

# Pöördvaktsinoloogia ja struktuuribioloogia: uued võtted vaktsiiniarenduses

Rein Sikut<sup>1</sup>

Klassikalised põhimõtted vaktsinoloogias formuleeris 19. sajandi lõpul L. Pasteur. See on andnud meile vaktsiine 27 haigustekitaja vastu ning viinud paljude nakkushaiguste leviku olulise vähenemiseni, rõugete puhul isegi täieliku kadumiseni. Siiski on hulk üle maailma levivaid haigusi, mille vastu pole suudetud seni kasutatud meetoditega vaktsiini saada. Võib öelda, et klassikalise vaktsinoloogia võimalused on praeguseks ennast ammendanud ja vajadus uute strateegiatega järele on ilmselge. Molekulaarbioloogia areng on viimastel aastatel andnud konkreetseid väljundeid uute vaktsiinide saamiseks. Genoomika võimalusi kasutades on haigustekitajatest võimalik kiiresti leida seni tundmata antigeene, mis on sobivad vaktsiini tegemiseks. Haigustekitaja genoomi uurimisest saadud info kasutamist vaktsiiniantigeenide leidmiseks nimetatakse kokkuvõtlikult pöördvaktsinoloogiaks. Artiklis on lähemalt vaadeldud, kuidas pöördvaktsinoloogiat kasutati meningokokk B vastase vaktsiini loomisel. Samuti on selgitatud struktuuribioloogia rolli seni kättesaamatuks jäänud vaktsiinide arendamisel või olemasolevate vaktsiinide paremaks muutmisel.

Eesti Arst 2014;  
93(10):587–591

Saabunud toimetusse:  
01.07.2014  
Avaldamiseks vastu võetud:  
08.09.2014  
Avaldatud internetis:  
28.11.2014

<sup>1</sup> GlaxoSmithKline

Kirjavahetajaautor:  
Rein Sikut  
rein.r.sikut@gsk.com

Võtmesõnad:  
vaktsiiniarendus,  
pöördvaktsinoloogia,  
meningokokk B, genoomika,  
struktuuribioloogia

Tartus mööda Vanemuise tänavat jalutades võib Vanemuise ja Riia tänava vahelisel alal ühe ülikoolile kuuluva hoone katusel märgata kirja „Omicum“. Tavakodanikule ilmselt täiesti arusaamatuks jääva tähendusega silt, veidi rohkem asjasse pühendatud teavad, et see lühend koondab enda alla praegusaja molekulaarbioloogias kiiresti arenevaid süsteemseid analüüsimeetodeid: genoomika, proteoomika, glükoomika, metaboolika jt. Veelgi vähem teatakse aga sellest, mida on reaalselt need „oomikad“ andnud praktilisele meditsiinile, kas üldse on andnud. Või on need siiski midagi sellist, millest ehk kunagi kaugemas tulevikus kasu võiks olla.

Artikli **eesmärk** on vaadelda, kuidas genoomika on aidanud kaasa uute vaktsiinide arendamisele, ja selgitada, mis on pöördvaktsinoloogia (ingl *reverse vaccinology*) ning mille poolest erineb see klassikalisest vaktsinoloogiast. Tutvustatud on ka struktuuribioloogia rolli uute vaktsiinide arendamisel.

Praeguseks on suudetud luua vaktsiine 27 nakkushaiguse ennetamiseks. Kõik need vaktsiinid on kas viiruslike või bakteriaalsete haiguste vastu. Ühegi parasitaarhaiguse vastu praegu veel litsentseeritud vaktsiini

ei ole, kuid väga lähedal ollakse esimese malaariavaktsiini kasutusloa saamisele. Vaktsineerimine praeguses mõistes sai alguse juba 18. sajandi lõpul rõugeviiruse vastu ja seda ajal, kui haigustekitajat ennast veel ei tuntudki. Sajand hiljem, kui avastati, et nakkushaigusi põhjustavad mikroorganismid, formuleeris Louis Pasteur klassikalised vaktsinoloogia põhireeglid (1). Need seisnevad haigustekitaja kindlakstegemises, tema kultiveerimises ja sellele järgnevas nõrgestamises või inaktiveerimises ning saadud materjaliga organismis immuunvastuse esilekutsumises (vt joonis 1). Sellist empiirilist meetodit on kasutatud peaaegu muutumatul kujul ligi 200 aastat ja nii on paljude haiguste vastu saadud väga tõhusad vaktsiinid. Praegu, mil molekulaarbioloogia, valkude keemia ja biotehnoloogia on teinud suuri edusamme, ei suudeta aga ikka veel luua vaktsiine hulga üle maailma levivate nakkushaiguste vastu, olgu siinkohal nimetatud HIV, kopsutuberkuloos, Dengue viirus, respiratoorne süntsütsiaalne viirus.

