

---

# 發展中的流感疫苗：廣效型疫苗

鄭金益<sup>1</sup> 吳夙欽<sup>2</sup>

**摘要：**流行性感感冒對人類健康持續造成威脅，其主要肇因於疫苗的保護力不完整以及逐漸散佈的對抗病毒藥物的抗藥性。特別是在發生流感大流行的時候，這樣的問題更顯急迫，這也決定了發展更加安全而且有效對抗各型流感病毒的疫苗的重要性。本文簡述廣效型流感疫苗的概念與發展狀況，這類疫苗以流感病毒主要結構蛋白 M2e、HA 以及其他蛋白上高度保留的胺基酸序列為發展標的，企圖建構可以對抗各個時期、來自不同區域的各種病毒株的有效疫苗。文中整理相關的研究的成果，並說明此類疫苗的發展潛力與可能性。

**關鍵詞：**流行性感感冒病毒，抗原決定區域，泛基因體學，廣效型疫苗  
(台灣醫學 Formosan J Med 2011;15:)

流行性感感冒一直是人類社會常見的呼吸道疾病，經過多年的研究發展，若干抗病毒藥物以及去活化的三價疫苗(inactivated trivalent vaccine)已被廣泛運用在流感的治療與預防上。然而流感病毒本身是種很不穩定的病原體，常常經由抗原漂移(antigenic shift)與抗原轉換(antigenic drift)等分子機制，造成主要表面抗原的改變。這使得每一季的病毒疫苗株所產生的免疫力，到了隔年便降低了保護的效果，因此每年都需要再接再種一次依據監測結果所製造出來的流感疫苗。一旦有新的突變株出現，例如：2009 年的新型流感，將對人類社會產生重大的威脅。因此，如何在流感疫苗的發展和置備上突破現況，便成為重要的課題。

回顧人類疫苗的發展，從最早的以種牛痘預防天花開始，到今天後基因體時代(post-genomic era)的來臨，其中主要的沿革與技術發展如表一所示[1]。隨著對於病原體的基因種類及相關演變的瞭解日深，再結合對於免疫途徑、機制的研究成果以及新一代佐劑的開發。使得疫苗開發的目標從單一效價到多價疫苗的發展，進而延伸至具多重保護效果的廣效型疫苗(universal vaccine)的開發。

## 流感疫苗的組成：A 型流感病毒的

## 關鍵蛋白(key proteins)

A 型流感病毒的八段 RNA 基因片段主要製造下列病毒蛋白：結構蛋白(structural protein)類有血球凝集素(haemagglutinin, HA)、神經胺酸酶(neuraminidase, NA)、膜蛋白(membrane protein, M)與核蛋白(nucleoprotein, NP)以及其它非結構性蛋白(nonstructural proteins)[2]。其中 HA、NA 和 M 蛋白的 M2 片段暴露於病毒的表面，為疫苗發展的主要對象[3]。

HA 蛋白為一種負責結合細胞表面接受體(receptor)並進行膜融合的醣蛋白(glycoprotein)：其辨識細胞表面含有 sialic acid 的蛋白，結合後促進病毒與宿主膜融合，進行 endocytosis 作用，病毒 RNA 接者進入細胞質。NA 蛋白則扮演去除細胞表面的 sialic acid，幫助病毒散佈[2]。HA 和 NA 通常為流感病毒主要抗原，通常以三聚體(trimer)和四聚體(tetramer)形式存在[4]。它們為主要誘發抗體的部位，為逃避抗體攻擊，成為高度變異的區域，造成每年都有些新的流行病毒株的產生。根據 HA 和 NA 蛋白的種類，A 型流感病毒可以分為 16 種 HA 子型(subtype)(H1-16)和 9 種 NA 子型(N1-9)。由它們組成現在所有已知的 A 型流感病毒[2]。

