

DOI: 10.13376/j.cblls/2014135

文章编号: 1004-0374(2014)09-0943-06

基于血凝素(HA)的新型流感疫苗研究进展

王 祥, 周东明*

(中国科学院上海巴斯德研究所疫苗研究中心, 上海 200031)

摘 要: 新型广谱流感疫苗是预防和控制不断变异的流感病毒的重要手段。血凝素 (HA) 是流感病毒表面的糖蛋白, 具有免疫原性, 但其变异性强, 是 A 型流感病毒发生抗原变异的主要原因。近年来研究发现, HA 存在保守的恒定区, 可诱导机体产生流感病毒特异性广谱中和抗体, 拮抗多种流感病毒的感染。因此, 如何采取不同策略和方法, 研发基于 HA 的新型疫苗成为流感防治研究的重点。就基于 HA 的新型流感疫苗研究进展作一综述。

关键词: 流感; 血凝素; 疫苗; 中和抗体

中图分类号: R373.1 **文献标志码:** A

Advances in the development of novel influenza vaccines based on hemagglutinin

WANG Xiang, ZHOU Dong-Ming*

(Vaccine Research Center of Institut Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: Novel universal influenza vaccine has been considered to be the most economic and effective way to prevent from the emerging influenza virus with unpredictable mutation. Hemagglutinin (HA) is an influenza virus surface glycoprotein with high immunogenicity and antigenic variability. Recently, conserved domains in HA have been identified, and they can induce broadly neutralizing antibodies against heterotype influenza infection in the host. So, generation of HA-based novel influenza vaccines by using various strategies became a hot topic in prevention and control of influenza infection. Here, advances in the development of novel influenza vaccine based on HA are summarized.

Key words: influenza virus; hemagglutinin; vaccine; neutralizing antibodies

1 流感病毒及传统流感疫苗

流行性感病毒是引起流感的主要病原体, 分为 A、B、C 三型, 属于正黏病毒科。流感病毒是分段单链负义 RNA 病毒, 其中 B 型只感染人类, 有两个血清型, 重组和突变的概率较低; C 型不感染人类, 不致病或者很少造成严重疾病; A 型流感病毒造成的危害最大, 历次给人、禽等造成重大伤亡或损失的都是 A 型流感病毒。A 型流感病毒的核酸由八个基因片段组成, 分别编码 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2、NS1、NS2、PB1-F2、N40、PA-X 及 M42 等蛋白^[1]。其中血凝素 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuraminidase,

NA) 为流感病毒表面的糖蛋白。到目前为止, HA 有 18 个亚型, NA 有 11 个亚型, 根据 HA 和 NA 的不同组合, A 型流感分为多种不同亚型^[2]。

季节性流感疫情主要是由 A 型和 B 型流感病毒引起, 每年在世界范围内造成数百万人感染并伴有严重症状以及近 50 万人死亡。由于 RNA 病毒缺少基因修复机制, 以及分节段 RNA 基因组决定了流感病毒的高重组率和高突变率, 流感病毒每隔 3~5 年就会产生新毒株取代旧毒株, 因此, 流感的

收稿日期: 2014-03-13; 修回日期: 2014-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170871)

*通信作者: E-mail: dmzhou@ips.ac.cn

防治成为当今社会最为关注的公共卫生问题之一。目前,季节性流感疫苗主要为灭活三价流感疫苗和三价冷适应活毒疫苗,两者属于传统流感疫苗,都由两种 A 型流感病毒(H1N1、H3N2)和一株 B 型流感病毒组成。传统流感疫苗虽然在一定程度上保护广大民众不受季节性流感的威胁,但其有效性取决于疫苗组分和流行毒株的匹配程度,只能对相匹配的毒株起保护作用,这远远不足以应对不断变异的新型毒株。因此,新型流感疫苗的研制成为当务之急。