Ilmselt on klassikaline käsitlusviis vaktsinoloogias ennast ammendanud ja tarvis on uusi. Esimene suurem läbimurre seni kasutatud meetodikas oli komponentvaktsiinide (tuntud ka kui allühikvaktsiinid, ingl *subunit vaccines*)

kasutuselevõtt 1980. aastatel. Kuna kõiki patogeene pole võimalik *in vitro* tingimustes kultiveerida (nt B-hepatiidi viirus), siis otsiti muid lahendusi. Mõisteti, et alati polegi vaja kasutada patogeeni tervikuna, vaid piisab ka patogeeni valitud komponentide kasutamisest kaitsva immuunvastuse saavutamiseks. Nii loodi B-hepatiidi (HepB) vaktsiin (1986. a) ja papilloomiviiruse (HPV) vaktsiinid (2006. a), kus vaktsiini koostises on üksainus komponent neist viirustest (vastavalt kas HepB pinnaantigeen HBsAg või HPV kapsiidi valk L1). Siia gruppi kuuluvad ka atsellulaarne läkaköhavaktsiin, kus kasutatakse üht kuni mitut antigeenset komponenti läkaköha bakterist, samuti difteeria ja teetanuse vaktsiinid, kus antigeeniks on üksainus komponent (keemiliselt inaktiveeritud toksiin ehk toksoid) kummastki bakterist. Nende vaktsiinide tänapäevasel tootmisel ei pea kultiveerima haigustekitajat ennast, sest valitud komponente saab toota hoopis rakukultuuride abil. Näidetena võib tuua pärmirakkude abil toodetava B-hepatiidi pinnaantigeeni või siis teatud liiki liblika (*Trichoplusia ni* ehk pintselloolane) röövikutest pärinevate rakkude abil toodetava HPV kapsiidivalgu L, kuhu sobiva vektori abil sisestatakse soovitud antigeeni kodeeriv geen. Rakukultuur toodab sisseviidud geeni info põhjal vaktsiiniantigeeni, kust see eraldatakse ning vajaliku astmeni puhastatakse.

Komponentvaktsiinide kasutuselevõtt ei olnud siiski põhimõtteliselt uus käsitlusviis,

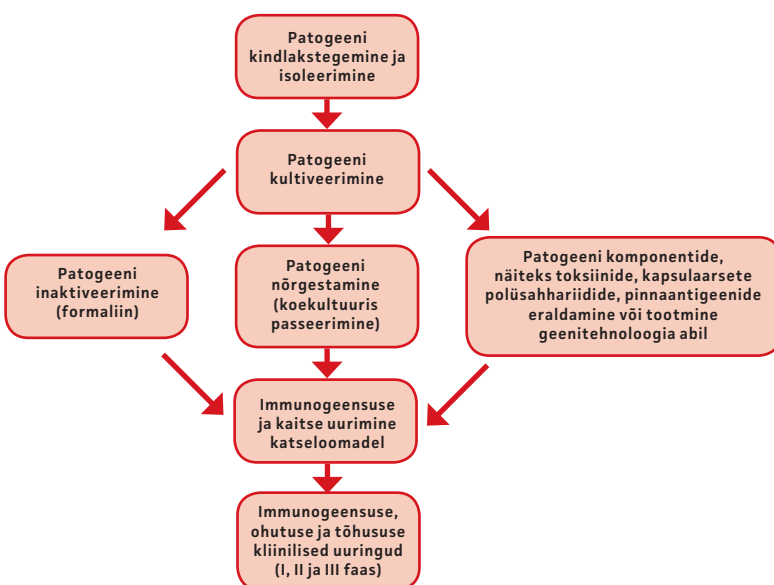
see oli pigem tehnilist laadi uuendus, mis sai võimalikuks tänu biotehnoloogiliste meetodite täiustumisele. Võib öelda, et eelmise sajandi lõpuks, selle sajandi alguseks olid klassikalise, Louis Pasteur'i paika pandud põhimõtete järgi kõik vaktsiinid tehtud, mida võimalik teha oli. Eeltoodud näited HepB ja HPV vaktsiini tegemise kohta on edulood, sest nende patogeenide puhul oli kerge ära arvata vaktsiini tegemiseks sobivaid sihtmärke, mida insngeneetika meetodite abil oli lihtne toota. Alati ei ole aga see lihtne ja alljärgnevate näidete varal on selgitatud, millised probleemid on vaktsiinide tegemisel üles kerkinud ja milliseid põhimõtteliselt uusi teid nende lahendamisel praegusel ajal kasutatakse.