---

<sup>1</sup> 中台科技大學醫學生物科技研究所，<sup>2</sup> 清華大學生物科技研究所

通訊作者連絡處：鄭金益，中台科技大學醫學生物科技研究所，台中市北屯區廬子路 666 號。

E-mail: jyzheng@ctust.edu.tw

表一：疫苗研發的歷史過程—不同世代的疫苗發展所應用的技術沿革

源起	微生物學和血清學的研究
第一代疫苗	以實驗式驗證法，將細胞、病毒、致病因子、莢膜等具抗原性物質，注射至動物體內使其產生免疫力
第二代疫苗	透過基因體序列分析(analysis of genome sequence)尋找特定抗原(specific antigen)。這其中的技術研發包括：基因體學(genomics)、反轉疫苗學(reverse vaccinology)、進階多醣類化學(advanced polysaccharide chemistry) 以及蛋白質體學(proteomics)等學科的發展，而形式上也由病原體、蛋白質擴展至核酸疫苗、多醣體疫苗等等。
廣效型疫苗	結合分子流行病學，將基因體的分析，由病原體的單一分離株擴展到族群規模，透過泛基因體 (pangenomics) 的研究，尋找跨病原體或同病原體但不同分離株的共有抗原部分，經由適當形式的基因構築、表現與免疫過程後，達到廣泛性的保護效果。

取材自 Cassone and Rappuoli, 2010 [1]

A 型流感病毒的 M 基因製造兩種在各病毒株具備序列保留性的蛋白質—M1 和 M2：M1 為一殼蛋白(capsid)，組成病毒顆粒，為病毒組合(assembly)與出芽(budding)所需。M2 則為一離子通道蛋白(ion-channel protein)，其由三個部分所組成：N 端的外部區域(ectodomain, M2e)、中間一段穿膜區域(membrane-panning domain)以及 C 端位於細胞質的尾端。M2 參與病毒複製和保護 HA 的熟成(maturation)與結構完整性[5,6]。

其他流感病毒的蛋白，如：非結構蛋白 1(non-structural protein 1, NS1)和 NP 蛋白主要在調節 RNA 合成。NP 蛋白結合病毒 RNA 基因體，做為病毒和細胞間的轉接分子(adaptor molecule)。NS1 蛋白則做為一種調節因子，可與所有單股 RNA 分子產生非特異性結合[7,8]。

### 流感疫苗的限制與演變

前面提過傳統的由雞蛋生產的流感疫苗除了在先天上受限於病毒本身每年都有變異，其所受到的限制還包括：(1)長而複雜的生產流程；(2)有限的生產量；(3)因雞蛋蛋白所引起的過敏反應；(4)低免疫誘發力(immunogenicity)，無法產生廣泛中和病毒的能力[9,10]。

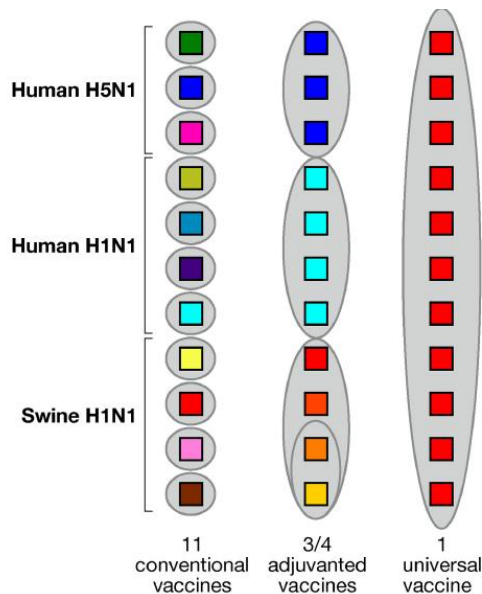
綜合因素的結果造成一旦新的疫苗隨著病毒株的演變而拼命產出後，同時也正是新的病毒株萌生的時候，造成免疫效果的不彰。一般而言，疫苗