2 新型流感疫苗

近 20 年来,新型流感疫苗的主要研究目标是实现流感疫苗的广谱性(或称通用性),即一种疫苗可应对不断变异的多种流感毒株,同时提高疫苗的有效性及安全性。广谱流感疫苗的研究关注 3 个靶点^[3]:(1)M2e,即流感病毒膜蛋白 M2 的胞外部分,M2 是流感病毒表面的离子通道,保守性较好;(2)核蛋白(NP),NP 是细胞内 CTL 反应的主要靶抗原,激活 T 细胞反应,拮抗不同流感毒株;(3)血凝素(HA),HA 有较好的免疫原性,是流感病毒表面唯一能刺激机体产生中和抗体的蛋白。Pica 和 Palese^[2]研究表明,M2e 免疫原性较弱,且提供的交叉保护不全面;NP 主要诱导特异性 T 细胞免疫反应,与 M2e 特异性抗体一样,都不能在感染早期直接作用于病毒从而有效控制感染;而 HA 诱导的中和抗体能够在感染的第一时间作用于病毒,与病毒结合,抑制病毒入侵细胞。因此,中和抗体是抗病毒免疫的首要因素,HA 也因此成为流感基因工程亚单位疫苗的首选抗原基因。以下就基于 HA 的多种新型通用型流感疫苗研究进展作具体介绍。

2.1 HA 及广谱性中和抗体

HA 由流感病毒基因片段 4 编码,以同源三聚体的形式跨膜存在于病毒的双层类质膜。成熟的 HA 由 3 个非共价结合的 HA 蛋白单体组成,外观像蘑菇,分为头部(head) HA1 和茎部(stalk) HA2。HA head 表面有与神经氨酸结合的受体结合位点^[3],与流感病毒和细胞膜受体结合有关,有较强的免疫原性,刺激机体产生免疫反应,但有较高的突变率。HA stalk 羧基末端的疏水区穿过双层类质膜,将 HA 分子嵌在膜上,参与流感病毒与细胞膜的融合^[4]。HA stalk 保守性较好,在不同亚型的流感病毒之间有 85% 的同源性,而在同一亚型不同毒株之间同源性更高^[5]。根据 HA stalk 的差异,A 型流感病毒

分为两组(Group),即 Group 1 和 Group 2^[2]。HA stalk 亦可刺激机体产生中和抗体,但由于 HA stalk 免疫原性较弱,一般情况下流感感染或疫苗接种都不能有效诱导机体产生针对 HA stalk 的中和抗体,但不同亚型的流感病毒刺激或多次感染,可激发 HA stalk 特异性中和抗体^[6]。

近年来,广谱中和抗体的发现为新型流感疫苗的研究提供了新策略。大部分广谱中和抗体针对 HA stalk,与 HA stalk 区域的识别位点结合,影响 HA 在膜融合时的构象改变,从而阻止流感病毒侵入细胞。C179 是第一个被发现的流感病毒广谱性中和抗体^[7],最初发现 C179 可以中和 H1 和 H2 亚型流感病毒,后来又被证明可以中和 H5、H6、H9 等亚型^[8]。CR6261、F10、12D1、CR8020、FI6^[8-9]等抗体可以中和 A 型流感多个不同亚型的毒株。CR6261 和 F10 识别相同的中和表位,可以中和 Group1 中 H1、H2、H5、H9 亚型。12D1 和 CR8020 可以中和 Group2 中的多个亚型的病毒。而 FI6 既可以中和 Group1 亚型病毒,也可以中和 Group2 亚型病毒。另外,CR9114^[10]不仅中和 A 型流感病毒,而且中和 B 型流感病毒,是至今发现的最广谱中和抗体。以上为针对 HA stalk 且具有中和效应的重要的单克隆抗体,而 HA head 诱导的交叉保护性单克隆抗体为数不多。5J8、65C6、S139/1^[11-13]为针对 HA head 的广谱中和抗体,其中 5J8 中和几乎所有 H1 亚型病毒,65C6 中和 H5 亚型大部分毒株;ELISA 检测发现 S139/1 能够识别 H1、H2、H3、H5、H9 及 H13 亚型的 HA,并且对 H1、H2、H3、H13 等亚型具有中和作用,被动免疫 S139/1 抗体对小鼠亦有保护作用。由于广谱中和抗体的滴度较低,先前没有被发现或重视。目前,研究者可采用不同策略和方法诱导机体产生流感病毒特异性广谱中和抗体,为通用型流感疫苗研究成功带来希望。

