

# Szczepionki przeciw grypie – spojrzenie w przyszłość

Linda C. Lambert, PhD<sup>1</sup>

Anthony S. Fauci, MD<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Division of Microbiology and Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

<sup>2</sup> Office of the Director, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

Influenza Vaccines for the Future

N Engl J Med 2010;363:2036-44

Tłum. dr n. med. Tadeusz Przybyłowski

**K**ażdego roku podczas sezonowych epidemii grypy na całym świecie odnotowuje się wiele poważnych zachorowań i zgonów. W Stanach Zjednoczonych co roku odnotowuje się od 25 do 50 mln przypadków zachorowań na grypę prowadzących do około 225 tys. hospitalizacji. W ostatnich trzech dekadach szacunkowa liczba zgonów z powodu grypy w tym kraju wahała się od 3349 do 48 614 rocznie. Do większości z nich (>90%) dochodziło w starszych grupach wiekowych, szczególnie u osób z przewlekłymi chorobami.<sup>1-3</sup> Eksperti WHO, ekstrapolując te dane na pozostałe kraje, liczbę przypadków grypy na całym świecie rocznie oceniają na około 1 mld (w tym 3 do 5 mln to przypadki o ciężkim przebiegu), a liczbę zgonów na 300-500 tys.<sup>1</sup> Na przestrzeni dziejów dochodziło już do pandemii grypy, z różną liczbą poważnych zachorowań i zgonów; najbardziej znana jest ta z lat 1918-1919, która, jak się szacuje, pochłonęła 50-100 mln ofiar.<sup>4</sup>

Wirus grypy, który po raz pierwszy został wyizolowany od człowieka w 1933 r.,<sup>5</sup> zawiera jednoniciowe RNA kodujące w 8 segmentach informacje o 11 białkach (ryc. 1). Znane są trzy typy wirusa grypy: A, B i C; za sezonowe epidemie odpowiedzialne są pierwsze dwa. Podstawową cechą wirusa grypy są błędy polimerazy, co prowadzi do kolejnych mutacji hemaglutyniny A (HA), oraz (w mniejszym stopniu) neuraminidazy (NA) – dwóch podstawowych glikoprotein powierzchniowych wirusa. To przesunięcie antygenowe białka HA jest odpowiedzialne za podatność ludzkiego organizmu na zakażenie oraz konieczność częstego uaktualniania składu szczepionki przeciwko grypie. Podstawową rolę w rozwoju odporności po zakażeniu wirusem grypy odgrywiają przeciwciała swoiste dla HA, znajdujące się w surowicy oraz na powierzchni błon śluzowych. Stężenie przeciwciał skierowanych przeciwko NA, innym konserwatywnym białkom wirusa grypy oraz odpowiedź ze strony limfocytów T korelują z mniejszym nasileniem przebiegu choroby.

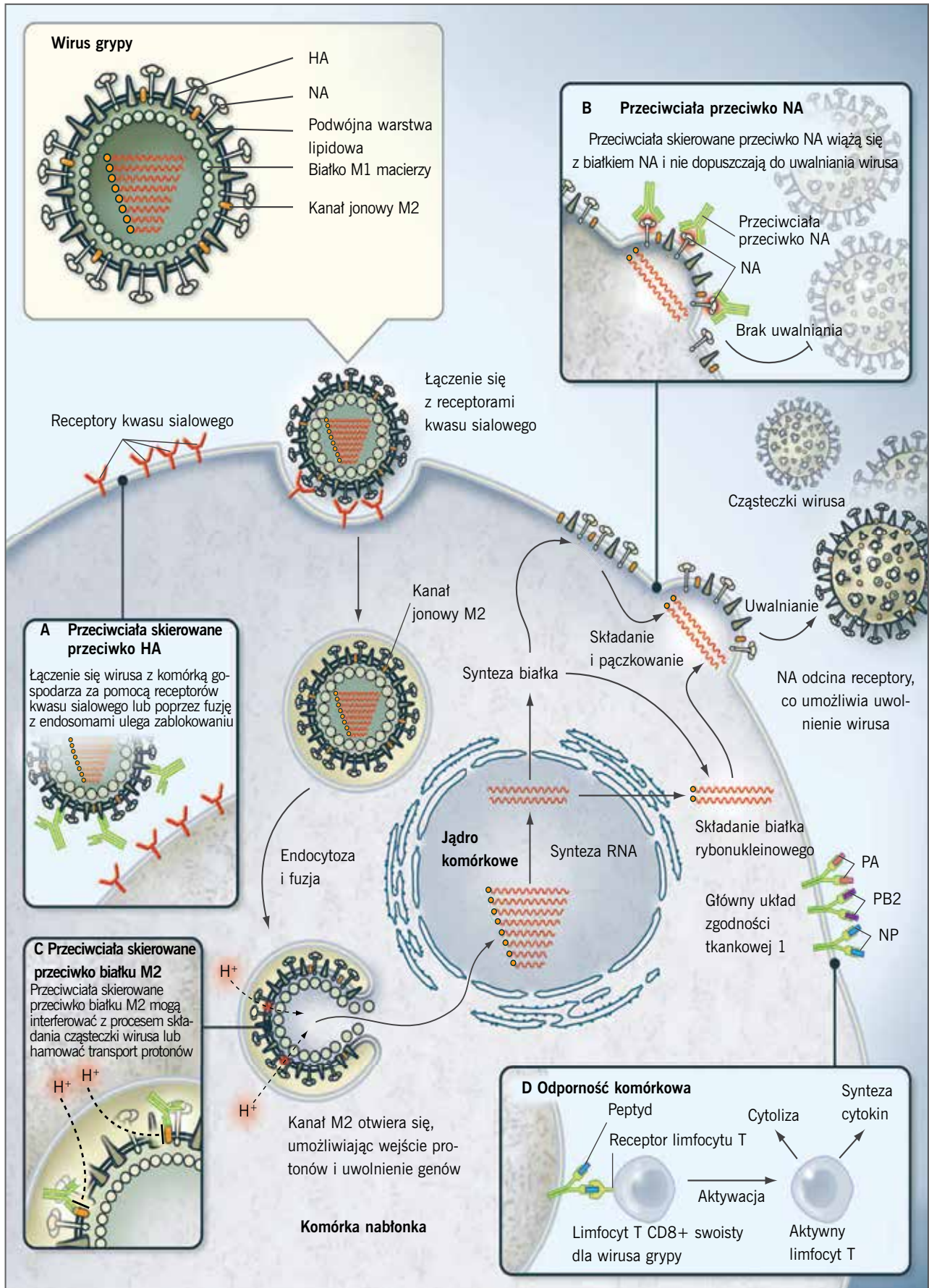
Do pojawienia się nowego szczepu wirusa, którym człowiek może się zarażić, może dojść w wyniku bezpośredniej, międzygatunkowej transmisji materiału genetycznego wirusa lub poprzez molekularną wymianę informacji pomiędzy typami wirusa, które już zarażają. Ponieważ materiał genetyczny wirusa składa się z segmentów, koinfekcja jednego gospodarza co najmniej dwoma różnymi szczepami może doprowadzić do reasortacji genowej (lub ta-

