Fu T., Deck R.R., Friedman A., Guan L., DeWitt C., Liu X., Wang S., Liu M.A., Donnelly J.J., Caulfield M.J. (1998): Protective CD4+ and CD8+ T Cells against Influenza Virus Induced by Vaccination with Nucleoprotein DNA. *Journal of Virology*, 72, 7: 5648-5653.
- Varghese J.N., Laver W.G., Colman P.M. (1983): Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature*, 303: 35-40.
- Wang S., Lu S. (2014): DNA Immunization. *Curr Protoc Microbiol*. 31: 18.3.1-18.3.24.
- Wang S., Zhang C., Zhang L., Li J., Huang Z., Lu S. (2008): The relative immunogenicity of DNA vaccines delivered by the intramuscular needle injection, electroporation and gene gun methods. *Vaccine*, 26, 17: 2100-2110.
- Wang T.T., Tan G.S., Hai R., Pica N., Ngai L., Ekiert D.C., Wilson I.A., Garcia-Sastre A., Moran T.M., Palese P. (2010a): Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes. *PNAS*, 107, 44: 18979-18984.
- Wang T.T., Tan G.S., Hai R., Pica N., Petersen E., Moran T.M., Palese P. (2010b): Broadly Protective Monoclonal Antibodies against H3 Influenza Viruses following Sequential Immunization with Different Hemagglutinins. *PLoS Pathogens*, 6, 2: e1000796. doi:10.1371/journal.ppat.1000796
- Webby R.J., Perez D.R., Coleman J.S., Guan Y., Knight J.H., Govorkova E.A., McClain-Moss L.R., Peiris J.S., Rehg J.E., Tuomanen E.I., Webster R.G. (2004): Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines. *Lancet*, 363: 1099-1103.
- Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. (1992): Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Micobiological reviews*, 56, 1: 152-179.
- Xue C., Wang W., Liu Q., Miao Z., Liu K., Shen H., Lv L., Li X., Chen X., Cao Y. (2014): Chimeric influenza-virus-like particles containing the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 protein and the influenza virus HA and M1 proteins. *Arch Virol*, 159: 3043-3051.
- Yang L.P.H. (2013): Recombinant Trivalent Influenza Vaccine (Flublok): A Review of Its Use in the Prevention of Seasonal Influenza in Adults. *Drugs*, 73: 1357-1366.
- Yang P., Wang W., Gu H., Li Z., Zhang K., Wang T., Li R., Duan Y., Zhang S., Wang X. (2014): Protection against influenza H7N9 virus challenge with a recombinant NP-M1-HSP60 protein vaccine construct in BALB/c mice. *Antiviral Research*, 111: 1-7.
- Ye Q., Krug R.M., Tao Y.J. (2006): The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature*, 444: 1078-1082.
- Zhang N., Zheng B., Lu L., Zhou Y, Jiang S., Du L. (2015): Advancements in the development of subunit influenza vaccines. *Microbes and Infection*, 17: 123-134.
- Zhou D., Wu T., Lasaro M.O., Latimer B.P., Parzych E.M., Bian A., Li Y., Li H., Erikson J., Xiang Z., Ertl H.C.J. (2010): A Universal Influenza A Vaccine Based on Adenovirus Expressing Matrix-2 Ectodomain and Nucleoprotein Protects Mice From Lethal Challenge. *Dostupné na: www.moleculartherapy.org*, 18, 12: 2182-2189.