2.2 基于 HA 的蛋白疫苗

Johansson 等^[14]将流感病毒 HA 和 NA 纯化蛋白分别免疫小鼠,发现只有 HA 免疫组有保护效果,而 NA 免疫组只能缓解症状。Wang 等^[15]用人工合成的 H3 亚型 HA stalk 肽段 LAH(含 57 个氨基酸)免疫小鼠,初免为 25 μg LAH 加弗氏完全佐剂,3 周后同样剂量 LAH 加弗氏不完全佐剂加强免疫,成功诱导小鼠产生广谱中和抗体,并在一定程度上保护小鼠免受不同流感病毒的感染。Bommakanti 等^[16]用大肠杆菌表达基于 H3N2 HA2 的蛋白,以较低剂量(1 μg)免疫小鼠,即可拮抗同源病毒的感

染。Krammer 等^[17]用表达 H9 head 和 H1 stalk 的嵌合 HA cH9/1 质粒 DNA 免疫小鼠, 然后用杆状病毒系统表达不同流感亚型 HA head 的嵌合 cH6/1 和 cH5/1 蛋白先后两次加强免疫小鼠, 产生针对 HA stalk 的广谱中和抗体。2014 年, Kramme 等^[18]研究显示, 将 H3 stalk 和 H4、H5 的 HA head 组成嵌合 HA (cH4/3、cH5/3), 先用表达 cH4/3 的 DNA 初免, 然后用杆状病毒系统表达的 cH5/3 蛋白加强免疫, 之后用 H3 全长 HA 蛋白加强免疫, 免疫小鼠对 H7N9 攻击感染具有保护作用。该研究表明, 这种免疫策略诱导产生针对 HA stalk 的中和抗体。H3 和 H7 同属 Group2, 两者的 HA stalk 具有较大同源性。Wang 等^[19]研究发现, 将 H5 亚型流感病毒 HA 上的糖基化链修剪后得到寡聚糖基 HA, 可刺激机体产生更强的抗体反应和中和同源流感病毒的能力。Chen 等^[20]进一步探讨去掉 HA 表面的糖基后能否诱导更强的免疫反应, 结果表明, 表达带有寡聚糖基的 HA 免疫效果最好, 因此, 改变 HA 表面的糖链长度可作为研发新型流感疫苗的一个新策略。在临床应用方面, 2013 年 1 月, 美国食品和药品监督管理局 (FDA) 批准了由昆虫杆状病毒表达的三价流感疫苗 flublock 上市^[21], 这是第一种基因工程流感疫苗, 该疫苗成分为三种流感病毒的 HA 蛋白, 其生产过程完全脱离传统流感疫苗所需的 SPF 鸡胚。

2.3 基于HA的腺病毒载体疫苗

重组腺病毒载体是目前最有应用前景的疫苗载体之一。腺病毒载体具有高表达外源基因、普遍感染性(感染分裂细胞和非分裂细胞)。同时, 还具有诱导体液免疫和细胞免疫、无需添加佐剂、安全性好、易于制备等特性, 被广泛应用于预防性和治疗性疫苗的研究。近年来, 基于腺病毒载体表达 HA 的新型流感疫苗研究取得显著进展。Kim 等^[22]研究发现, 重组腺病毒表达 HA head 通过黏膜免疫诱导小鼠产生针对 HA 的高水平 IgG 和 IgA, 对同源流感病毒的攻击感染有完全保护。Wei 等^[23]采用表达 HA 的质粒 DNA 初免, 然后用灭活三价流感疫苗或表达 HA 的人腺病毒 5 型载体 (AdHu5-HA) 加强免疫, 分别在小鼠、雪貂、非人灵长类动物中诱导广谱中和抗体。该实验室另一项研究显示, 通过低剂量流感病毒或者 AdHu5-HA 预感染, 然后用表达 HA 的人腺病毒 28 型载体 (rAd28) 免疫, 3 周后再用 AdHu5-HA 加强免疫, 小鼠和雪貂都能诱导产生广谱中和抗体^[24]。因此, 感染流感病毒的动