rowania). Skok antygenowy wirusa może doprowadzić do pandemii, jeżeli potomny wirus będzie zawierał białko HA, przeciwko któremu ludzki organizm nie wytworzył wcześniej odporności, posiadał komplet pozostałych genów wewnętrznych zdolnych do replikacji i miał zdolność do łatwego przenoszenia się z człowieka na człowieka; takie warunki spełniał szczep 2009 H1N1.

## Szczepionki przeciwko grypie

Szczepienia to podstawowy sposób zapobiegania grypie i kontroli zachorowań.<sup>8,9</sup> Chociaż w prewencji grypy oraz jej powikłań skuteczne są zarówno szczepionki inaktywowane, jak i żywe, atenuowane, poziom ochrony jest zróżnicowany, zależy od stopnia dopasowania antygenowego między wirusem w szczepionce a tym odpowiedzialnym za zakażenia w danym sezonie oraz wieku i ogólnego stanu zdrowia osoby szczepionej.<sup>10</sup> Konieczne jest opracowanie bardziej skutecznych sposobów szczepień, przede wszystkim dla osób z osłabioną odpowiedzią układu immunologicznego na szczepionki, m.in. osób starszych oraz z przewlekłymi chorobami. Krokiem w tym kierunku jest zarejestrowana niedawno inaktywowana szczepionka przeciwko grypie zawierająca dużą dawkę antygeny.<sup>11</sup>

Sezonowe szczepionki przeciwko grypie są trójwalentne. Każda dawka zawiera trzy wirusy (lub białka HA) odpowiadające szczepom wirusa A H3N2, wirusa A H1N1 oraz wirusa typu B, które będą z największym prawdopodobieństwem odpowiedzialne za zakażenia w nadchodzącym sezonie. Szczepy do szczepionki na nadchodzący sezon dla mieszkańców półkuli północnej wybiera się zazwyczaj w lutym. Produkcja szczepionek inaktywowanych rozpoczyna się od opracowania wzorcowego szczepu – hybrydowych postaci wirusa zawierających geny HA oraz NA pochodzące z wariantów z przesunięciem antygenowym, połączone z genami szczepów laboratoryjnych zaadaptowanych do wzrostu w zarodkach kurzych. Cały proces może zająć kilka tygodni lub dłużej.<sup>12,13</sup> Zdarza się, że opracowane w ten sposób szczepy słabo namnażają się w zarodkach kurzych lub wytwarzają białko HA w zbyt małych ilościach i wymagają pasażowań usprawniających proces namnażania. Metody plazmidowe, wykorzystujące nowoczesne techniki odwrotnej genetyki (*reverse-genetics*), pozwalają na opracowanie szczepów wzorcowych w krótszym czasie, zapewnia-



### ❑ Rycina 1. Struktura i cykl replikacyjny wirusa grypy typu A oraz dobrze poznane elementy adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej

Ośmiu segmentów genowych koduje 11 białek wirusa, między innymi hemaglutyninę (HA) oraz neuraminidazę (NA), które stanowią większość z poznanych determinant antygenowych wirusa. Właściwości antygenowe ma również fragment białka M2 macierzy (M2 – *matrix* 2) znajdujący się poza otoczką wirusa. Adaptacyjną odpowiedź immunologiczną przedstawiono na panelach A-D. Na panelu A widoczna jest próba połączenia białka HA wirusa z receptorem komórki gospodarza. Przeciwciała skierowane przeciwko HA blokują połączenie się wirusa z komórką gospodarza lub fuzję wirusa z błoną komórkową komórki gospodarza. Istnieje korelacja pomiędzy stężeniem przeciwciał skierowanych przeciwko HA a działaniem ochronnym szczepionki przed zakażeniem. Na panelu B widać, że przeciwciała skierowane przeciwko NA nie zabezpieczają przed zakażeniem, ale ograniczają uwalnianie wirusa z zakażonych komórek. Wykazano istnienie korelacji pomiędzy występowaniem przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi NA a zmniejszeniem ciężkości przebiegu choroby. Na panelu C pokazano, że przeciwciała skierowane przeciwko zewnętrznej domenie epitopu białka M2 charakteryzującego się znacznym stopniem konserwatywności interferują z tworzeniem wirusów potomnych lub hamują transport protonów. Ten mechanizm charakteryzuje się dużą aktywnością krzyżową pomiędzy różnymi podtypami wirusa. Na panelu D widać, że odpowiedź ze strony limfocytów T CD8+ skierowana przeciwko konserwatywnym składnikom wirusa grypy koreluje z nasilonym usuwaniem komórek, w których obecny jest wirus. Nie ustalono jednak, na ile ten mechanizm wpływa na zmniejszenie chorobowości.

NP – nukleoproteid, PA – kwaśne białko polimerazowe, PB2 – zasadowe białko polimerazowe 2. Zaadaptowano z: Kaiser<sup>6</sup> oraz Subbarao i wsp.<sup>7</sup>

ją również lepszy wzrost w hodowli.<sup>14,15</sup> W klasycznym systemie produkcji w okresie od lutego do późnego lata prowadzi się namnażanie wirusów przeznaczonych na szczepionki z wykorzystaniem setek milionów zarodków kurzych, następnie wirusy są inaktywowane lub oczyszczane. Później uzyskany materiał jest dzielony na szczepionki, przygotowywany do transportu i wprowadzany na rynek na samym początku jesieni, przed szczytem zachorowań na grypę w danym sezonie, który najczęściej następuje po grudniu.