## MENINGOKOKK B (MenB) VAKTSIIN: ESIMENE SAAVUTUS PÖÖRDVAKTSINOLOOGIA RAKENDAMISEL

Meningokokknakkus on põhjustatud bakterist *Neisseria meningitidis*. Bakterit ümbritseb komplekssetest polüsahhariididest koosnev kihn ehk kapsel, mis on oluline bakteri ellujäämiseks veres, sest see takistab komplemendi vahendatud tsütotoksilist reaktsiooni (2). Kapsulaarsete polüsahhariidide struktuur määrab ära, millisesse serogruppi bakter kuulub. Kokku eristatakse 13 meningokoki serogruppi, inimesele patogeensed on neist kuus: A, B, C, Y, W135 (3) ning ka viimasel ajal leitud serogrupp X (4).

Meningokokkivastastes vaktsiinides kasutatakse antigeenina puhastatud kapsulaarseid polüsahhariide, mille vastased antikehad käivitavad tõhusa komplemendi vahendatud tsütotoksilisuse reaktsiooni. Sel moel on saadud vaktsiinid meningokoki A, C, Y ja W135 serogrupi vastu. B-serogrupi kapsulaarne polüsahhariid koosneb aga polüsiaalhapest, mis sarnaneb ühe inimese rakkude pinnal oleva glükoproteiiniga (N-CAM, *neural cell adhesion molecule*). Seetõttu on tegemist potentsiaalse autoantigeeniga, mis on vähe immunogeenne ja mille vastu antikehi normaaljuhul ei teki (5).

Klassikaline vaktsinoloogia ei ole seetõttu andnud tulemusi MenB-vastase tõhusa vaktsiini loomisel, vajadus selle järele aga on. USAs põhjustab B-serogrupp kolmandiku meningokoki juhtumitest (6), Euroopas võib see paljudes riikides olla kuni 90% (7). MenB-vastase vaktsiini tegemisel võeti appi genoo-



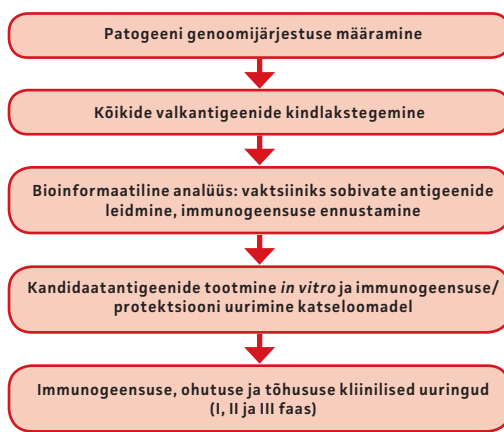
**Joonis 1.** Vaktsiinide saamise klassikaline käsitlus, mis on andnud praeguseks vaktsiine 27 haigustekitaja vastu.

mika. *Neisseria meningitidis*'e genoom sekve-  
neeriti täispikkuses, sest genoomi järjestus  
annab infot kõikide valkude kohta, mida  
vastav organism on võimeline tootma (8).  
Genoomi järjestusanalüüs näitas üle 2000  
potentsiaalse valkantigeeni olemasolu.

Kuna meningokoki vastu on vajalik  
vaktsineerimise abil saavutada humoraalne  
immuunsus (antikehad), siis analüüsiti  
saadud järjestusi bioinformaatika meeto-  
ditega ning valiti välja antigeenid, mis on  
eksponeeritud patogeeni välispinnal või on  
sekreteeritavad (kuna bakteri sisemuses  
olevad antigeenid pole antikehadele kätte-  
saadavad). Tulemus näitas 570 sekretoorse  
või pinnaantigeeni olemasolu. Saadud geeni-  
järjestused klooniti, viidi sobivate vektorite  
abil *E.coli* bakterisse ja bakterikultuuri  
abil toodeti vastavad antigeenid edasiseks  
uurimiseks. Sel moel õnnestus edukalt toota  
350 erinevat valkantigeeni.