物通过不同型腺病毒载体多次免疫后可产生广谱中和抗体。这一结论使体内流感病毒的预存免疫可能影响流感广谱中和抗体的产生这一担心变得多余。Peters 等^[25]在腺病毒载体 AdHu5 上同时表达 HA 和 TLR3 配基, 在人体中可诱导较强的 B 细胞和 T 细胞免疫反应。此外, 腺病毒载体的结构蛋白 Hexon 区域可将外源基因片段展示于病毒表面, 诱导更强的免疫反应。因此, 腺病毒载体采用不同策略表达 HA 或修饰后的 HA, 诱导机体产生广谱中和抗体, 从而拮抗多种流感病毒感染。

2.4 基于HA的重组痘病毒载体疫苗

重组痘病毒载体具有较好的免疫原性, 并且可以装载长达 25 kb 的外源基因, 重组痘病毒载体在人体细胞中不复制, 表达稳定, 安全性较好, 因此, 该载体被广泛应用于新型疫苗研究。Gocnik 等^[26]用重组痘病毒表达流感病毒嵌合 HA 的痘病毒 KG-11 (cH1/3) 和 KG-12 (cH3/1), 以 10^6 PFU 经腹腔免疫小鼠, 间隔两周后加强免疫, 产生针对 HA2 的中和抗体, 并对同源流感病毒低剂量攻击感染产生保护; 将分离的相应血清被动免疫小鼠, 亦可在一定程度上保护小鼠, 并使感染异源流感病毒的小鼠提前恢复健康。Hessel 等^[27]发现用痘病毒载体 MVA 表达 H5N1 HA, 以 10^6 PFU 分别在第 0 和 21 天肌肉免疫小鼠两次, 可产生针对不同 clade H5N1 的交叉免疫保护。该实验室用痘病毒 MVA 表达流感病毒的保守抗原基因, 发现表达 NP 和 HA stalk 融合蛋白的重组痘病毒, 在第 0、21 天以 10^6 PFU 肌肉免疫小鼠, 免疫动物可抵御 H5N1、H7N1 及 H9N2 等病毒致死剂量的攻击^[28]。

2.5 基于HA的重组杆状病毒载体疫苗

自杆状病毒被发现可以感染哺乳动物细胞并能携带外源基因后, 被发展为一种新型的重组病毒载体用于基因治疗和疫苗研究^[29-30]。Prabakaran 等^[31-33]研究发现, 流感病毒 H5N1 HA 可在杆状病毒表面表达, 用展示 HA 的杆状病毒和灭活全病毒 H5N1, 并以霍乱毒素作为佐剂, 分别通过鼻腔免疫小鼠, 第 28 天后以相同方式加强免疫, 发现相同剂量的杆状病毒比灭活全病毒诱导更高水平的特异性中和抗体, 并且, 免疫小鼠对 10LD50 流感病毒的攻击感染产生 100% 保护。他们又发现, 活杆状病毒通过口服免疫小鼠, 第 7 和 21 天分别加强免疫, 即使不加佐剂, 也能诱导较高滴度的交叉保护性中和抗体, 保护小鼠不受致死剂量 H5N1 的攻击。通过对 H5N1 病毒 HA 中和表位的分析, 获得三种疫苗

株, 覆盖 H5 亚型所有毒株的中和表位, 将这三株 HA 克隆至杆状病毒载体, 然后将三种灭活杆状病毒和佐剂混合后皮下注射免疫小鼠, 可诱导广谱中和抗体。同时, 混合杆状病毒可以对同源或异源毒株有 100% 保护效果。