### Trudności z opracowaniem szczepionki przeciwko szczepowi H1N1

W chwili identyfikacji wirusa 2009 H1N1 na początku wiosny 2009 r. prace nad szczepionką na sezon 2009-2010 były już mocno zaawansowane.<sup>16</sup> Ponieważ nie było pewnych danych co do możliwości wybuchu poważnej epidemii, podjęto decyzję o kontynuowaniu prac nad klasyczną szczepionką sezonową i jednocześnie rozpoczęciu działań w celu opracowania szczepionki skierowanej przeciwko nowemu szczepowi. W miesiącach letnich obecność i dominacja wirusa 2009 H1N1 była już bardzo wyraźna, w sierpniu oraz wrześniu liczba wywołanych przez niego zachorowań istotnie się zwiększyła, co skróciło czas na opracowanie nowej szczepionki o kilka miesięcy. Istotnym problemem dla producentów okazało się znacznie mniejsze niż oczekiwano wytwarzanie białka HA, istotnie ograniczające liczbę dostępnych szczepionek. Ustalono, że jednym z celów działań w najbliższej przyszłości powinno być wprowadzenie metod usprawniających te etapy produkcji, które w największym stopniu spowalniają syntezę inaktywowanych szczepionek, m.in. szerszego zastosowania nowych technologii, takich jak odwrotna genetyka, ułatwiających dostosowanie szczepów wzorcowych do namnażania się w kurzych zarodkach, oraz innych technik przyspieszających ocenę mocy i sterylności produktu, co powinno istotnie skrócić czas od opracowania szczepu do wytworzenia szczepionki.<sup>17</sup>

Żywy, atenuowany szczep wirusa 2009 H1N1 osiągał bardzo wysokie miano w hodowli zarodków kurzych, dzięki temu szczepionka przeciwko niemu ukazała się na rynku jako pierwsza. Wydaje się jednak, że zanim żywe, atenuowane szczepionki znajdą szersze zastosowanie, w przypadku przyszłych pandemii

konieczne jest rozwiązanie kilku problemów, związanych m.in. z dopuszczeniem szczepionki tego typu do zastosowania innych grupach wiekowych niż te, które obejmuje aktualna rejestracja (tj. tylko osoby zdrowe w wieku 2-49 lat) oraz opracowaniem innych postaci szczepionki, niewymagających stosowania specjalnego dozownika donosowego (np. szczepionka w postaci kropli). Wydaje się także, iż dopuszczenie do użytku wielodawkowych ampułek niezawierających konserwantów mogłoby w przyszłości zwiększyć dostępność oraz wykorzystanie tych preparatów.<sup>18</sup>

### Nowe technologie produkcji szczepionek

Niedoskonałość dostępnych obecnie szczepionek, złożoność oraz czasochłonność technologii produkcyjnej skłaniają do poszukiwania bardziej skutecznych szczepionek oraz szybszych, wydajniejszych i bardziej niezawodnych systemów ich produkcji. Nowoczesne linie produkcyjne powinny również umożliwiać szybkie zwiększenie produkcji w przypadku pandemii. Obecnie podejmuje się wiele kroków, aby sprostać tym wymaganiom. Najistotniejsze zmiany w systemie produkcji szczepionki oraz stosowane aktualnie technologie przedstawiono w tabeli 1.

Aby nowa szczepionka została zarejestrowana, producent musi wykazać, że jest skuteczna i bezpieczna, preparat musi pobudzać syntezę przeciwciał oraz zabezpieczać przed rozwojem grypy. W dodatkowych badaniach skuteczność może być oceniana za pomocą innych mniej klasycznych odpowiedzi immunologicznych (np. synteza przeciwciał przeciwko antygenom NA lub M2 lub odpowiedź komórkowa) i porównywana ze skutecznością preparatów już zatwierdzonych.<sup>19</sup>

### Aktualne technologie

#### Techniki hodowli komórkowych

Stosowana obecnie technologia wykorzystująca zarodki kurze ma kilka słabych stron: dostępność zarodków może się bardzo istotnie zmniejszyć w przypadku wybuchu odzwierzęcej epidemii ptasiej grypy lub innej choroby atakującej hodowlę kur, nie ma też możliwości szybkiego zwiększenia produkcji szczepionki. W celu lepszego zabezpieczenia przed grypą sezonową oraz ewentualnym wybuchem kolejnej pandemii zainwestowano wiele środków w opracowanie techniki hodowli linii komórkowych ssaków

Tabela 1. Aktualnie stosowane oraz nowe sposoby produkcji szczepionek przeciwko grypie

Rodzaj szczepionki	Zaawansowanie prac			
	Badania przedkliniczne	Badania kliniczne I i II fazy	Badania kliniczne III fazy	Rejestracja lub zgoda na rejestrację
Szczepionki inaktywowane				
Namnażane w zarodkach kurzych	Tak	Tak	Tak	Tak
Namnażane w hodowli komórkowej	Tak	Tak	Tak	W Europie – tak, w Stanach Zjednoczonych – nie
Zawierające adiuwant	Tak	Tak	Tak	W Europie – tak, w Stanach Zjednoczonych – nie
Żywe szczepionki atenuowane				
Namnażane w zarodkach kurzych	Tak	Tak	Tak	Tak
Namnażane w hodowli komórkowej	Tak	Tak	Nie	Nie
Następne generacje szczepionek				
Białka rekombinowane	Tak	Tak	Tak	Nie
Cząsteczki podobne do wirusa	Tak	Tak	Nie	Nie
Wektory wirusowe	Tak	Tak	Nie	Nie
Szczepionki oparte na DNA	Tak	Tak	Nie	Nie
Szczepionki uniwersalne	Tak	Tak	Nie	Nie

jako alternatywnego substratu do produkcji szczepionki przeciwko grypie. Celem tych działań jest zarejestrowanie w najbliższej przyszłości takiego schematu postępowania na terenie Stanów Zjednoczonych.<sup>20</sup> Mimo że zmiana technologii z systemu opartego na zarodkach kurzych na wykorzystujący linie komórkowe mogłoby mieć wiele zalet (umożliwia pracę bezpośrednio z naturalnymi szczepami wirusa, pozwala uniknąć konieczności wprowadzania mutacji białek HA ułatwiających namnażanie wirusa w zarodkach kurzych, daje możliwość znacznego zwiększenia produkcji w przypadku wybuchu pandemii, a także większej kontroli nad linią produkcyjną poprzez zastosowanie zamkniętego procesu fermentacyjnego), nadal pozostają pewne ograniczenia.<sup>21,22</sup>