從生產、有效性測試、通過相關法規的審查，到產品的行銷與運用大約需要一年的時間，此時，病毒也差不多產生了新的突變[1]。

新的努力，除了產程中生物材料由細胞培養取代雞蛋之外，分生技術的大量運用，將主要病毒蛋白的基因與衍生物，進行重組疫苗(recombinant vaccine)的發展，也被廣泛研究中。其中包括：重組病毒蛋白或合成抗原肽[11]、帶有病毒抗原的病毒載體(viral vector)[12]、DNA 疫苗[13]以及帶有 HA 和 NA 蛋白的病毒體疫苗(virosomal vaccine)和類病毒顆粒(virus-like particle; VLP)[14]等等。

其中同時結合免疫途徑的研究及佐劑的開發使得初步的跨株免疫得以成形：有的構形是與 Toll-like receptors 的結合物串連在一起，從而促進天然免疫(innate immunity)的發生[3,11,15,16]。而油水混合型佐劑，如：MF59 和 ASO<sub>3</sub>，的運用，可以幫助較差抗原性的部位誘發抗體產生[17]，使得流感疫苗的形式由單價的特定抗原進展成多價的多抗原疫苗。未來透過泛基因體的研究，將歸納出各時期、各地域的各式分離株所共有的保留性抗原序列，進而發展成單一的廣效型疫苗(見圖一所示)。

### 廣效型流感疫苗的發展策略： 異中求同，在變異中找尋保留 下來的共同性



圖一：以最近對抗季節性和流行性 H1N1 流感病毒為代表的疫苗發展演變。其中佐劑的發展造就相近病毒株得以整合成多價疫苗形式。而未來則在泛基因體的研究中，找尋各時期、各地域的各式分離株所共有的保留性抗原序列，做為單一廣效型疫苗發展的基礎（取材自 Cassone and Rappuoli, 2010 [1]）。

廣效型流感疫苗的定義為一種疫苗可以提供對抗所有種類的流感病毒抵抗力產生的疫苗，所謂的所有種類甚至包含了那些未來新興的流行性病毒株。因此，其發展有賴於找出流感病毒主要蛋白質中保留性的胺基酸序列，這些片段除了在抗原性不會改變外，同時也存在於各個時間、地區所分離出的各式病毒分離株中；因而，一旦相關的疫苗被設計、生產出來後，希冀其能對各式流感病毒提供基本的抗體亦或細胞免疫相關的保護力。目前正在發展的廣效型流感疫苗的主要設計重點在於流感病毒的 M2e、HA 以及其他結構蛋白的保留性序列。以下便就各主要蛋白之保留性序列及相關研究，整理如下：

#### 一. 以 M2e 蛋白的保留性序列為基礎的廣效型流感疫苗的發展

M2 蛋白的胞外區域，M2e，主要由 N 端的 24 個胺基酸所組成，其在各分型的流感病毒株中具有高度保留性，尤其第 2 到第 9 個胺基酸(序列為 SLLTEVET)為所有 A 型流感所共有(見表

表二：人類主要 A 型流感病毒株之 M2e 區域(第 1 到 24 個胺基酸)序列保留性

H5N1	MSLLTEVET <b>P</b> TRNE <b>W</b> ECRCSDSSD
Swine-Origin 2009 H1N1	MSLLTEVET <b>P</b> TRSE <b>W</b> ECRCSDSSD
H1N1	MSLLTEVET <b>P</b> TRNE <b>W</b> GCRNDSSD
H1N2	MSLLTEVET <b>P</b> IRNE <b>W</b> EYRCSDDSSD
H2N2	MSLLTEVET <b>P</b> IRNE <b>W</b> GCRNDSSD
H3N2	MSLLTEVET <b>P</b> IRNE <b>W</b> GCRNDSSD
H7N2	MSLLTEVET <b>P</b> IRKG <b>W</b> ECNCSDSSD
H7N3	MSLLTEVET <b>P</b> TRNG <b>W</b> ECKCSDDSSD
H9N2	MSLLTEVET <b>L</b> TRNG <b>W</b> ECKCSDDSSD
	MSLLTEVET <b>L</b> TRNG <b>W</b> ECKCRDSSD