Chen 等^[34]分别构建将 H5N1 HA 展示于病毒外壳的杆状病毒 Bac-HA64、哺乳动物细胞内源性表达 HA 的杆状病毒 Bac-CHA, 以及既在病毒外壳展示又可内源性表达 HA 的杆状病毒 Bac-CHA/HA64, 以 10^9 PFU 剂量经不同免疫方式(肌肉注射、皮下注射、鼻腔吸入)免疫小鼠, 于 2 周和 4 周加强免疫, 发现肌肉免疫 Bac-CHA/HA64 可诱导强烈的免疫反应。Chen 等^[35]进一步将杆状病毒表达 HA 基因的 CMV 启动子替换成更强的 CAG, 在 HA 两端添加 MHC-I 信号肽和 MHC-I 的 trafficking 结构域, 并在修饰后的 HA 基因后添加提高目的蛋白表达的顺式增强原件 WPRE, 不仅能提高蛋白的表达量, 同时增强免疫后诱导的体液免疫和细胞免疫反应。

2.6 基于HA的DNA疫苗

20 世纪 90 年代初, Tang 等^[36]发现将表达外源蛋白基因的质粒 DNA 直接免疫小鼠, 不仅可以检测到目的蛋白, 而且可以产生相应蛋白的特异性抗体。自首次报道以来, DNA 疫苗发展迅速, 并且越来越成熟。DNA 疫苗的免疫原性可以通过添加适合的佐剂或选择适合载体进一步提高。由于质粒 DNA 非常稳定、制备简单、使用方便等特点, DNA 疫苗载体被广泛应用于包括流感疫苗在内的多种新型疫苗研发。Chen 等^[37]构建了一系列分别表达 H5N1 的 HA、NA、NP、M1、M2 基因的质粒 DNA, 然后用电击方法免疫小鼠, 剂量为 50 μ g, 免疫 5 次, 然后用 5 LD₅₀ 同源病毒攻击感染, 发现表达 HA、NA 的质粒可以对小鼠产生完全保护。Zhou 等^[38]用质粒 DNA 表达 3 个 clade 的 H5N1 HA 组成三价 DNA 流感疫苗, 分别在第 0、28、56 天以相同方式肌肉免疫小鼠, 诱导产生针对 H5 亚型所有 clade 的广谱性中和抗体, 并且发现主动免疫和被动免疫都能保护小鼠不受其他 clade H5N1 病毒致死剂量的攻击。Wang 等^[9]研究发现, 表达 H3 亚型流感病毒 HA 的质粒 DNA 多次免疫小鼠, 亦可产生广谱中和抗体, 被动免疫亦有保护作用。另外, DNA 疫苗初免结合腺病毒载体疫苗加强免疫, 或者 DNA 疫苗初免, 并结合灭活疫苗或活病毒疫苗加强免疫, 效果优于单一成分的免疫, 包括可诱