W przypadku szczepionek inaktywowanych konieczne jest wyprodukowanie dużej liczby kopii wirusa dostarczających odpowiedniej ilości białka HA. Dodatkowo wirusy uzyskane z hodowli komórkowych wymagają podobnej obróbki jak wirusy wyhodowane w zarodkach kurzych, konieczne jest zatem sprawdzenie, czy technika linii komórkowych istotnie skróci czas potrzebny na wyprodukowanie nowej szczepionki inaktywowanej. W Stanach Zjednoczonych prace nad stworzeniem żywej szczepionki atenuowanej wyprodukowanej w hodowli linii komórkowej są na eta-

pie późnych badań przedklinicznych. Ponieważ wirusy nie są inaktywowane, lecz tylko w niewielkim stopniu oczyszczone, przed rozpoczęciem badań klinicznych konieczna jest analiza możliwości występowania w szczepionce resztkowego DNA pochodzącego z komórek substratowych.<sup>23</sup>

#### Adiuwanty

Adiuwanty wzmacniają odpowiedź układu immunologicznego na antygen zarówno poprzez usprawnienie transportu i prezentacji antygeny, jak i poprzez nasilenie rekrutacji komórek stanu zapalnego oraz komórek immunokompetentnych do miejsca depozycji antygeny lub poprzez bezpośrednią aktywację wrodzonej odpowiedzi immunologicznej bądź też w wyniku współdziałania obydwu mechanizmów. W Europie dopuszczono do stosowania wiele szczepionek przeciwko grypie sezonowej zawierających antygen HA w połączeniu z takimi adiuwantami, jak fosfolipidy lub wodne emulsje olejowe.<sup>24,25</sup> W 2009 r. szczepionki przeciwko szczepowi H1N1 zawierające adiuwanty wodno-olejowe były wykorzystywane w Europie oraz w wielu innych krajach.<sup>26-28</sup> Pomimo ich akceptacji i powszechnego używania w wielu krajach oraz dowiedzionej skuteczności pojawiły się zastrzeżenia co do ich stosowa-



nia w Stanach Zjednoczonych. Wątpliwości pojawiły się na tle zastrzeżeń pewnych grup społeczeństwa co do stosowania szczepionek w ogóle. Co prawda dobrze się złożyło, że nie było konieczności wykorzystania adiuwantów w celu wzmocnienia odpowiedzi na szczepionkę przeciwko szczepowi 2009 H1N1, ale wyniki badań klinicznych wskazują, że adiuwanty w postaci wodnych emulsji olejowych są konieczne do stymulacji organizmu do syntezy dużej liczby przeciwciał przeciwko szczepom wirusa zawierającym nowe typy HA (np. szczepy H5N1), i mogą mieć niezmiernie duże znaczenie dla przyszłych programów szczepień.<sup>29-32</sup> Duże nadzieje wiąże się z adiuwantami nowej generacji, takimi jak oczyszczone fragmenty białkowe zewnętrznej ściany bakterii, receptory Toll-podobne oraz wiele agonistów receptorów Toll-podobnych (węglowodany pochodzenia bakteryjnego, lipidy, białka, kwasy nukleinowe). Kilka z nich znajduje się na etapie wczesnych badań klinicznych.<sup>33-37</sup>

### Nowe żywe szczepionki atenuowane

Podejmuje się również działania mające na celu opracowanie żywych szczepionek atenuowanych wykorzystujących białko NS1 – niestrukturalne, wielofunkcyjne białko biorące udział w replikacji wirusa oraz hamowaniu wrodzonej odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Wyniki badań przedklinicznych wskazują, że zakażenie wirusami ze zmienionym lub z usuniętym białkiem NS1 blokuje replikację wirusa i stymuluje zarówno humoralną, jak i komórkową odpowiedź immunologiczną.<sup>38,39</sup> Z wczesnych badań klinicznych wiadomo, że donosowa szczepionka zawierająca NS1 jest dobrze tolerowana i wywołuje syntezę neutralizujących przeciwciał skierowanych przeciwko HA.<sup>40</sup>

### Nowe generacje szczepionek przeciwko grypie

Mimo że w najbliższych latach arsenał szczepionek przeciwko grypie prawdopodobnie poszerzy się o szczepionki produkowane na bazie hodowli komórkowych oraz szczepionki z dodatkiem adiuwantów, techniki rekombinacji DNA dają nowe możliwości opracowania nowego preparatu, gdy tylko poznana zostanie sekwencja genetyczna białka HA wirusa. Wylimitowałoby to konieczność bezpośredniej pracy z patogennym wirusem oraz etap produkcji związany z przystosowaniem szczepu wirusa do namnażania się w zarodkach kurzych lub hodowli komórkowej (ryc. 2). Te znajdujące się na etapie wczesnych prac rozwojowych techniki mogłyby znacznie skrócić czas trwania cyklu produkcyjnego szczepionki.

### Białka rekombinowane

W Stanach Zjednoczonych trwają zaawansowane prace nad klinicznym zastosowaniem rekombinowanej trójwartentnej szczepionki przeciwko grypie opracowanej na bazie HA (ryc. 2A). Zaraz po wybraniu szczepu wirusa, który ma zostać uwzględniony w szczepionce, korzystając z wektorów bakulowirusowych, klonuje się geny kodujące HA. Komórki owadów zainfekowane tymi wirusami wytwarzają białka HA, z których po oczyszczeniu produkowana jest trójwartentna szczepionka.<sup>41</sup> Profil bezpieczeństwa, immunogenność oraz skuteczność tej szczepionki zostały już

potwierdzone, a do Food and Drug Administration złożono podanie o rejestrację jej w ochronie przed grypą sezonową u osób zdrowych w wieku  $\geq 18$  lat.<sup>42</sup>

