

综述

流感疫苗研制的新策略

刘志辉^{1,2}, 姜涛², 秦鄂德², 冉多良¹, 秦成峰²

1 新疆农业大学 动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

2 军事医学科学院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

刘志辉, 姜涛, 秦鄂德, 等. 流感疫苗研制的新策略. 生物工程学报, 2012, 28(5): 550-556.

Liu ZH, Jiang T, Qin ED, et al. Progress in new vaccine strategies against influenza: a review. Chin J Biotech, 2012, 28(5): 550-556.

摘要: 流感病毒感染可引起急性呼吸道传染病, 严重危害人类的健康与生命。疫苗免疫是防控流感的重要手段。目前广泛应用的传统灭活疫苗和减毒活疫苗, 在预防流感中发挥了重要作用, 但存在通用性差和免疫效率低等不足。研制更为安全高效特别是能针对多种流感亚型的新型广谱疫苗成为当前流感疫苗研究的热点。随着结构生物学和反向遗传生物学等新技术的迅速发展, 一些新策略不断应用于新型流感疫苗的研究, 显示出良好的应用前景。

关键词: 流感病毒, 疫苗, 新技术, 弹性蛋白酶, 病毒样颗粒

Progress in new vaccine strategies against influenza: a review

Zhihui Liu^{1,2}, Tao Jiang², Ede Qin², Duoliang Ran¹, and Chengfeng Qin²

1 College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

2 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: Influenza, caused by influenza virus, is a serious respiratory illness which poses a global public health threat. Vaccination is the primary strategy for the prevention and control of influenza. Although both inactivated vaccines and the live attenuated vaccines are effective in preventing influenza, the current vaccines have poor efficacy in the elderly and fail to provide protection against heterosubtype viruses. Development of a safer and more effective influenza vaccine that provides broad cross protection, overcoming the intrinsic limitation of the current vaccines, has been a scientific challenge.

Received: September 6, 2011; **Accepted:** November 24, 2011

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2010CB534002), National Natural Science Foundation of China (No. 81000722).

Corresponding author: Chengfeng Qin. Tel: +86-10-66948604; E-mail: qincf@bmi.ac.cn

Duoliang Ran. E-mail: xjrd17@163.com

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2010CB534002), 国家自然科学基金 (No. 81000722) 资助。

During the past decades, structural biology, reverse genetic and other virological technologies developed quickly and sped the progress of influenza vaccinology. Some new strategies for developing influenza vaccine have been generated, produced encouraging results, which showed great prospect as next-generation of influenza vaccines.

Keywords: influenza virus, vaccine, new technologies, elastase, virus-like particle

流行性感冒, 简称流感, 是由流感病毒 (特别是 A 型流感病毒) 感染引起的一种急性呼吸道传染病, 严重危害人类健康。截止到目前为止共爆发 4 次全球性流感大流行, 每次都给人类带来了重大的损失, 其中 1918 年的西班牙流感大流行导致全球 5 000 万~1 亿人死亡。2009 年暴发的甲型 H1N1 流感大流行蔓延至全球 200 余个国家和地区, 确诊的死亡病例近 2 万人^[1]。另外, 据世界卫生组织 (WHO) 估计, 全球每年大约有 10 亿人感染流感, 重症患者约为 300~500 万人, 死亡病例超过 30 万人^[2]。

流感病毒属正粘病毒科成员, 包括甲、乙和丙三种型别。其中甲型和乙型流感病毒是导致流感流行的主要病原体。流感病毒基因组为单股负链 RNA, 包含 8 个节段。依据病毒主要结构蛋白血凝素 (Hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (Neuraminidase, NA) 的抗原性, 甲型流感病毒分为 16 个 H 亚型 (H1-H16) 和 9 个 N 亚型 (N1-N9)。不同亚型的流感病毒株之间往往缺乏有效的交叉免疫保护。同时, 甲型流感病毒易发生突变, 在人群免疫压力下, 流感病毒的抗原性不断发生变异, 导致抗原漂移和抗原转换, 从而逃避人体的免疫监视。

目前临床应用的流感疫苗主要是三价灭活疫苗, 其成分包括季节性 H1N1 和 H3N2 甲型流感病毒以及乙型流感病毒。早期的灭活全病毒疫苗副作用大且不适用于 12 岁以下儿童^[3]。目前的流感灭活疫苗主要是裂解疫苗, 它是由 WHO