改編自 Du *et al.*, 2010 [3]。其中黑體字部分為變異處。

二)[18]。此一片段遂為廣效型疫苗的發展標的。

目前，以 M2e 為基礎的流感疫苗已經被證實能夠產生免疫反應而且能提供對抗無論是同源性(homologous)的病毒株亦或異源性(heterologous)的跨病毒株的保護效果。這些研究的抗原形式、免疫方法及所產生的效果，整理如表三所示。

以 M2e 為基礎的流感疫苗的第一期臨床試驗正在進行中[19]，測試其安全性及誘發免疫能力，顯示此類疫苗具有發展成廣效型疫苗的可能。

#### 二. 以 HA2 蛋白的保留性序列為基礎的廣效型流感疫苗的發展

雖然 HA 的球狀區域(globular domain)本身是主要的抗原區，同時也是最常發生變異的位置，而其保留的部分位於 HA2 次單位的 N 端負責病毒融合(fusion)的部位，特別是前面 11 個胺基酸，在所有流感病毒分離株中，僅有微小的改變(如表四所示)[20]。而相關的疫苗研究及成效整理如表五所示。

上述研究證明以 HA2 保留性融合肽區域為基礎的疫苗可以誘發對抗多型 A 型流感的免疫力，有希望進一步發展成廣效型疫苗。

#### 三. 以 HA1 蛋白的保留性序列為基礎的廣效型流感疫苗的發展

與 HA2 保留性融合肽區域相似，HA1 的若干區域也有發展成廣效型疫苗的可能。而相關的疫苗研究及成效整理如表六所示。

#### 四. 以 NP 蛋白的保留性序列為基礎的廣效型流感疫苗的發展

除了上述 M2e 和 HA 兩大主要抗原的保留性

表三：以 M2e 蛋白的保留性序列為基礎的廣效型流感疫苗研究

抗原區域	疫苗形式	免疫成效	出處
全長的 M2 蛋白	DNA 疫苗	讓小鼠產生足以對抗致死劑量流感病毒攻 毒試驗的 M2 專一性抗體。作者的研究同時 顯示先以 M2 為基礎的 DNA 疫苗注射，追 加以帶有 M2 基因的腺病毒載體(adenoviral vector) 可以增強 T 細胞和抗體的反應。來 自人類流感和禽流感的 M2 序列皆可產生 足以對抗致死劑量的包括 H5N1 禽流感在 內的 A 型流感病毒攻擊的能力。	21
保留性的抗原決定區域 序列 SLLTEVET	利用可辨識保留區域的單株抗進行實驗，發現其有中和病毒、 防護小鼠，降低其在致死劑量的 A/HK/68(H3N2)攻擊下，病毒 在肺部複製的能力。		22, 23, 24
	與 GCN4 蛋白結 合，構成四原體 (tetramer)	保護小鼠抵抗適鼠性 A 型流感病毒 X47 以 及 A/Victoria/3/75 H3N2 與 A/Puerto Rico/8/34 H1N1 的攻擊	25
	序列重複 4 次並與 flagelin 結合成重 組蛋白	誘發適量 M2E 專一性抗體產生，保護小鼠 抵抗致死劑量的 A 型流感攻擊，具防衛多 種 A 型流感的效果	11
	與 papaya mosaic virus 組成顆病毒 顆粒	誘導可以辨識 A 型流感病毒細胞的抗 M2e 抗體的產生，	26, 27
	與 B 型肝炎病毒 核心抗原組成 HBc 顆粒	誘發強烈 M2e 專一性抗體的產生，保護小 鼠抵抗適鼠性 A 型流感病毒 X47 的攻擊	28
	以奈瑟氏腦膜炎 雙球菌外膜蛋白 複合體為載體結 合抗原胜肽	防疫效果較 HBc 類病毒顆粒者為佳	29