### Cząsteczki wirusopodobne

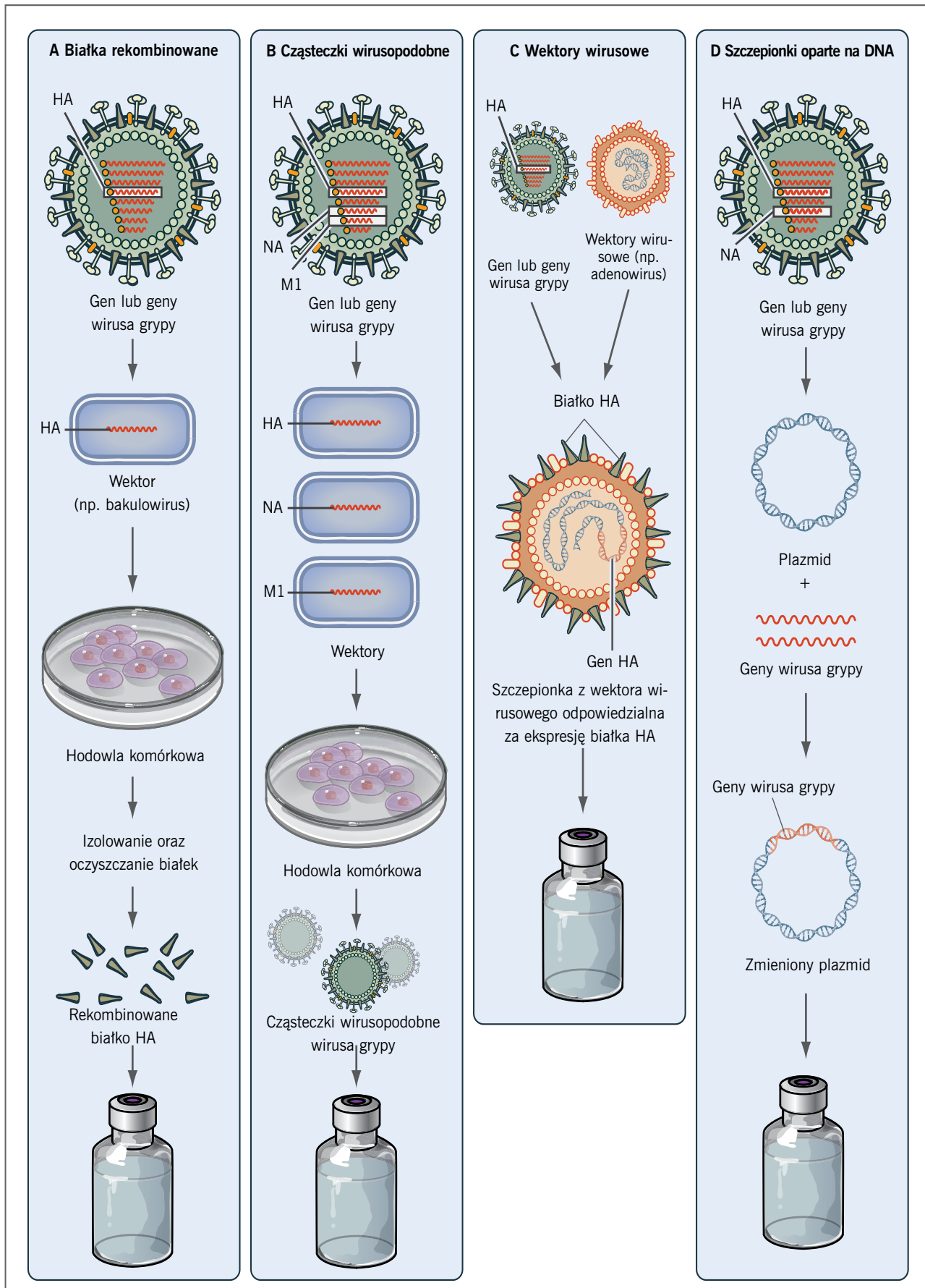
Inną obiecującą koncepcją jest zastosowanie w produkcji szczepionki przeciw grypie cząsteczek wirusopodobnych nieposiadających zdolności do wywoływania zakażenia (ryc. 2B). Do zakażenia komórek w hodowli wykorzystuje się rekombinowane wektory wirusowe zdolne do ekspresji HA, NA oraz białka macierzy (M1) – białka strukturalnego znajdującego się wewnątrz otoczki wirusa, które odgrywa istotną rolę w składaniu się i pączkowaniu potomnych cząsteczek wirusa. Wytworzone białka wirusa samoczynnie łączą się ze sobą w pobliżu błony plazmatycznej, a następnie wypączkują z zarażonej komórki i tworzą cząsteczki przypominające strukturą cząsteczkę wirusa występującą w naturalnych warunkach. Do pączkujących cząsteczek mogą zostać dołączone również inne białka wirusa grypy lub inne cząsteczki immunostymulujące. Na etapie badań przedklinicznych na modelach zwierzęcych zastosowanie wielu cząsteczek wirusopodobnych okazało się obiecujące, a ocena co najmniej jednej z nich znalazła się na etapie badań klinicznych II fazy.<sup>43,44</sup>

### Wektory wirusowe

W celu dostarczenia białek wirusa do układu immunologicznego podejmuje się próby wykorzystania wielu wirusów nieposiadających zdolności do replikacji lub posiadających taką zdolność, ale niewywołujących choroby (ryc. 2C). Geny kodujące białko HA wirusa grypy sezonowej, wirusa H5N1 lub obydwu zostały sklonowane do tak zwanych komórek towarzyszących (*carrier virus*), którymi mogą być wirusy krowianki (*Vaccinia virus*), alfawirusy, adenowirusy, wirus choroby Newcastle, bakulowirusy oraz wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej. Wykazano, że u zwierząt laboratoryjnych zaszczepionych tymi wektorami wirusowymi pojawiają się cechy odpowiedzi komórkowej oraz humoralnej skierowanej przeciwko wirusowi znajdującemu się w szczepionce oraz wirusom powstałym w wyniku przesunięcia antygenowego.<sup>45-50</sup> Należy dodać, że zakończyła się już część wczesnych badań klinicznych oceniających bezpieczeństwo oraz immunogenność tych szczepionek podawanych donosowo lub doustnie, inne jeszcze trwają, a ich wyniki są zachęcające.<sup>51-53</sup>

### Szczepionki wykorzystujące DNA

Badania nad szczepionkami przeciwko grypie zawierającymi sekwencje DNA trwają od ponad 20 lat. W badaniach na zwierzętach wykazano, że domięśniowe wstrzyknięcie DNA kodującego białko HA lub NA, oddzielnie lub w połączeniu z wewnętrznymi segmentami genowymi, wyzwała odpowiedź ochronną przed wirusami grypy z przesunięciem genowym (ryc. 2D).<sup>54,55</sup> Choć wyniki zastosowania szczepionek DNA u zwierząt okazały się bardzo obiecujące, to rezultaty badań klinicznych nie są aż tak zachęcające.<sup>56-58</sup> W najbliższej przyszłości okaże się, czy ta droga rozwoju i badań doprowadzi ostatecznie do opracowania szczepionki do komercyjnego zastosowania.