每年针对流感病毒流行状况预测下一年流感的流行, 从而提供疫苗参考毒株而制备的灭活裂解疫苗。其较灭活全病毒疫苗更为安全, 副作用轻微, 但只有当病毒和疫苗毒株相匹配时, 疫苗才能发挥保护功能, 且其依靠鸡胚生产, 产能有限, 特别是难以满足全球性流感大流行时对疫苗的需求^[4]。因此, 研制针对多种流感亚型、安全高效, 易于生产的新型广谱疫苗成为当前流感疫苗研究的热点。以下对新型流感疫苗的研究策略进行了综述。

1 血凝素靶向修饰减毒策略

血凝素是流感病毒重要的结构蛋白, 在病毒感染宿主细胞的过程中发挥重要作用。当流感病毒吸附至宿主细胞表面时, 血凝素 HA2 亚基构象发生改变, 其氨基端的融合肽暴露, 与内涵体膜结合, 从而介导流感病毒的内吞^[5]。因此, 当血凝素的 HA0 前体经宿主蛋白酶裂解为 HA1 和 HA2 时, 流感病毒方具有感染性。基于血凝素这一特性, Stech 等建立了流感病毒血凝素靶向修饰减毒新策略^[6]。利用反向遗传学技术, Stech 等对季节性 H1N1 甲型流感病毒 A/WSN/33 株的血凝素酶切位点进行突变, 用缬氨酸 (Val) 代替第 343 位的精氨酸 (Arg), 使血凝素的裂解由依赖于胰蛋白酶转变为严格地依赖于弹性蛋白酶 (Elastase)。所获得的病毒突变体, 在弹性蛋白酶存在下, 其体外生物学特征基本保持不变; 当感染人时, 由于人体内缺少弹性蛋白酶, 因此突变

病毒的毒力将显著降低, 而其免疫原性得以保留。在小鼠试验中, 病毒突变体感染组, 在感染后第 3 天的肺部病毒载量比野毒株组低 4 个数量级, 同时, 在小鼠的脑和心脏组织中也检测不到病毒。当以 10^6 FPU 的剂量的突变体免疫小鼠, 可诱导高水平的 IgG 抗体, 并产生对野毒株完全的免疫保护。

Gabriel 研究小组随后将这一策略成功应用在高致病性禽流感病毒疫苗的研制中^[7]。H7N7 禽流感病毒 SC35M-PB2_{333T} 株的 342 位的精氨酸被突变为缬氨酸, 同时 339~341 位的氨基酸被删除。所获得的禽流感病毒突变体在小鼠体内显示出同样的减毒特征和良好的免疫原性。

为了观察这一策略在流感病毒自然宿主中的作用, Masic 等将该策略在猪流感病毒疫苗研究上进行了尝试^[8]。H1N1 亚型的猪流感病毒第 345 位的精氨酸分别突变为缬氨酸和丙氨酸。如果在细胞培养体系加入弹性蛋白酶, 所获得的两株突变体增殖活性与野生病毒相同; 而未加入弹性蛋白酶时, 突变体的增殖则严格受到限制。突变体在自然宿主猪中亦具有明显的减毒特征。突变体病毒感染组的猪肺组织病毒滴度以及病理损伤均低于野生型病毒组。结果显示, 病毒接种后第 5 天, 突变体组的猪肺部仅有轻微的病变, 且未检测到病毒, 而野毒株组的猪肺部病变组织将近 30%, 肺部病毒载量更达 $10^{3.5} \sim 10^{4.5}$ TCID₅₀/g。病毒突变体具有良好的免疫原性, 免疫猪可诱导产生高水平的体液和细胞免疫应答, 其淋巴细胞和 γ -IFN 分泌细胞显著增多。特异 IgG 和 IgA 抗体效价在免疫后第 5 天分别高达 1:1967 和 1:2209。此外, 突变体病毒不仅可诱导对野生型病毒完全的免疫保护, 也可产生针对 H3N2 亚