Vaktsiini jaoks sobivate sihtmärkide  
väljaselgitamiseks immuniseeriti katseloomi  
(hiired) eraldi kõigi puhastatud antigeeni-  
dega ning tekitati igäühe vastu eraldi anti-  
seerumid. Saadud antiseerumeid testiti *in  
vitro* komplemendi vahendatud bakteritsiid-  
suse testis, mis tähendab, et uuriti, millised  
antiseerumid koos komplemendisüsteemi  
valkudega olid kõige tõhusamad baktereid  
lüüsimas. See test on tuntud kui meningo-  
kokivastast immuunkaitset näitav korrelaat  
inimesel. Nii leiti 28 antigeeni, mis kutsuvad  
esile bakteritsiidsete antikehade tekke (9).

Järgmine samm oli saadud antigeeni  
kandidaatide edasine pingeritta seadmine  
konserveerituse järgi. Ehk lihtsamalt öeldes  
valiti välja need, mille järjestus oleks võima-  
likult sarnane erinevatel MenB isolaatidel  
ja tekkiv immuunvastus oleks võimalikult  
laiapõhjaline. Selleks kasutati MenB tüvede  
kollektiooni, mis oli üle maailma kokku  
kogutud, ning uuriti valitud antigeenide  
varieeruvust erinevates tüvedes. Lõpuks  
jäädid pidama kolmel tugevalt immuno-  
geensel valgul: NHBA (*Neisseria* hepariini  
siduv antigeen), NadA (neisseriaalne adhe-  
siin A) ja fHbp (faktor H-d siduv valk).  
Lisaks võeti veel kaks antigeeni, GNA 2091  
ja GNA1030 (*Genome-derived Neisseria  
Antigen*), mis osa parameetrite alusel samuti  
sobisid. Tootmise lihtsustamiseks on mõned  
antigeenid kombineeritud liitvalkudeks  
(*fusion protein*) ja vaktsiini lõppkoostis on  
järgmine: 50 µg NHBA-GNA1030 liitvalku, 50  
µg GNA2091-fHbp liitvalku ja 50 µg NadA-d.



**Joonis 2.** Pöördvaktsinoloogia põhimõtteline  
skeem, mis praeguseks on andnud ühe konkreetse  
tulemuse: meningokokk B vaktsiin sai Euroopas  
kasutusloa 2012. aastal. Genoomi järjestuse  
analüüs näitas enam kui 2000 valkantigeeni  
olemasolu, millest 570 olid potentsiaalselt sobivad  
sihtmärgid antikehadele (sekretoorsed või  
membraanseoselised valgud). Neist 350 antigeeni  
õnnestus toota *in vitro* ja saadud antiseerumid  
näitasid 28 antigeeni võimekust esile kutsuda  
bakteritsiidseid antikehi. Vaktsiini lõppkoostisse  
valiti 5 antigeeni. Sel moel tehti kindlaks seni  
tundmatud ja tugevalt immunogeensed vaktsiini  
tarbeks sobivad sihtmärgid.

Joonisel 2 on näha MenB -vastase vaktsiini  
loomise loogika ja etapid (viite nr 9 põhjal).

Ülalkirjeldatud lähenemine vaktsiini  
arenduses võimaldas leida meningokoki  
bakterist seni täiesti tundmata antigeene,  
saadud vaktsiin on tugevalt immunogeenne  
ja kasutamiseks sobiva ohutusprofiiliga  
ning suudab kaitsta enamiku maailmas  
levivate MenB tüvede vastu. Kliinilistest  
uuringutest saadud tulemused võimaldasid  
Euroopa Ravimiametil (EMA) anda sellele  
vaktsiinile kasutusloa aastal 2012.