## ❑ Rycina 2. Nowe sposoby produkcji szczepionki przeciwko grypie

Na rycinie przedstawiono kolejne etapy produkcji szczepionek przeciwko grypie z wykorzystaniem rekombinowanych białek (A), cząsteczek wirusopodobnych (B), wektorów wirusowych (C) oraz metod opartych na DNA (D). Po ustaleniu sekwencji genomu wirusa grypie technologia rekombinacji DNA umożliwia szybką produkcję szczepionek przy wykorzystaniu różnych nowych metod. Panel A: gen kodujący HA klonowany jest do wektora, dzięki czemu białko podlega najpierw ekspresji w zakażonej komórce, a następnie jest oczyszczane. Panel B: jednoczesna infekcja komórek wektorami zawierającymi geny dla HA, NA oraz M1 prowadzi do syntezy samoorganizujących się cząsteczek wirusopodobnych, posiadających na swojej powierzchni białka HA oraz NA, ale nieposiadających genomu wirusa. Panel C: białko HA ulega ekspresji na powierzchni wirusa transportowego, którego zadaniem jest prezentacja białka HA układowi immunologicznemu, bez możliwości wywołania choroby. Panel D: szczepionka DNA zawiera plazmid, w którym umieszczony został co najmniej jeden gen wirusa grypie. HA – hemaglutynina, M1 – białko 1 macierzy, NA – neuraminidaza

## Szczepionki uniwersalne

Idealna szczepionka przeciwko grypie powinna być bezpieczna, wzbudzać odpowiedź humoralną i komórkową w stopniu porównywalnym do wywołanej przez naturalne zakażenie, zapewniać długotrwałą i krzyżową ochronę przed innymi szczepami oraz być możliwa do szybkiego wyprodukowania w dużej ilości i w dobrze kontrolowanych warunkach. Potencjalnym celem badań przy tworzeniu uniwersalnej szczepionki lub szczepionki zawierającej powszechny epitop jest wysoce konserwatywna zewnętrzna domena białka 2 macierzy wirusa grypie (M2) oraz konserwatywne epitopy białek NP, białka 1 macierzy (M1) oraz białek HA.<sup>59-61</sup> Wyniki badań przedklinicznych wskazują, że te kandydujące szczepionki silnie stymulują syntezę przeciwciał reagujących w sposób krzyżowy. Reakcję ochronną obserwowano zarówno po podaniu samej szczepionki, jak i w połączeniu z adiuwantem lub białkiem transportowym, a wiele z tych szczepionek poddawanych jest aktualnie badaniom klinicznym.<sup>61-64</sup> Optymistyczne spojrzenie na możliwość opracowania uniwersalnej szczepionki wynika po części z rezultatów najnowszych badań na modelach zwierzęcych. Po zastosowaniu dwuetapowego schematu szczepienia składającego się z dawki przygotowującej szczepionki DNA zawierającej informacje o HA, po której podawano drugą dawkę lub szczepionkę wzmacniającą inaktywowaną, atenuowaną lub szczepionkę zawierającą wektor z adenowirusa, obserwowano syntezę przeciwciał o szerokim i krzyżowym działaniu neutralizującym.<sup>65,66</sup> Wydaje się jednak, że opracowanie prawdziwie uniwersalnej szczepionki, zapewniającej ochronę przeciwko każdemu szczepowi wirusa grypie utrzymującą się przez całe życie po jednokrotnym lub kilkukrotnym podaniu, może okazać się niemożliwe, ale niektóre aspekty tej koncepcji warte są rozważenia. Na przykład zagadnieniem wartym dalszych badań jest strategia postępowania oparta na okresowych szczepieniach, stosowanych co kilka lat, szczepionką zawierającą kilka immunogennych i wspólnych epitopów, która powinna wzbudzać pełną lub częściową odporność

zarówno przeciwko szczepom zmieniającym swoją antygenowość, jak i nowym szczepom zdolnym do wywołania pandemii.

## Podsumowanie

Mimo że w mijającej dekadzie byliśmy świadkami istotnego postępu w dziedzinie szczepień przeciwko grypie, nadal jest na tym polu wiele do zrobienia. Co prawda krokiem we właściwym kierunku wydaje się zastąpienie zarodków kurzych hodowlami linii komórkowych oraz dodanie adiuwantów w celu wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej, największe szanse na zrewolucjonizowanie rynku szczepień przeciwko grypie mają jednak nowoczesne technologie produkcyjne. Należy się spodziewać, że w najbliższej dekadzie pojawią się możliwości istotnego skrócenia czasu produkcji szczepionek, zwiększy się istotnie ich działanie ochronne (szczególnie w grupach najwyższego ryzyka) i ostatecznie zniknie problem niedopasowania pomiędzy szczepem zastosowanym w szczepionce a wirusem odpowiedzialnym za zachorowania w danym sezonie. Aby móc w pełni skorzystać z postępu, jaki się dokona w związku z opracowaniem nowych szczepionek, konieczne będą jasne zasady rejestracji nowych preparatów do powszechnego użytku oraz odpowiednio rozbudowana i sprawna infrastruktura zapewniająca przygotowanie szczepionki na czas i właściwą jej dystrybucję.

## Oświadczenie

Nie zgłoszono konfliktu interesów w związku z artykułem. Druki oświadczeń dostarczone przez autorów znajdują się wraz z pełną wersją artykułu na stronie NEJM.org. Autorzy składają podziękowania Carole Heilman oraz Gregory'emu Folkersowi za krytyczną recenzję artykułu oraz Rachelle Salomon i Gregory'emu Folkersowi za pomoc w jego przygotowaniu.