表四：人類主要 A 型流感病毒株之 HA2 的 N 端區域具序列保留性

H5N1	<b>GLFGAIAGFIEGGWQ<b>GMVD</b></b> GWYGYHHSN
Swine-Origin	<b>GLFGAIAGFIEGGWT<b>GMVD</b></b> GWYGYHHQN
2009 H1N1	<b>GLFGAIAGFIEGGWT<b>GMID</b></b> GWYGYHHQN
H1N1	<b>GLFGAIAGFIEGGWT<b>GMVD</b></b> GWYGYHHQN
H1N2	<b>GLFGAIAGFIEGGWQ<b>GMVD</b></b> GWYGYHHSN
H2N2	<b>GI</b> FGAIAGFI <b>ENGWE<b>GMVD</b></b> GWY <b>GFR</b> HQN
H3N2	<b>GLFGAIAGFIENGWE<b>GLVD</b></b> GWY <b>GFR</b> HQN
H7N7	<b>GLFGAIAGFIENGWE<b>GLIN</b></b> GWY <b>GFR</b> HQN
H7N2	<b>GLFGAIAGFIENGWE<b>GLID</b></b> GWY <b>GFR</b> HQN
H7N3	<b>GLFGAIAGFIEGGW<b>PGLV</b></b> SGWY <b>GFQ</b> HAN
H9N2	<b>GLFGAIAGFIEGGW<b>PGLV</b></b> AGWY <b>GFQ</b> HSN

改編自 Du *et al.*, 2010 [3]。其中黑體字部分為變異處。

表五：以 HA2 蛋白的保留性序列為基礎的廣效型流感疫苗研究

抗原區域	相關的抗體研究及成效	出處
保留性融合胜肽 (fusion peptide)區域	根據此一片段所得到的抗體具備對病毒的高度專一性，可以應用在多種 A 型流感病毒分離株的 HA 蛋白的定量分析上 結合此一區域的抗體可以中和包含 H5N1 禽流感和 1918 年流行的 H1N1 A 型流感在內的各式 HA 子型的流感病毒 辨識 HA2 第 1 到第 9 號胺基酸序列 GLFGAIAGF 的單株抗體 1C9 可以提供小鼠對抗兩種不同子型的 HPAI H5N1 病毒—A/Vietnam/1203/2004 以及 A/Indonesia/TLL013/06 致死劑量攻擊的完整保護力。	30 20 31
HA1/HA2 的 stalk 區域	辨認此一區域的人類單株抗體 CR6261 藉由阻止伴隨者膜融合(membrane fusion)所產生的構形改變，中和病毒感染，並保護小鼠對抗致死劑量的 H5N1 及 H1N1 病毒攻擊。	32,33

表六：以 HA1 蛋白的保留性序列為基礎的廣效型流感疫苗研究

抗原區域	相關的抗體研究及成效	出處
HA1 第 193 至 199 胺基酸序列 QNNPTTYI	此一序列為現有流通的各種 H5N1 分離株所保留，而且可被針對 A/Vietnam/1203/04 H5N1 病毒株的 HA1 蛋白所製的單株抗體所辨識	34
HA1 的 N 端 42-75 胺基酸序列	辨識此一區域的單株抗體 4G6 可以有效地辨識最近發生的亞洲 H5N1 禽流感病毒	35