导更强的广谱中和抗体^[23,39]。

2.7 基于HA的病毒样颗粒疫苗

病毒样颗粒 (virus-like particle, VLP) 是由某种病毒的一个或多个结构蛋白自发组装形成模拟病毒粒子形态结构的纳米级蛋白复合物。VLP 以天然构象的形式展示病毒颗粒的表面抗原, 免疫原性优于病毒单体蛋白, 而且, 制备过程中无活体病毒复制过程, 也不含病毒基因组, 因而较其他类型的疫苗有更高的安全性。Bright 等^[40]研究发现, 由杆状病毒表达系统表达 H5N1 HA、NA 和 M1 构成 VLP 疫苗免疫小鼠, 可刺激产生针对 HA 的高滴度中和抗体。Steel 等^[41]将 HA head 基因替换成串联甘氨酸 G 的 linker, 获得 headless HA, 克隆成质粒 DNA, 同时将 headless HA 与 HIV Gag 一起包装成 VLP, 分别于第 0、21 天以 DNA 疫苗免疫小鼠, 第 56 天时用含有弗氏佐剂的 VLP 加强免疫, 能部分保护小鼠抵御同源病毒致死剂量的攻击。Flock House Virus 表达广谱中和抗体 CR6261 的中和表位, 形成 VLP, 免疫小鼠后产生类似 CR6261 的抗体, 但是, 这些抗体不足以有效保护小鼠免受流感病毒的攻击感染^[42]。2013 年, H7N9 在中国流行后, 研究人员设计杆状病毒表达 H7N9 HA/NA 抗原表位及 H5N1 M1 基因, 构成新型流感 VLP 疫苗, 免疫小鼠可诱导产生完全的保护作用, 而表达 H5N1 HA 的 VLP 对照组, 其保护率为零^[43], 提示单一 HA 诱导的中和抗体保护性有限。另一项研究中, Klausberger 等^[44]分别设计了 H7N9 上海株 (A/Shanghai/1/13) 和安徽株 (A/Anhui/1/13) HA 的 VLP 和只表达 H3N2 M1 的 VLP 对照组, 发现 0.03 μ g 的 HA VLP 蛋白即使免疫小鼠完全抵抗 100 LD₅₀ H7N9 病毒的攻击感染, 并且, 单次免疫和两次免疫的小鼠都诱导产生针对 Group 2 其他亚型 (H3、H15) 的交叉抗体。流感病毒 HA2 具有较好的保守性, 并能诱导广谱中和抗体, 因此, HA2 和其他抗原分子或模式识别受体组成的 VLP 成为新型流感疫苗研究的热点。

3 展望

HA 是流感病毒表面免疫原性最强的抗原, 诱导保护性中和抗体, 一直是研发流感疫苗的关键抗原。近年来广谱中和抗体的发现使血凝素受到更多的关注。研究人员将 HA 进行多种修饰作为免疫原, 如删除 HA 的头部, 或去除 HA 茎部片段, 或设计嵌合 HA, 或对 HA 寡聚糖基进行修饰; 采用各种活病毒载体、DNA 载体、VLP 等系统表达修饰 /

未修饰的 HA, 并采用不同的免疫策略如“初免-加强”等, 甚至与流感病毒或传统流感疫苗联合使用, 刺激机体产生广谱中和抗体, 从而获得广谱的免疫保护效果。以上各种尝试为新型流感疫苗的研制奠定了坚实基础, 并进一步确定诱导广谱且高效价中和抗体作为新型流感疫苗的研究方向。相对于其他蛋白表达系统, 以 VLP 表达系统制备的疫苗具有表达量高、免疫原性强、工艺成熟、制备相对简单、安全性高、副作用小等优点, 因此, VLP 系统表达修饰后的 HA, 并通过初免-加强免疫方式诱导广谱中和抗体可能是目前最有希望的通用型流感疫苗发展策略。随着对流感病毒致病机理、宿主免疫反应的深入了解, 以及依托迅猛发展的现代生物技术, 我们有理由相信战胜不断变异的流感病毒的新型疫苗终将研制成功。

[参 考 文 献]