Adres do korespondencji: Dr Linda C. Lambert, Division of Microbiology and Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 6610 Rockledge Dr., Bethesda, MD 20892, USA. E-mail: lclambert@mail.nih.gov.

From The New England Journal of Medicine 2010;363:2036-44. Translated and reprinted in its entirety by permission of the Massachusetts Medical Society. Copyright 2010 © Massachusetts Medical Society. All Rights Reserved.

## Piśmiennictwo:

1. Girard MP, Cherian T, Pervikov Y, et al. A review of vaccine research and development: human acute respiratory infections. *Vaccine* 2005;23:5708-24.
2. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. Influenza-associated hospitalizations in the United States. *JAMA* 2004;292:1333-40.
3. Estimates of deaths associated with seasonal influenza – United States, 1976-2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010;59:1057-62. ([http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5933a1.htm?\\_cid=mm5933a1\\_e%0d%0a](http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5933a1.htm?_cid=mm5933a1_e%0d%0a).)
4. Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis* 2006;12:15-22.
5. Smith W, Andrewes C, Laidlaw P. A virus obtained from influenza patients. *Lancet* 1933;2:66-8.
6. Kaiser J. A one-size-fits-all flu vaccine? *Science* 2006;312:380-2.
7. Subbarao K, Murphy BR, Fauci AS. Development of effective vaccines against pandemic influenza. *Immunity* 2006;24:5-9.
8. Cox NJ, Subbarao K. Influenza. *Lancet* 1999;354:1277-82.
9. Nichol KL, Treanor JJ. Vaccines for seasonal and pandemic influenza. *J Infect Dis* 2006;194:Suppl 2:S111-S118.
10. Fiore AE, Uyeki TM, Broder K, et al. Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2010; 59(RR-8):1-62.
11. Couch RB, Winokur P, Brady R, et al. Safety and immunogenicity of a high dosage trivalent influenza vaccine among elderly subjects. *Vaccine* 2007;25:7656-63.
12. Kilbourne ED, Schulman JL, Schild GC, et al. Related studies of a recombinant influenza virus vaccine. I. Derivation and characterization of virus and vaccine. *J Infect Dis* 1971;124:449-62.
13. Matthews JT. Egg-based production of influenza vaccine: 30 years of commercial experience. *Bridge* 2006;36:17-24. ([http://www.nae.edu/Publications/The\\_Bridge/Archives/EngineeringandVaccine\\_ProductionforanInfluenzaPandemic/Egg-BasedProductionofInfluenzaVaccine\\_30YearsofCommercialExperience.aspx](http://www.nae.edu/Publications/The_Bridge/Archives/EngineeringandVaccine_ProductionforanInfluenzaPandemic/Egg-BasedProductionofInfluenzaVaccine_30YearsofCommercialExperience.aspx).)



14. Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:6108-13.
15. Chen Z, Wang W, Zhou H, et al. Generation of live attenuated novel influenza virus A/California/7/09 (H1N1) vaccines with high yield in embryonated chicken eggs. *J Virol* 2010;84:44-51.
16. World Health Organization. Influenzaliike illness in the United States and Mexico. 2009. ([http://www.who.int/csr/don/2009\\_04\\_24/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2009_04_24/en/index.html).)
17. Department of Health and Human Services. Public health emergency medical countermeasures enterprise review: transforming the enterprise to meet long-range national needs. August 2010. (<http://www.phe.gov/Preparedness/mcm/enterprisereview/Pages/default.aspx>.)
18. Food and Drug Administration. Revision of the Requirements for Constituent Materials. *Fed Regist* 2010;75(60):15639-42. (<http://edocket.access.gpo.gov/2010/2010-7073.htm>.)
19. *Idem*. Guidance for industry: clinical data needed to support the licensure of seasonal inactivated influenza vaccines. May 2007. (<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/ucm074794.htm>.)
20. HHS awards contracts totaling more than \$1 billion to develop cell-based influenza vaccine. News release of the Department of Health and Human Services, Washington, DC, May 4, 2006. (<http://archive.hhs.gov/news/press/20060504.html>.)
21. Katz JM, Wang M, Webster RG. Direct sequencing of the HA gene of influenza (H3N2) virus in original clinical samples reveals sequence identity with mammalian cell-grown virus. *J Virol* 1990;64:1808-11.
22. Schild GC, Oxford JS, de Jong JC, Webster RG. Evidence for host-cell selection of influenza virus antigenic variants. *Nature* 1983;303:706-9.
23. Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee. Summary minutes: meeting no. 114. Silver Spring, MD: Food and Drug Administration, September 25, 2008. (<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/08/minutes/2008-4384M.htm>.)
24. Cryz SJ, Que JU, Glück R. A virosome vaccine antigen delivery system does not stimulate an antiphospholipid antibody response in humans. *Vaccine* 1996;14:1381-3.
25. Ansalidi F, Zancolli M, Durando P, et al. Antibody response against heterogeneous circulating influenza virus strains elicited by MF59- and non-adjuvanted vaccines during seasons with good or partial matching between vaccine strain and clinical isolates. *Vaccine* 2010;28:4123-9.
26. Health Canada. Health Canada approves pandemic H1N1 flu vaccine for Canadians. October 21, 2009. ([http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/media/nr-cp/\\_2009/2009\\_171-eng.php](http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/media/nr-cp/_2009/2009_171-eng.php).)
27. Johansen K, Nicoll A, Ciancio BC, et al. Pandemic influenza A(H1N1) 2009 vaccines in the European Union. *Euro Surveill* 2009;14:19361.
28. Wichmann O, Stocker P, Poggensee G, et al. Pandemic influenza A(H1N1) 2009 breakthrough infections and estimates of vaccine effectiveness in Germany 2009-2010. *Euro Surveill* 2010;15:19561.
29. Leroux-Roels I, Borkowski A, Vanwolleghem T, et al. Antigen sparing and cross-reactive immunity with an adjuvanted rH5N1 prototype pandemic influenza vaccine: a randomized controlled trial. *Lancet* 2007;370:580-9.
30. Vogel FR, Caillet C, Kusters IC, Haensler J. Emulsion-based adjuvants for influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009;8:483-92.
31. Atmar RL, Keitel WA, Patel SM, et al. Safety and immunogenicity of nonadjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/H9N2 vaccine preparations. *Clin Infect Dis* 2006;43:1135-42.
32. Nicholson KG, Colegate AE, Podda A, et al. Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a randomized trial of two potential vaccines against H5N1 influenza. *Lancet* 2001;357:1937-43.
33. Baldrige JR, McGowan P, Evans JT, et al. Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:1129-38.
34. Stephenson I, Zambon MC, Rudin A, et al. Phase I evaluation of intranasal trivalent inactivated influenza vaccine with nontoxicogenic *Escherichia coli* enterotoxin and novel biovector as mucosal adjuvants, using adult volunteers. *J Virol* 2006;80:4962-70.
35. Couch RB, Atmar RL, Cate TR, et al. Contrasting effects of type I interferon as a mucosal adjuvant for influenza vaccine in mice and humans. *Vaccine* 2009;27:5344-8.
36. Kayamuro H, Abe Y, Yoshioka Y, et al. The use of a mutant TNF-alpha as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal immune responses. *Biomaterials* 2009;30:5869-76.
37. Wack A, Baudner BC, Hilbert AK, et al. Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice. *Vaccine* 2008;26:552-61.
38. Talon J, Salvatore M, O'Neill RE, et al. Influenza A and B viruses expressing altered NS1 proteins: a vaccine approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4309-14.
39. Ferko B, Stasakova J, Romanova J, et al. Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes. *J Virol* 2004;78:13037-45.
40. Wachek V, Egorov A, Groiss F, et al. A novel type of influenza vaccine: safety and immunogenicity of replication-deficient influenza virus created by deletion of the interferon antagonist NS1. *J Infect Dis* 2010;201:354-62.
41. Treanor JJ, Schiff GM, Couch RB, et al. Dose-related safety and immunogenicity of a trivalent baculovirus-expressed influenza-virus hemagglutinin vaccine in elderly adults. *J Infect Dis* 2006;193:1223-8.
42. Treanor JJ, Schiff GM, Hayden FG, et al. Safety and immunogenicity of a baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007;297:1577-82.
43. Kang SM, Pushko P, Bright RA, et al. Influenza virus-like particles as pandemic vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009;333:269-89.
44. Heaton P, Allende M, Lenhard K, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant trivalent seasonal influenza virus-like particle (VLP) vaccine in healthy adults. Late-breaker poster presented at the 47th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America, Philadelphia, October 29–November 1, 2009. abstract.
45. Krejtz JH, Suezter Y, de Mutsert G, et al. MVA-based H5N1 vaccine affords cross-clade protection in mice against influenza A/H5N1 viruses at low doses and after single immunization. *PLoS One* 2009;4(11):e7790.
46. Hoelscher MA, Garg S, Bangari DS, et al. Development of adenoviral-vector-based pandemic influenza vaccine against antigenically distinct human H5N1 strains in mice. *Lancet* 2006;367:475-81.
47. 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;84:3201-9.
48. Schwartz JA, Buonocore L, Suguitan AL Jr, et al. Potent vesicular stomatitis virus-based avian influenza vaccines provide long-term sterilizing immunity against heterologous challenge. *J Virol* 2010;84:4611-8.
49. Tang DC, Zhang J, Toro H, Shi Z, Van Kampen KR. Adenovirus as a carrier for the development of influenza virus-free avian influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009;8:469-81.
50. DiNapoli JM, Nayak B, Yang L, et al. Newcastle disease virus-vectored vaccines expressing the hemagglutinin or neuraminidase protein of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus protect against virus challenge in monkeys. *J Virol* 2010;84:1489-503.
51. Van Kampen KR, Shi Z, Gao P, et al. Safety and immunogenicity of adenovirus-vectored nasal and epicutaneous influenza vaccines in humans. *Vaccine* 2005;23:1029-36.
52. ClinicalTrials.gov. Safety and immunogenicity study of adenovirus-vectored, intranasal pandemic influenza vaccine. (<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00755703>.)
53. *Idem*. Safety and immunogenicity of replication-competent adenovirus 4-vectored vaccine for avian influenza H5N1. (<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01006798>.)
54. Kim JH, Jacob J. DNA vaccines against influenza viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009;333:197-210.
55. Laddy DJ, Yan J, Kutzler M, et al. Heterosubtypic protection against pathogenic human and avian influenza viruses via in vivo electroporation of synthetic consensus DNA antigens. *PLoS One* 2008;3(6):e2517.
56. Drape RJ, Macklin MD, Barr LJ, et al. Epidermal DNA vaccine for influenza is immunogenic in humans. *Vaccine* 2006;24:4475-81.
57. Jones S, Evans K, McElwaine-John H, et al. DNA vaccination protects against an influenza challenge in a double-blind randomised placebo-controlled phase 1b clinical trial. *Vaccine* 2009;27:2506-12.
58. Smith LR, Wloch MK, Ye M, et al. Phase 1 clinical trials of the safety and immunogenicity of adjuvanted plasmid DNA vaccines encoding influenza A virus H5 hemagglutinin. *Vaccine* 2010;28:2565-72.
59. Du L, Zhou Y, Jiang S. Research and development of universal influenza vaccines. *Microbes Infect* 2010;12:280-6.
60. 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.
61. Steel J, Lowen AC, Wang T, et al. An influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. *MBio* 2010;1(1):e00018.
62. 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.
63. ClinicalTrials.gov. Comparative safety and immunogenicity of 1.0 µg intramuscular (i.m.) and 2.0 µg subcutaneous (s.c.) dosing with VAX102 (M2e-flagellin) universal influenza vaccine in healthy adults. 2009. (<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00921947?term=influenza+and+universal&rank=2>.)
64. *Idem*. Safety study of recombinant M2e influenza-A vaccine in healthy adults (FLU-A). 2008. (<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00819013?term=M2e&rank=2>.)
65. Wei CJ, Boyington JC, McTamney PM, et al. Induction of broadly neutralizing H1N1 influenza antibodies by vaccination. *Science* 2010;329:1060-4.
66. Price GE, Soboleski MR, Lo CY, et al. Vaccination focusing immunity on conserved antigens protects mice and ferrets against virulent H1N1 and H5N1 influenza A viruses. *Vaccine* 2009;27:6512-21.