## STRUKTUURIBIOLOOGIA MEETODID VAKTSINOLOGIAS

Pöördvaktsinoloogia võimaldab küll kind-  
laks teha uusi vaktsiini jaoks sobivaid anti-  
geene, kuid alati sellest ei piisa. See kehtib  
eriti just viiruste kohta: enamiku viiruste  
genoom on väga väike, nende järjestused  
ammu määratud ning potentsiaalsed siht-  
märgid vaktsiini tegemiseks samuti teada,  
kuid efektiivset vaktsiini ikka veel ei ole.

Olgu siinkohal näiteks HI-viirus (HIV-1)  
ja respiratoorne süntsütsiaalne viirus (RSV).  
HIV-1 isoleeriti juba 31 aastat tagasi ja  
selle molekulaarbioloogiat ja patogeneesi  
mehhanisme on väga põhjalikult uuritud.  
HIV genoom sisaldab 9 geeni, mis toodavad  
16 valku. See on teada juba kaua aega, aga

vaatamata sellele pole suudetud siiani luua ühtegi toimivat profülaktilist ega terapeutilist vaktsiini. HI-viirust ümbritseb lipiidne membraan, mis pärineb nakatunud rakust, kust viirusosake välja pungus. Viirust ümbritsevas membraanis paikneb ümbrise valk, mis koosneb viiruse *Env*-geeni määratud transmembraanses osast gp41 ja sellega seonduvast rakuvälisest osast gp120. Need valgud moodustavad membraanis kolmikuid ehk trimeere ja need on absoluutselt vajalikud viiruse sisenemiseks raku.

HI-viiruse avastamisele järgnevatel aastatel tundus, et vaktsiini saamine on paari aasta küsimus, kuna umbes samal ajal valminud B-hepatiidi komponentvaktsiin toimis väga efektiivselt, kui vaktsiini koostisse viidi ainult hepatiidiviiruse pinnaantigeen (HBsAg). Kõik järgnevad katsetused HIV-vaktsiiniga, kus kasutati antigeenina ainult *Env*-geeni produkte ja mille soovitud eesmärk oli kutsuda esile viirust neutraliseerivate antikehade teke, lõppesid aga nurjumistega. Vaktsineeritud antikehad küll tekkisid, kuid neil polnud mingit kaitsvat mõju nakatumise vastu (10, 11).

Praeguseks on saadud aru, et viirust neutraliseerivaid antikehi, mis on tõhusad väga laia valiku maailmas ringlevate HI-viiruse tüvede vastu (ingl *broadly neutralizing antibodies*) osal HIV-nakkusega patsientidel vähesel määral siiski tekib. Patsientidelt on vastavad antikehad isoleeritud ja neist on valmistatud monoklonaalseid antikehi tootvad rakuliinid, mille abil on kindlaks tehtud viiruse jaoks kriitilised seondukohtad ümbrisevalgul. Selline info on saadud neutraliseerivate monoklonaalsete antikehade ja HIV-1 ümbrise valguga komplekside röntgenkristallograafilisel analüüsil. On mõistetud, et laia spektriga neutraliseerivate antikehade esilekutsumiseks on vaja konstrueerida kunstlik immunogeen, mis sobivaid struktuure immuunsüsteemile eksponeeriks.

Loodusliku antigeeni kasutamisel pole vajalikud seondukohtad (epitoobid) piisavalt hästi immuunsüsteemile eksponeeritud või nad pole piisavalt immunogeensed. Praegused jõupingutused HIV-vaktsiini tegemisel ongi peamiselt suunatud sobiva kunstliku immunogeeni tekitamisele, mis kutsuks esile laialt neutraliseerivate antikehade teket.

Valkude struktuuri kohta käivat infot kasutatakse ka RSV-vastase vaktsiini arendamiseks. RSV on alumisi hingamisteid nakatav ning väikelaste hospitaliseerimist

põhjustav viirus – üks viimaseid laialt levinud viiruseid, mille vastu vaktsiin puudub (12). Vaktsiiniks sobiv sihtmärk on ilmselt viiruse pinnal olev F-valk, mis sarnaselt HI-viiruse *Env*-valguga moodustab trimeere ja on vajalik viiruse raku sisenemiseks. F-valgu struktuuri ebastabiilsuse tõttu pole aga võimalik muutmata kujul seda valku vaktsiini koostises kasutada, sest antigeeni väljapuhastamisel või selle insenerigeneetilisel tootmisel rakukultuuride abil ei säili antigeeni loomulik konformatsioon ja seetõttu ei teki viirust neutraliseerivaid antikehi. Kasutades valguga röntgenkristallograafiast saadud infot ja kombineerides seda insenerigeneetika võimalustega, on konstrueeritud uus stabiliseeritud konformatsiooniga antigeen, mille tõhusust hinnatakse kliinilistes uuringutes (13, 14).