型的猪流感病毒的部分交叉免疫保护^[9]。

基于血凝素靶向修饰的流感病毒减毒途径适用于所有亚型的流感病毒, 并且其减毒病毒来源于同源的野生型病毒, 避免了产生新的抗原重组体的风险, 是非常具有应用前景的构建流感减毒疫苗的新策略。然而, 目前已报道的靶向修饰策略仍不稳定。Masic 的研究也表明用 Stech 和 Gabriel 研究小组已经成功的猪胰弹性蛋白酶 (Porcine pancreatic elastase) 不能拯救出猪流感病毒减毒株, 而只能用人嗜中性细胞弹性蛋白酶 (Human neutrophil elastase) 才能拯救出流感减毒病毒, 拯救出的流感病毒在猪胰弹性蛋白酶 (Porcine pancreatic elastase) 存在的培养基中连续传代后测序发现 344 位裂解位点的氨基酸突变为脯氨酸 (Pro)^[8]。我们在对新甲型 H1N1 流感病毒进行血凝素靶向修饰时则发现, 在病毒拯救过程中其突变位点易突变为原来的序列, 且用猪胰弹性蛋白酶不能拯救出流感病毒突变体。由于对血凝素裂解过程的细节与机制仍不完全清楚, 因此也很难分析发生回复突变的原因。显然, 深入了解和认识血凝素结构与功能是有有效开展血凝素靶向修饰减毒策略的重要前提。

2 流感病毒样颗粒疫苗

病毒样颗粒 (Virus-like particle, VLP) 疫苗是一类兼顾安全性与免疫原性的疫苗形式。与其他单一的蛋白或多肽形式的疫苗相比, VLP 疫苗在结构和蛋白组成上与病毒相似, 可诱导高水平的体液免疫应答。同时 VLP 疫苗不含病毒基因组, 不具有感染性, 安全性较好。目前已有多种 VLP 疫苗, 例如乙型肝炎病毒和人乳头瘤病毒 VLP 疫苗已被批准应用于临床^[10]。

流感 VLP 疫苗含有流感病毒的主要保护性抗原 HA、NA 及 M 结构蛋白,可形成与流感病毒相似的空心颗粒。其制备方法是将流感病毒主要结构蛋白基因克隆至杆状病毒等表达载体,在相应的靶细胞中合成流感病毒的结构蛋白,装配成病毒样颗粒并以出芽的方式释放至胞外,从而获得流感 VLP^[11]。目前已经报道的流感 VLP 表达系统包括重组牛痘病毒、重组 DNA 质粒表达系统和重组杆状病毒表达系统等^[12]。

动物实验显示,流感 VLP 疫苗具有良好的免疫原性,并可诱导长效的免疫保护。Kang 等用 H5N1 亚型流感病毒 A/VietNam1203/04 株 VLP 免疫小鼠诱导的针对同源野毒株的免疫保护作用长达 7 个月^[13]。在另一研究中,基于 H1N1 亚型流感病毒 A/California/04/2009 株的 VLP 疫苗免疫小鼠,不仅能诱导对野毒株完全的免疫保护,对季节性 H1N1 亚型流感病毒 A/PR/8/1934 株也可产生部分免疫保护^[14]。

Novavax 公司于 2010 年在 18~64 岁之间的健康人群中,对流感 VLP 疫苗的安全性、耐受性及免疫保护效果进行了评估^[15]。临床实验显示流感 VLP 疫苗具有良好的耐受性和安全性,在疫苗接种组出现不良反应的种类、比例与对照组大致相同。VLP 疫苗可诱导产生稳定的免疫保护作用。受试者分别接种 5 μg 、15 μg 和 45 μg 剂量的流感 VLP 疫苗,2 周后的血清阳转率(血凝抑制滴度 $\geq 1:40$) 可达到 64%、79% 和 85%。

流感 VLP 疫苗已进入三期临床试验阶段,且表现出良好的免疫效果。流感病毒 VLP 疫苗和传统疫苗相比,其明显的优势在于其生产不依赖于鸡胚,而是基于培养细胞,这将能克服大流感流行时由于鸡胚不足而使疫苗供应短缺的问