- [1] Wang SS, Zhao ZD, Bi YH, et al. Tyrosine 132 phosphorylation of influenza A virus M1 protein is crucial for virus replication by controlling the nuclear import of M1. *J Virol*, 2013, 87(11): 6182-91
- [2] Pica N, Palese P. Toward a universal influenza virus vaccine: Prospects and challenges. *Annu Rev Med*, 2013, 64: 189-202
- [3] Du LY, Zhou YS, Jiang SB. Research and development of universal influenza vaccines. *Microb Infect*, 2010, 12(4): 280-6
- [4] Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 531-69
- [5] Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*, 2005, 79(5): 2814-22
- [6] Krammer F, Pica N, Hai R, et al. Hemagglutinin stalk-reactive antibodies are boosted following sequential infection with seasonal and pandemic H1N1 influenza virus in mice. *J Virol*, 2012, 86(19): 10302-7
- [7] Okuno Y, Isegawa Y, Sasao F, et al. A common neutralizing epitope conserved between the hemagglutinins of influenza A virus H1 and H2 strains. *J Virol*, 1993, 67(5): 2552-8
- [8] Ekiert DC, Wilson IA. Broadly neutralizing antibodies against influenza virus and prospects for universal therapies. *Curr Opin Virol*, 2012, 2(2): 134-41
- [9] Wang TT, Tan GS, Hai R, et al. Broadly protective monoclonal antibodies against H3 influenza viruses following sequential immunization with different hemagglutinins. *PLoS Pathog*, 2010, 6(2): e1000796
- [10] Dreyfus C, Laursen NS, Kwaks T, et al. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. *Science*, 2012, 337(6100): 1343-8
- [11] Krause JC, Tsibane T, Tumpey TM, et al. A broadly neutralizing human monoclonal antibody that recognizes a conserved, novel epitope on the globular head of the influenza H1N1 virus hemagglutinin. *J Virol*, 2011, 85(20): 10905-8
- [12] Hu HX, Voss J, Zhang GL, et al. A human antibody recognizing a conserved epitope of H5 hemagglutinin broadly neutralizes highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses. *J Virol*, 2012, 86(6): 2978-89
- [13] Yoshida R, Igarashi M, Ozaki H, et al. Cross-protective potential of a novel monoclonal antibody directed against antigenic site B of the hemagglutinin of influenza A viruses. *PLoS Pathog*, 2009, 5(3): e1000350
- [14] Johansson BE, Bucher DJ, Kilbourne ED. Purified influenza-virus hemagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody-response but induce contrasting types of immunity to infection. *J Virol*, 1989, 63(3): 1239-46
- [15] Wang TT, Tan GS, Hai R, et al. Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(44): 18979-84
- [16] Bommakanti G, Citron MP, Hepler RW, et al. Design of an HA2-based *Escherichia coli* expressed influenza immunogen that protects mice from pathogenic challenge. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(31): 13701-6
- [17] Krammer F, Pica N, Hai R, et al. Chimeric hemagglutinin influenza virus vaccine constructs elicit broadly protective stalk-specific antibodies. *J Virol*, 2013, 87(12): 6542-50
- [18] Krammer F, Margine I, Hai R, et al. H3 stalk-based chimeric hemagglutinin influenza virus constructs protect mice from H7N9 challenge. *J Virol*, 2014, 88(4): 2340-3
- [19] Wang CC, Chen JR, Tseng YC, et al. Glycans on influenza hemagglutinin affect receptor binding and immune response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(43): 18137-42
- [20] Chen JR, Yu YH, Tseng YC, et al. Vaccination of monoglycosylated hemagglutinin induces cross-strain protection against influenza virus infections. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(7): 2476-81
- [21] Traynor K. First recombinant flu vaccine approved. *Am J Health-Syst Pharm*, 2013, 70(5): 382
- [22] Kim JY, Choi Y, Nguyen HH, et al. Mucosal immunization with recombinant adenovirus encoding soluble globular head of hemagglutinin protects mice against lethal influenza virus infection. *Immune Netw*, 2013, 13(6): 275-82
- [23] Wei CJ, Boyington JC, McTamney PM, et al. Induction of broadly neutralizing H1N1 influenza antibodies by vaccination. *Science*, 2010, 329(5995): 1060-4
- [24] Wei CJ, Yassine HM, McTamney PM, et al. Elicitation of broadly neutralizing influenza antibodies in animals with previous influenza exposure. *Sci Transl Med*, 2012, 4(147): 147ra114
- [25] Peters W, Brandl JR, Lindbloom JD, et al. Oral administration of an adenovirus vector encoding both an avian influenza A hemagglutinin and a TLR3 ligand induces antigen specific granzyme B and IFN- γ T cell responses in