RSV-vastast vaktsiini katsetati esimest korda juba 1960. aastatel, kuid formaliiniga inaktiveeritud vaktsiin tekitas küll viiruse pinnavalkude vastu antikehi, kuid neil ei olnud mingit neutraliseerivat toimet. Vastupidi, mitteneutraliseerivad antikehad hoopis suurendasid haiguse raskusastet neil lastel, kes pärast vaktsineerimist loodusliku viirusega nakatusid (15). See oli oluline signaal näitamaks, et klassikaline käsitlus vaktsinoloogias ei ole rakendatav kõikide patogeenide puhul.

Struktuuribioloogia meetodite kasutamine vaktsinoloogias on muutumas üheks olulisemaks võtteks seni kättesaamatuks jäänud vaktsiinide loomisel või olemasolevate vaktsiinide paremaks muutmisel. Ka universaalse gripivaktsiini loomisel kasutatakse valkude struktuuri infot põhinevat käsitlust. Kindlaks on tehtud gripiviiruse HA antigeeni konserveerunud piirkond, mis looduslikul viirusel on väheimmunogeenne ja immuunvastus tekib eelistatult immunodominantse, kuid väga muutliku antigeeni osa vastu (16). Ka siin on vajalik konstrueerida kunstlik immunogeen, mis kutsuks esile universaalse immuunvastuse gripiviiruse vastu ja kaoks vajadus iga-aastase vaktsineerimise järele.

Vaktsineerimispraktika on praegu oma kolmanda aastasaja alguses, ja kui arutleda selle tuleviku üle, siis on vaktsiiniarenduses näha selge suund fundamentaaluuringutest tulevate info suurema kasutamise poole vaktsiinide väljatöötamisel, mida nimetatakse ka vaktsiinide otstarbekohaseks loomiseks (*rational vaccine design*) ja mis on

vaktsinoloogias üha enam asendamas empiirilist käsitlust (17). See ei puuduta mitte ainult neid vaktsiine, mida praegu veel pole, vaid küllalt ruumi on ka olemasolevate vaktsiinide tõhusamaks muutmisel. Läkakõha levik maailmas vaatamata vaktsineerimisele on üks näide, kus vaktsiinide tõhusust oleks vaja suurendada. Viimasel ajal on kogunemas andmeid, et levima on hakanud sellised läkakõha bakteri tüved, kus mõned vaktsiini koostises olevad antigeenid (pertaktiin) on kadunud inimpopulatsioonis ringlevatest tüvedest (18). Üks võimalik lahendus oleks siinkohal pöördvaktsinoloogia abiga leida uusi vaktsiini antigeene. Ka pneumokokivastaste vaktsiinide puhul oleks vaja leida uusi antigeene, mis oleksid universaalsed kõikidele levinud serotüüpidele. Praegu kasutusel olevad konjugeeritud vaktsiinid põhinevad pneumokoki serotüübispetsiifilistel kapsulaarsetel polüsahhariididel ning sisaldavad 10 või 13 (sõltuvalt tootjast) serotüübi polüsahhariidseid antigeene. Vajadus universaalse pneumokokivastase vaktsiini järele on olemas, et tagada kaitse ka vaktsiinides mittesisalduvate serotüüpide vastu. Uurimistöid sel suunal tehakse palju, on identifitseeritud mõningad bakteri pinnal olevad valgulised antigeenid, näiteks PspA ja PspC (19), ja ilmselt on aja küsimus, kunas vastavad vaktsiinid turule jõuavad.

## TÄNUVAALDUS

Autor tänab prof Ants Kurge TÜ molekulaar- ja rakubioloogia instituudist ning dr Kadri Kõivumäge TÜ Kliinikumist käskkirja ülevaatamise ja tehtud märkuste eest

## VÕIMALIKU HUVIKONFLIKTI DEKLARATSIOON

Autor töötab teadusnõunikuna GSK Eesti OÜs, mis on vaktsiinide väljatöötamise ja turustamisega tegelev ettevõtte.