表七：以 NP 蛋白的保留性序列為基礎的廣效型流感疫苗研究

抗原區域	疫苗形式	免疫成效	出處
NP 蛋白的保留序列	與 tissue plasminogen activator signal sequence 融合成 ptAs/NP 基因 DNA 疫苗	對同源性的 H5N1 (A/Hube/498) 病毒具備有效清除的效果，但是對異源性的 HPAI H5N1 (a/Hunan/211) 病毒僅具部分的保護力	36
NP 蛋白	重組 vaccinia 病毒	A/PR8/34 (H1N1) 病毒株的 NP 蛋白可以誘導特異性的抗體產生，並使得免疫過的小鼠產生對抗低劑量的適應小鼠的異型性 (mouse-adapted heterosubtypic) 病毒株 human A/Aichi2/68 (H3N2) 和 avian A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) 攻毒的防護力。	37
	重組 vesicular stomatitis 病毒	A 表現流感 NP 蛋白的重組 VSV 病毒產生抗 NP 的 CD8 細胞，同時增強小鼠對抗致死劑量攻毒的防護力	38

序列被用來開發成廣效性疫苗外，將 NP 蛋白及其保留性序列進行誘發免疫反應，結果整理如表七所示：

然而，以 NA 和 NP 蛋白為基礎的 DNA 疫苗

比較性研究顯示：相較於以 HA 為基礎的構型，它們僅能又發微弱的中和病毒和 T 細胞反應的能力。因此，對於其他含有 NP 和其他流感病毒蛋白的保留性序列之抗原性區域(epitope)的研究將有助

表八：結合數種保留性序列的廣效型流感疫苗研究

抗原區域	疫苗形式	免疫成效	出處
NA、NP 和 M1 蛋白上 6 個保留性抗原決定區域	與 flagelin 結合的重組蛋白	誘發強烈的體液型及細胞型免疫，提供防護致死劑量的 HAPI H5N1 病毒攻毒試驗的能力。	40
M1 和 NP 蛋白的保留性序列	質體(plasmid)DNA	經免疫過的小鼠分別對同源性的 A/Chicken/ Henan/12/2004 H5N1 病毒產生 95% 以及異源性的 A/PR/8/34 H1N1 產生 80% 的保護力。	41
結合 A/Vietnam/1203/ 2004 (H5N1)的 NA 和 NP 與 A/CK/Indonesia/PA /2003 (H5N1)的 M1 和 M2	以 vaccinia 病毒為骨架的 Wyeth/IL-15/5Flu MVA/IL-15/HA/NA	含 IL-15 基因為佐劑。經免疫的小鼠可產生跨株性的中和抗體以及足夠的細胞型免疫反應，可以抵抗不同的 H5N1 分離株的攻毒試驗。	42

於此類廣效型疫苗的發展[39]。

#### 五. 結合不同病毒蛋白的保留性序列的廣效型流感疫苗

既然這些不同病毒蛋白的保留性區域已經被證實有部分的免疫功能，為了增強綜合性對抗無論季節型或流行性流感的防護效果，將這些元素組合在一起，也是研究發展的方向之一；而整合通常以 DNA 疫苗或者病毒載體(viral vectors)的形式進行[43,44]。主要研究如表八所示。

### 結論及展望

目前以 A 型流感病毒的 M2、HA 及其他結構性蛋白的保留性序列為標的的廣效型疫苗正成為流感疫苗研發的主要方向之一。結合不同病毒蛋白的保留性序列並維持其在病毒顆粒上原有的聚合式抗原決定區域的構形，透過結合適當的佐劑以及免疫途徑的實施，希望能有合適的免疫反應發生，達到跨病毒株的保護效果。

同時也希望能夠透過這種形式的精進，一方面在廣度上，達到對抗各種流感病毒的防護效果，另一方面，也能改變每年因為針對不同型流感生產疫苗，所產生的花費及時間耗損的現狀，使得人類對抗無論是季節型亦或流行型流感的防疫戰爭得到更全面性的進展。

### 參考文獻

1. Cassone A, Rappuoli R: Universal Vaccines: Shifting to one for many. *MBio* 2010;1:1-5.
2. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y: Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 2009;459:931-9.
3. Du L, Zhou Y, Jiang S: Research and development of universal influenza vaccines. *Microbes Infect* 2010;12:280-6.
4. Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, et al: Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 2006;312:404-10.
5. Ito T, Gorman OT, Kawaoka Y, et al: Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J Virol* 1991;65:5491-8.
6. Pinto LH, Lamb RA: The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J Biol Chem* 2006;281:8997-9000.
7. Skorko R, Summers DF, Galarza JM: Galarza, Influenza A virus in vitro transcription: roles of NS1 and NP proteins in regulating RNA synthesis. *Virology* 1991;180:668-77.
8. Ng AK, Zhang H, Tan K, et al: Shaw, Structure of the influenza virus A H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization, and vaccine design. *FASEB J* 2008;22:3638-47.

