

Artículo de revisión

Influenza estacional y la baja efectividad de las vacunas contra estos virus

Vega-Sánchez J.C. (1); Bravo-Madrigal J. (2)

(1) Licenciatura en Biología de la Universidad de Guadalajara, Tesista en CIATEJ.; (2) Investigador Titular, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ).

Resumen

El virus de la influenza afecta mundialmente a millones de personas y es responsable de aproximadamente 500,000 muertes cada año. La principal alternativa de protección es la vacunación contra este virus, de tal manera que actualmente existen múltiples opciones de vacunas, las cuales son producidas de manera anual. Desafortunadamente este virus tiende a mutar constantemente, lo que ocasiona pérdida de eficacia en la protección. La recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el diseño de nuevas vacunas, ha sido la inclusión de cepas vacunales similares a los virus prevalentes en cada temporada de influenza. No obstante, la efectividad de estas vacunas no es ha sido la esperada. Este hecho ha llevado a cuestionar si otros métodos de producción de vacunas brindarían mayor protección contra este virus, ya que se ha encontrado que los virus producidos en huevo sufren cambios estructurales que los vuelven diferentes al virus original, por tal motivo la tendencia actual, es el uso de sustratos celulares para la producción de antígeno viral, con lo que se espera mayor efectividad, sin embargo y a pesar de estas estrategias aún debe tomarse en consideración la magnitud del efecto antigénico causado por el tipo de glicosilación inducido por el sustrato de producción. Esta revisión aborda el tipo de vacunas disponibles para prevenir la influenza, así como la influenza que tiene el sustrato de producción sobre la estructura antigénica de los virus producidos y su efecto final en la capacidad de brindar protección.

Palabras clave: virus de influenza, glicosilación, sustrato celular, hemagglutina, vacunas.

Abstract

Influenza virus affects millions of people all over the world and is responsible for 500,000 deaths each year. The main alternative of protection is the vaccination against this virus, so that currently there are multiple vaccine options, which are produced annually. Unfortunately this virus tends to constantly mutate, causing loss of protection effectiveness. The WHO recommendation on the design of new vaccines has been the inclusion of similar vaccine strains to the virus prevalent each influenza season. However the effectiveness of these vaccines has not been as expected. This has led to question whether other methods of vaccine production would provide greater protection against the virus, compared with the most commonly used. It has been found that the virus produced in eggs for vaccines undergo structural changes that make them different from the original virus, therefore the current trend is the use of cell substrates for production of viral antigen, thus greater effectiveness is expected, however despite these strategies, the magnitude of the antigenic effect caused by the type of glycosylation induced by the production substrate should still be considered. This review addresses the type of vaccine available to prevent influenza as well as the influence of the substrate production on the antigenic structure of the virus produced and its ultimate effect on the ability to provide protection.

Keywords: Influenza virus, glycosylation, cellular substrate, hemagglutinin, vaccines

Introducción

Cada año el virus de la influenza afecta a millones de personas a nivel global y en ocasiones ha llegado a causar pandemias con grandes repercusiones, como lo fue la gripe española de 1918, con un número de muertes entre los 20 y 40 millones, y las pandemias originadas en Asia en 1957 y en 1968.¹ El riesgo de que la influenza llegue a causar una pandemia no ha desaparecido como se pudo observar en el 2009 con la influenza H1N1, año en el cual se reportaron 68,611 casos de influenza H1N1 en México.² Cada año los brotes de influenza estacional afectan del 5% al 15% de la población mundial causando aproximadamente 500,000 muertes al año.³

La influenza estacional está caracterizada por el inicio súbito de fiebre alta, tos, dolores musculares, articulares, de cabeza y garganta, intenso malestar y abundante secreción nasal. Entre los grupos de riesgo están los menores de 2 años, mayores de 65 años de edad y las personas de todas las edades con determinadas afecciones, tales como inmunodepresión o enfermedades crónicas cardíacas, pulmonares, renales, hepáticas, sanguíneas o metabólicas.³

Para atender la influenza en nuestro país anualmente se ejecutan programas nacionales de vacunación contra esta enfermedad, enfocándose en la población con mayor riesgo. La OMS desde hace ya más de 50 años ha colaborado con científicos y responsables políticos de la producción de vacunas, de manera que se desarrolle un enfoque universal de fabricación, pruebas y regulación de las vacunas de influenza.⁴

La OMS publica las recomendaciones de la composición de la vacuna de la próxima temporada de manera que sirva como guía para las autoridades de salud pública y fabricantes de vacunas. Estas recomendaciones se hacen 2 veces al año: en febrero para el hemisferio norte y en septiembre para el hemisferio sur, de tal manera que los productores, tienen de 6 a 8 meses para la elaboración de la vacuna, tiempo suficiente para lograr la producción de las vacunas estacionales producidas en embrión de pollo.³

La recomendación sobre la composición de las vacunas contra la influenza estacional es emitida por el *Global Influenza Surveillance and Response System* (GISRS) quien está constantemente recolectando muestras de los virus de influenza que se encuentran en circulación. El GISRS también hace la caracterización genética y antigénica de estos virus, así como su resistencia a antivirales y la efectividad de vacunas contra estos. Es el conjunto de

todas estas pruebas las que permiten recomendar los virus adecuados para incluir en las vacunas de cada temporada.⁵

Vacunas actuales contra la influenza

La composición usual de las vacunas contra la influenza estacional está dirigida contra 2 virus de influenza tipo A y 1 virus de influenza tipo B, este último incluido en las vacunas trivalentes, mientras que para las vacunas cuadrivalentes tienen las mismas que las trivalentes más otro virus de influenza tipo B. Las vacunas se pueden encontrar en diferentes presentaciones, que consideran: la vía de administración, el sustrato en la que son producidas y las recomendaciones para edades de aplicación, siendo la presentación más utilizada la vacuna de administración intramuscular producida en huevo de gallina (Tabla 1). Así mismo las vacunas contra la influenza pueden contener en su formulación virus inactivados, virus atenuados ó proteínas desarrolladas mediante tecnología recombinante.