## SUMMARY

### Reverse vaccinology and structural biology: new strategies in vaccine development

Rein Sikut<sup>1</sup>

Basic rules in vaccinology were established by L. Pasteur at the end of the 19th century. This classical approach has delivered vaccines against 27 different infectious agents and has led to the reduction in several devastating infectious diseases and eradication of smallpox. However, there are numerous

diseases that have resisted the classical approach in vaccinology. These are spreading globally, and the need for innovative strategies is obvious. Development of molecular biology has already yielded tangible results in vaccinology. A new approach, „reverse vaccinology,“ uses genomic information to identify antigens suitable for vaccine development from any microorganism over a short time frame. This article describes how this method was used to develop a vaccine against meningococcus B. It also explains the role of structural biology in development of vaccines refractory to existing efforts, as well as in improvement of currently available vaccines.

## KIRJANDUS/REFERENCES

1. Pasteur L. De l'attenuation du virus du Cholera des poules. CR Acad Sci Paris 1880;91:673–80.
2. Schenider MC, Exley RM, Ram S, Sim RB, Tang CM. Interactions between *Neisseria meningitidis* and the complement system. Trends Microbiol 2007;15:233–40.
3. Kaaijk P, van der Ende A, and Luytjes W. Routine vaccination against MenB. Human Vaccines & Immunotherapeutics 2014;10:310–6.
4. Xie O, Pollard AJ, Mueller JE, Norheim G. Emergence of serogroup X meningococcal disease in Africa: need for a vaccine. Vaccine 2013;31:2852–61.
5. Nedelec J, Boucraut J, Garnier JM, Bernard D, Rougon G. Evidence for autoimmune antibodies directed against embryonic neural cell adhesion molecules (N-CAM) in patients with group B meningitis. J Neuroimmunol 1990;29:49–56.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, *Neisseria meningitidis*, 2012. <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/mening12.pdf>.
7. Health Protection Agency. Invasive meningococcal infections (England and Wales), annual report for 2011/2012. Health Prof Rep 2013;7:32–4.
8. Pizza M, Scarlato V, Masignani V, et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. Science 2000; 287:1816–20.
9. Serruto D, Bottomley MJ, Ram S, Giuliani MM, Rappuoli R. The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, 4CMenB: immunological, functional and structural characterization of the antigens. Vaccine 2012;30:Suppl 2:B87–B97.
10. Rgp120 HIV Vaccine Study Group. Placebo-controlled Phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. J Infect Dis 2005;191:654–65.
11. Pitisuttithum P, Gilbert P, Gurwith M, et al. Randomized, double-blind placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injecting drug users in Bangkok, Thailand. J Infect Dis 2006;194:1661–71.
12. Dormitzer PR, Grandi G, Rappuoli R. Structural vaccinology starts to deliver. Nat Rev Microbiol 2012;10:807–13.
13. McLellan JS, Chen M, Joyce MG, et al. Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus. Science 2013;342:592–8.
14. Glenn GM, Smith G, Fries L, et al. Safety and immunogenicity of a Sf9 insect cell-derived respiratory syncytial virus fusion protein nanoparticle vaccine. Vaccine 2013;31:524–32.
15. Murphy BR, Walsh EE. Formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccine induces antibodies to the fusion glycoprotein that are deficient in fusion-inhibiting activity. J Clin Microbiol 1988;26:1595–7.
16. Whittle JR, Zhang R, Khurana S, et al. Broadly neutralizing human antibody that recognizes the receptor-binding pocket of influenza virus hemagglutinin. Proc Natl Acad Sci USA 2011;108:14216–21.
17. De Gregorio E, Rappuoli R. From empiricism to rational design: a personal perspective of the evolution of vaccine development. Nat Rev Immunol 2014;14:505–14.
18. Pawloski LC, Queenan AM, Cassiday PK, et al. Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. Clin Vaccine Immunol 2014;21:119–25.
19. Schachern PA, Tsprung V, Ferrieri P, et al. Pneumococcal PspA and PspC proteins: Potential vaccine candidates for experimental otitis media. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2014;78:1517–21.

<sup>1</sup> GlaxoSmithKline, Tallinn, Estonia

Correspondence to: Rein Sikut [rein.r.sikut@gsk.com](mailto:rein.r.sikut@gsk.com)

Keywords: vaccine development, reverse vaccinology, meningococcus B, genomics, structural biology