- 
9. Johansson BE, Brett IC: Changing perspective on immunization against influenza. *Vaccine* 2007;25:3062-5.
  10. Widjaja L, Ilyushina N, Webster RG, et al: Molecular changes associated with adaptation of human influenza A virus in embryonated chicken eggs. *Virology* 2006;350:137-45.
  11. Huleatt JW, Nakaar V, Desai P, et al: Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine* 2008;26:201-14.
  12. Kyriakis CS, De Vleeschauwer A, Barbé F, et al: Safety, immunogenicity and efficacy of poxvirus-based vector vaccines expressing the haemagglutinin gene of a highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in pigs. *Vaccine* 2009;27:2258-64.
  13. Chen MW, Cheng TJ, Huang Y, et al: A consensus-hemagglutinin-based DNA vaccine that protects mice against divergent H5N1 influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:13538-43.
  14. Künzi V, Dornseiff M, Horwath J, et al: Safe vaccination of children with a virosomal adjuvanted influenza vaccine. *Vaccine* 2009;27:1261-5.
  15. Roose K, Fiers W, Saelens X: Pandemic preparedness: toward a universal influenza vaccine. *Drug News Perspect* 2009;22:80-92.
  16. Fiers W, De Filette M, Birkett A, et al: A 'universal' human influenza A vaccine. *Virus Res* 2004;103: 173-6.
  17. Seib KL, Dougan G, Rappuoli R: The key role of genomics in modern vaccine and drug design for emerging infectious diseases. *PLoS Genet.* 2010;5 (e1000612.doi:1371/journal.pgen). 1000612.
  18. Fiers W, De Filette M, El Bakkouri K, et al: M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine* 2009;27:6280-3.
  19. Schotsaert M, De Filette M, Fiers W, et al: Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments. *Expert Rev Vaccines* 2009;8:499-508.
  20. Sui J, 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;16:265-73.
  21. Tompkins SM, Zhao ZS, Lo CY, et al: Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1. *Emerg Infect Dis* 2007;13:426-35.
  22. Wang Y, Zhou L, Shi H, et al: Monoclonal antibody recognizing SLLTEVET epitope of M2 protein potently inhibited the replication of influenza A viruses in MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;385:118-22.
  23. Wang R, Song A, Levin J, et al: Therapeutic potential of a fully human monoclonal antibody against influenza A virus M2 protein. *Antiviral Res* 2008;80:168-77.
  24. Fu TM, Freed DC, Horton MS, et al: Characterizations of four monoclonal antibodies against M2 protein ectodomain of influenza A virus. *Virology* 2009;385:218-26.
  25. De Filette M, Martens W, Roose K, et al: Saelens, An influenza A vaccine based on tetrameric ectodomain of matrix protein 2. *J Biol Chem* 2008;283:11382-7.
  26. Denis J, Acosta-Ramirez E, Zhao Y, et al: Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform. *Vaccine* 2008;26:3395-403.
  27. Mozdzanowska K, Feng J, Eid M, et al: Gerhard, Induction of influenza type A virus-specific resistance by immunization of mice with a synthetic multiple antigenic peptide vaccine that contains ectodomains of matrix protein 2. *Vaccine* 2003;21:2616-26.