题^[11],具有重要的现实意义。

3 MicroRNA 介导的减毒新策略

microRNA (miRNA) 是一类进化上保守的非编码小分子 RNA,具有在翻译水平调控基因表达的功能。miRNA 与其靶序列的结合,可抑制其翻译。如果在病毒基因组中插入宿主 miRNA 的靶序列,在病毒感染宿主细胞的复制增殖过程中,miRNA 与病毒 RNA 上的靶序列结合,抑制病毒 RNA 的翻译和病毒的增殖,从而导致减毒,这就是 miRNA 介导的病毒减毒策略。由于其基于机体中固有的 miRNA 与人工插入病毒基因组的靶序列互补而介导的翻译抑制,所以此途径适用于各种亚型流感病毒减毒株的构建。该技术目前已在多种病毒减毒疫苗有成功尝试,例如脊髓灰质炎病毒^[16]、柯萨奇病毒^[17]和水疱性口炎病毒^[18]等。

miR-93 是哺乳动物机体内普遍存在的一种 miRNA,在人和鼠成纤维细胞中的表达是保守的。基于这一特征,Jasmine 等通过点突变的方法在流感病毒核衣壳蛋白保守区引入 miR-93 靶序列,分别获得 H1N1 和 H5N1 亚型流感病毒减毒株^[19]。这些减毒株即使高滴度接种小鼠,仍不能使小鼠致病。同时,减毒株免疫原性良好,接种小术后可诱导高水平的体液免疫应答,对野毒株的攻击产生完全的免疫保护。更重要的是,由于 miR-93 在鸡胚中含量极低,减毒株在鸡胚中的增殖不受抑制,其生长特性与野毒株相同,因此仍能采用鸡胚培养的方式大量制备。

4 广谱流感疫苗

目前使用的流感疫苗均针对特定的流感毒

株。疫苗毒株与流行的流感毒株相匹配时,其诱导的中和抗体才可产生免疫保护效果,反之则无法提供有效的免疫保护,因而流感疫苗的毒株组成要随着流感流行株的改变而不断做出相应的调整。

值得注意的是很多研究都发现不同亚型和同亚型的流感病毒间确实存在交叉免疫保护作用,尽管交叉保护效果较差^[20-21]。我们早先的研究也证实 2009 年新甲型 H1N1 流感大流行前,我国一定比例的老年人群同样也已存在针对新型流感病毒交叉抗体^[22]。此外,我们还发现,季节性流感疫苗的多次加强免疫可提高交叉抗体的水平^[23]。显然,流感病毒存在一些保守的靶点,可诱导针对同一亚型和不同亚型流感病毒的免疫应答,但以传统流感疫苗的形式,无法有效发挥其交叉保护效果。因此,一直以来,研究者不断在尝试寻找这些保守的靶点,探索新的策略研制广谱流感疫苗,使其可对现在流行的毒株及新出现的流行株提供持续的交叉免疫保护。

流感病毒 M2e 蛋白(即 M2 蛋白的胞外区)氨基末端的 24 个氨基酸残基非常保守,特别是末端 2~9 位的氨基酸残基(SLLTEVET)在所有亚型的甲型流感病毒中均是保守的^[24]。目前,已报道多种基于 M2e 保守区的广谱流感疫苗,这些疫苗可诱导针对多种亚型的流感病毒的保护性的免疫反应,可降低小鼠肺部的病毒载量,并保护小鼠免受致死量流感病毒的攻击^[25]。

Song 等采用 H1N1 亚型流感病毒 A/PR/8/34 株灭活疫苗与含有 M2e 蛋白的病毒样颗粒(M2-VLPs)免疫小鼠,诱导产生的抗 M2 特异抗体水平和细胞免疫反应显著高于灭活疫苗单独免疫组;对不同亚型的流感病毒可诱导交叉免疫保护作用^[26]。免疫小鼠分别接种致死剂量的

H3N2 亚型、H5N1 亚型和大流行 H1N1 亚型病毒株,均只有轻微的体重降低,鼠肺病毒载量也显著低于未免疫组。

一期临床研究已初步证实基于 M2e 的广谱流感疫苗是安全有效的^[27]。结果显示, M2e 疫苗具有很好的免疫原性,可诱导高水平的特异抗体,尤其与佐剂联合使用时,90%的疫苗接种者均产生特异抗体。此外,试验中并没有观察到对疫苗的不良反应。因此,基于 M2e 的疫苗有很大的潜力发展成为安全有效的流感疫苗。