- humans. *Vaccine*, 2013, 31(13): 1752-8
- [26] Gocnik M, Fislava T, Mucha V, et al. Antibodies induced by the HA2 glycopolyptide of influenza virus haemagglutinin improve recovery from influenza A virus infection. *J Gen Virol*, 2008, 89(Pt 4): 958-67
- [27] Hessel A, Schwendinger M, Holzer GW, et al. Vectors based on modified vaccinia ankara expressing influenza H5N1 hemagglutinin induce substantial cross-clade protective immunity. *PLoS One*, 2011, 6(1):1
- [28] Hessel A, Savidis-Dacho H, Coulibaly S, et al. MVA vectors expressing conserved influenza proteins protect mice against lethal challenge with H5N1, H9N2 and H7N1 viruses. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88340
- [29] Hu YC. Baculovirus vectors for gene therapy. *Adv Virus Res*, 2006, 68: 287-320
- [30] Hu YC, Yao K, Wu TY. Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens. *Expert Rev Vaccines*, 2008, 7(3): 363-71
- [31] Prabakaran M, Velumani S, He F, et al. Protective immunity against influenza H5N1 virus challenge in mice by intranasal co-administration of baculovirus surface-displayed HA and recombinant CTB as an adjuvant. *Virology*, 2008, 380(2): 412-20
- [32] Prabakaran M, Madhan S, Prabhu N, et al. Gastrointestinal delivery of baculovirus displaying influenza virus hemagglutinin protects mice against heterologous H5N1 infection. *J Virol*, 2010, 84(7): 3201-9
- [33] Prabakaran M, He F, Meng T, et al. Neutralizing epitopes of influenza virus hemagglutinin: target for the development of a universal vaccine against H5N1 lineages. *J Virol*, 2010, 84(22): 11822-30
- [34] Chen CY, Liu HJ, Tsai CP, et al. Baculovirus as an avian influenza vaccine vector: Differential immune responses elicited by different vector forms. *Vaccine*, 2010, 28(48): 7644-51
- [35] Chen CY, Lin SY, Cheng MC, et al. Baculovirus vector as an avian influenza vaccine: hemagglutinin expression and presentation augment the vaccine immunogenicity. *J Biotechnol*, 2013, 164(1): 143-50
- [36] Tang DC, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune-response. *Nature*, 1992, 356(6365): 152-4
- [37] Chen Q, Kuang H, Wang H, et al. Comparing the ability of a series of viral protein-expressing plasmid DNAs to protect against H5N1 influenza virus. *Virus Genes*, 2009, 38(1): 30-8
- [38] Zhou F, Wang GQ, Buchy P, et al. A triclade DNA vaccine designed on the basis of a comprehensive serologic study elicits neutralizing antibody responses against all clades and subclades of highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses. *J Virol*, 2012, 86(12): 6970-8
- [39] Wang S, Parker C, Taaffe J, et al. Heterologous HA DNA vaccine prime-inactivated influenza vaccine boost is more effective than using DNA or inactivated vaccine alone in eliciting antibody responses against H1 or H3 serotype influenza viruses. *Vaccine*, 2008, 26(29-30): 3626-33
- [40] Bright RA, Carter DM, Crevar CJ, et al. Cross-clade protective immune responses to influenza viruses with H5N1 HA and NA elicited by an influenza virus-like particle. *PLoS One*, 2008, 3(1): e1501
- [41] Steel J, Lowen AC, Wang TT, et al. Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. *mBio*, 2010, 1(1): e00018-10
- [42] Schneemann A, Speir JA, Tan GS, et al. A virus-like particle that elicits cross-reactive antibodies to the conserved stem of influenza virus hemagglutinin. *J Virol*, 2012, 86(21): 11686-97
- [43] Smith GE, Flyer DC, Raghunandan R, et al. Development of influenza H7N9 virus like particle (VLP) vaccine: homologous A/Anhui/1/2013 (H7N9) protection and heterologous A/chicken/Jalisco/CPA1/2012 (H7N3) cross-protection in vaccinated mice challenged with H7N9 virus. *Vaccine*, 2013, 31(40): 4305-13
- [44] Klausberger M, Wilde M, Palmberger D, et al. One-shot vaccination with an insect cell-derived low-dose influenza A H7 virus-like particle preparation protects mice against H7N9 challenge. *Vaccine*, 2014, 32(3): 355-62