- 
28. De Filette M, Martens W, Smet A, et al: Universal influenza A M2e-HBc vaccine protects against disease even in the presence of pre-existing anti-HBc antibodies. *Vaccine* 2008;26:6503-7.
  29. Fu TM, Grimm KM, Citron MP, et al: Comparative immunogenicity evaluations of influenza A virus M2 peptide as recombinant virus like particle or conjugate vaccines in mice and monkeys. *Vaccine* 2009;27:1440-7.
  30. Chun S, Li C, Van Domselaar G, et al: Universal antibodies and their applications to the quantitative determination of virtually all subtypes of the influenza A viral hemagglutinins. *Vaccine* 2008;26:6068-76.
  31. Prabhu N, Prabakaran 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;83:2553-62.
  32. Ekiert DC, Bhabha G, Elsliger MA, et al: Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science* 2009; 324:246-51.
  33. Throsby M, van den Brink E, Jongeneelen M, et al: Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgMt memory B cells. *PLoS One* 2008;3: e3942.
  34. Wang SF, Chen KH, Thitithanyanont A, et al: Generating and characterizing monoclonal and polyclonal antibodies against avian H5N1 hemagglutinin protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;382:691-6.
  35. Du A, Daidoji T, Koma T, et al: Detection of circulating Asian H5N1 viruses by a newly established monoclonal antibody. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;378:197-202.
  36. Luo M, Tao P, Li J, et al: 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. *J Virol Methods* 2008;154:121-7.
  37. Altstein AD, Gitelman AK, Smirnov YA, et al: Immunization with influenza A NP expressing vaccinia virus recombinant protects mice against experimental infection with human and avian influenza viruses. *Arch Virol* 2006;151:921-31.
  38. Barefoot BE, Sample CJ, Ramsburg EA: Recombinant vesicular stomatitis virus expressing influenza nucleoprotein induces CD8 T-cell responses that enhance antibody-mediated protection after lethal challenge with influenza virus. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:488-98.
  39. Patel A, Tran K, Gray M, et al: Evaluation of conserved and variable influenza antigens for immunization against different isolates of H5N1 viruses. *Vaccine* 2009;27:3083-89.
  40. Adar Y, Singer Y, Levi R, et al: A universal epitope-based influenza vaccine and its efficacy against H5N1. *Vaccine* 2009;27:2099-107.
  41. 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;38:30-8.
  42. Poon LL, Leung YH, Nicholls JM: Vaccinia virus-based multivalent H5N1 avian influenza vaccines adjuvanted with IL-15 confer sterile cross-clade protection in mice. *J Immunol* 2009;182:3063-71.
  43. Jimenez GS, Planchon R, Wei Q, et al: Vaxfectin-formulated influenza DNA vaccines encoding NP and M2 viral proteins protect mice against lethal viral challenge. *Hum Vaccin* 2007;3:157-64.
  44. Lalor PA, Webby RJ, Morrow J, et al: Plasmid DNA-based vaccines protect mice and ferrets against lethal challenge with A/Vietnam/1203/04 (H5N1) influenza virus. *J Infect Dis* 2008;197:1643-52.



---

# Developing Flu Vaccine: Universal Vaccine

Jin-Yi Cheng, Suh-Chin Wu

**Abstract:** The continuous threat of influenza is due to imperfect vaccines and widespread resistance to existing antivirals. This problem is particularly acute during a pandemic. It determines the urgency and necessity to develop safe and effective vaccines against divergent influenza virus. This article describes the concept and development of universal influenza vaccine based on the relatively conserved sequences of M2e, HA and other proteins of influenza virus. Several research results were summarized briefly to demonstrate the possibility and potential of such universal vaccines.

**Key Words:** influenza virus, epitope, pangenomics, universal vaccine

(Full text in Chinese: Formosan J Med 2011;15:)

---

Institute of Biomedical Biotechnology, Central Taiwan University of Science and Technology, Taichung, Taiwan

Address correspondence to: Jin-Yi Cheng, No. 666, Po-Tze Rd., Takun, Taichung, Taiwan. E-mail: jyzheng@ctust.edu.tw