除 M2e 外,基于血凝素的广谱流感疫苗也是目前流感疫苗研究的热点。尽管流感病毒的血凝素有高度的变异性,但它仍包含一些保守序列。这些保守序列也是广谱流感疫苗的潜在靶标。例如,HA2 的氨基末端融合肽的前 11 个残基,在目前已知的所有甲型流感病毒中高度保守^[28]。研究发现针对 HA2 融合肽的特异性抗体可中和不同 HA 亚型的流感病毒,包括 H5N1 禽流感病毒和 1918 年 H1N1 流感病毒;免疫小鼠亦能诱导完全免疫保护^[28-29],这显示出基于 HA2 保守位点广谱流感疫苗良好的应用前景。此外,在正常情况下,HA2 的融合肽位于病毒表面蛋白内部,无法暴露于外,难以诱导相应的特异抗体^[30]。Steel 等将血凝素 HA1 亚单位切除,使 HA2 暴露。这种基于“去头”HA2 的 DNA 疫苗在小鼠上,可诱导针对多种亚型流感病毒的免疫保护作用。这为广谱流感疫苗的研制提供了一种新的思路。

5 展望

流感病毒的典型特点在于其快速的突变和重组,导致其抗原性的不断变异。不同流感病毒

毒株之间的基因重组是不断产生新的流感病毒株的主要原因之一,且有相当部分的重组毒株或者其致病性和毒力升高,或者具有了跨种属传播的能力,这类新的重组病毒往往容易导致流感大流行的产生^[31]。2009年新甲型H1N1流感病毒就是由多种猪流感病毒重组进化的结果^[32],而我们研究发现其与季节性H1N1流感病毒重组后在小鼠中致病性显著增高。相关研究也证实新甲型H1N1与季节性H3N2和禽流感H9N2病毒的重组也可导致类似的毒力增强现象^[31-33]。

面对不断变异的流感病毒,传统的疫苗以及疫苗工业愈来愈难以应对。因此,从流感疫苗的实际需求出发,新型的流感疫苗应至少满足三方面的要求。首先是广谱针对多种亚型流感病毒,尤其是对新出现的流感病毒提供免疫保护,这不仅在应对流感大流行上具有重要意义,同时在疫苗生产上也将避免传统流感疫苗经常改变疫苗株的弊端,经济意义重大。其次是更为安全、高效,在不同人群中均可产生理想的预防效果;三是易于生产,基于鸡胚的传统疫苗生产方式效率差,产量低,极大局限了流感疫苗的接种率,也难以应对流感大流行时疫苗生产的需要。

目前虽然各种新型流感疫苗蓬勃发展,展现了良好的应用前景,但仍多处于实验室研究阶段,距离临床应用仍有很长的路要走。近些年来,对流感病毒了解的不断加深,特别是对病毒蛋白结构与功能的明确,免疫和致病机制的逐渐阐明,为新型流感疫苗策略的探索提供了重要的依据。如何更进一步地加深对流感病毒的认识,以及基于新的研究发现和生物学技术去探索疫苗新途径与新策略,仍将是未来一段时间内流感疫苗研究中最重要挑战。

REFERENCES

- [1] World health organism Pandemic (H1N1) 2009 update 111 [EB/OL]. [2011-09-05]. http://www.who.int/csr/don/2010_07_30/en/index.html.
- [2] World health organism. Seasonal epidemics [EB/OL]. [2011-09-05] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html>.
- [3] Ruben FL. Inactivated influenza virus vaccines in children. *Clin Infect Dis*, 2004, 38(5): 678-688.
- [4] Palache B. New vaccine approaches for seasonal and pandemic influenza. *Vaccine*, 2008, 26(49): 6232-6236.
- [5] Stegmann T. Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. *Traffic*, 2000, 1(8): 598-604.
- [6] Stech J, Garn H, Wegmann M, et al. A new approach to an influenza live vaccine: modification of the cleavage site of hemagglutinin. *Nat Med*, 2005, 11(6): 683-689.
- [7] Gabriel G, Garn H, Wegmann M, et al. The potential of a protease activation mutant of a highly pathogenic avian influenza virus for a pandemic live vaccine. *Vaccine*, 2008, 26(7): 956-965.
- [8] Masic A, Babiukt LA, et al. Reverse genetics-generated elastase-dependent swine influenza viruses are attenuated in pigs. *J Gen Virol*, 2009, 90(2): 375-385.
- [9] Masic A, Booth JS, Mutwiri GK, et al. Elastase-dependent live attenuated swine influenza A viruses are immunogenic and confer protection against swine influenza A virus infection in pigs. *J Virol*, 2009, 83(19): 10198-10210.
- [10] Roldão A, Mellado MCM, Castilho LR, et al. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccine*, 2010, 9(10): 1149-1176.
- [11] Hneyes JR. Influenza virus-like particle vaccine. *Vaccine*, 2009, 8(4): 435-445.
- [12] Kang SM, Song JM, Quan FS, et al. Influenza vaccines based on virus-like particles. *Virus Res*, 2009, 143(2): 140-146.

- [13] Kang SM, Yoo DG, Liptov AS, et al. Induction of long-term protective immune responses by influenza H5N1 virus-like Particles. *PLoS ONE*, 2009, 4(3): e4667.
- [14] Quan F-S, Vunnavaa A, Compans RW, et al. Virus-like particle vaccine protects against 2009 H1N1 pandemic influenza virus in mice. *PLoS ONE*, 2010, 5(2): e9161.
- [15] López-Macias C, Ferat-Osorio E, Tenorio-Calvol A, et al. Safety and immunogenicity of a virus-like particle pandemic influenza A_(H1N1)_2009 vaccine in a blinded, randomized, placebo-controlled trial of adults in Mexico. *Vaccine*, 2011, 29(44): 7826–7834.
- [16] Barnes D, Kunitomi M, Vignuzzi M, et al. Harnessing endogenous miRNAs to control virus tissue tropism as a strategy for developing attenuated virus vaccines. *Cell Host Microbe*, 2008, 4(3): 239–248.
- [17] Kelly EJ, Hadac EM, Greiner S, et al. Engineering microRNA responsiveness to decrease virus pathogenicity. *Nat Med*, 2008, 14(11): 1278–1283.
- [18] Edge RE, Falls TJ, Brown CW, et al. A let-7 MicroRNA-sensitive vesicular stomatitis virus demonstrates tumor-specific replication. *Mol Ther*, 2008, 16(8): 1437–1443.
- [19] Perez JT, Pham AM, Lorini MH, et al. MicroRNA-mediated species-specific attenuation of influenza A virus. *Nat Biotech*, 2009, 27(6): 1572–576.
- [20] Tamura S, Tanimoto T, Kurata T. Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. *Jpn J Infect Dis*, 2005, 58(4): 195–207.
- [21] Hancock K, Veguilla V, Lu XH, et al. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N Engl J Med*, 2009, 361(20): 1945–1952.
- [22] Jiang T, Li XF, Liu W, et al. Serum antibody response to the novel influenza A (H1N1) virus in the elderly. *Clin Infect Dis*, 2010, 50(2): 285–286.
- [23] Qin CF, Jiang T, Han JF, et al. Additional seasonal influenza virus vaccinations for the 2009 H1N1 pandemic. *Clin Vaccine Immunol*, 2010, 17(5): 887–888.
- [24] Fiers W, Filette MD, Birkett A, et al. A ‘universal’ human influenza A vaccine. *Virus Res*, 2004, 103(12): 173–176.
- [25] Ebrahimi SM, Tebinian M. Influenza A viruses: why focusing on M2e-based universal vaccines. *Virus Genes*, 2011, 42(1): 1–8.
- [26] Song JM, Rooijen NV, Bozja J, et al. Vaccination inducing broad and improved cross protection against multiple subtypes of influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci*, 2011, 108(2): 757–761.
- [27] Fiers W, Filette MD, Bakkouri KE, et al. M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine*, 2009, 27(45): 6280–6283.
- [28] Sui JH, Hwang WC, Perez S, et al. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16(3): 265–273.
- [29] Prabhu N, Pra-akaran-M, Ho HT, et al. Monoclonal antibodies against the fusion peptide of hemagglutinin protect mice from lethal influenza A virus H5N1 infection. *J Virol*, 2009, 83(6): 2553–2562.
- [30] Steel J, Lowen AC, Wang TT, et al. An influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. *MBio* 2010, 1(1): e00018–10.
- [31] Sun YP, Qin K, Wang JJ, et al. High genetic compatibility and increased pathogenicity of reassortants derived from avian H9N2 and pandemic H1N1/2009 influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(10): 4164–4169.
- [32] Smith GJD, Vijaykrishna D, Bahl J, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*, 2009, 459(7250): 1122–1125.
- [33] Schrauwen EJA, Herfst S, Chutinimitkul S, et al. Possible increased pathogenicity of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus upon reassortment. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(2): 200–208.