Las vacunas con virus inactivados, o *Inactivated Influenza Vaccine* (IIV), se encuentran en presentaciones para administrarse por vía intramuscular e intradérmica, mientras que las recombinantes únicamente por vía intramuscular. A diferencia de las anteriores, las vacunas con virus atenuados, o *Live Attenuated Influenza Vaccine* (LAIV), se encuentran en presentación de administración intranasal.

Las IIV conforman la mayoría de las vacunas contra la influenza aplicadas anualmente, pero no necesariamente estas brindan la mayor protección. Las vacunas LAIV no están recomendadas para los grupos de riesgo, sin embargo hay estudios que han demostrado brindar mayor protección en niños, que la proporcionada por las IIV.^{6,7} En 2014 en los EUA, el *Advisory Committee on Immunization Practices* (ACIP) promovió la aplicación de vacunas LAIV sobre las IIV para los niños saludables entre 2-8 años de edad basados en los datos del 2013 que demostraban que las vacunas atenuadas eran superiores a las inactivadas, sin embargo en 2015 se votó por no renovar lo dicho en 2014 de manera que no recomiendan una vacuna sobre la otra, esto después de reevaluar la efectividad de ambas vacunas en estudios posteriores^{8,9} Será necesario realizar más estudios para evaluar si realmente una vacuna es superior a la otra.

Como se puede apreciar en la tabla 1, La mayor parte de los vacunas contra la influenza son producidas en embrión de pollo, sustrato que ha sido usado desde hace más de 40

años. La experiencia que se tiene en el desarrollo de estas vacunas ha permitido conocer las ventajas y desventajas de este medio de producción que ha redundado en el desarrollo normas claramente definidas. Sin embargo se han buscado nuevos sustratos, debido a que la vacuna no ha conferido el nivel de protección deseado; así como también, se le han asociado reacciones adversas para algunos pacientes.¹⁰

Desde la década pasada se enfocaron múltiples esfuerzos en producir antígeno vacunal en diversos cultivos celulares, sin embargo la experiencia previa es limitada, esto conlleva a que la producción de vacunas por este

medio esté restringida a ciertas líneas celulares, debido a que aún no se conocen por completo los riesgos de producir vacunas en otro tipo de sustratos.¹¹ Entre las células autorizadas para producir vacunas comerciales, están: las MDCK (Madin Darby Canine Kidney), derivada de riñón de perro, donde se han desarrollado y licenciado las siguientes vacunas contra la influenza: Optafluy® y Flucelfax®; La línea celular VERO (African Green monkey kidney), derivada de riñón de mono verde africano, en donde se han desarrollado la vacunas: Vepacel® y Celvapan®; Finalmente las líneas ExpressSF® y SF9 derivadas de células de insecto, se han aprobado y con estos se ha desarrollado la vacuna Flublok®.¹²

Tabla 1.
Vacunas aprobadas para su aplicación en Estados Unidos de América, Canadá, México y la Unión Europea para el 2016

Nombre Comercial	Fabricante	Virus	Columna 1	Aplicación	Producido en
Flublok	Protein Sciences Corporation	A/California/7/2009 NYMC X-179A (H1N1) A/ Switzerland/9715293/2013 NIB-88 (H3N2) B/ Phuket/3073/2013	Recombinante	Intramuscular	Línea celular de insecto (expresSF+®)
Flucelvax	Novartis Vaccines and Diagnostics	A/Brisbane/10/2010 (H1N1) A/South Australia/55/2014 (H3N2) B/Utah/9/2014	Inactivada	Intramuscular	MDCK
Optaflu	Novartis Vaccines and Diagnostics	A/Brisbane/10/2010 (H1N1) A/South Australia/55/2014 (H3N2) B/Utah/9/2014	Inactivada	Intramuscular	MDCK
Celvapan	Baxter AG	A/California/07/2009 (H1N1)v	Inactivada	Intramuscular	Vero
Pandemic Influenza Vaccine H5N1 Baxter AG	Baxter AG	A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	Inactivada	Intramuscular	Vero
Vepacel	Baxter AG	A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	Inactivada	Intramuscular	Vero
Fluenz Tetra	Medimmune	A/Bolivia/559/2013 MEDI 255962 (H1N1) A/Switzerland/9715293/2013 MEDI 252385 (H3N2) B/Brisbane/60/2008 MEDI 228030 B/Phuket/3073/2013 MEDI 254977	Inactivada	Intranasal	Huevo + Vero
FluLaval	ID Biomedical Corporation of Quebec	A/California/7/2009 NYMC X-179A (H1N1) A/ Switzerland/9715293/2013 NIB-88 (H3N2) B/ Phuket/3073/2013	Inactivada	Intramuscular	Huevo

Nombre Comercial	Fabricante	Virus	Columna 1	Aplicación	Producido en
FluLavalQuadrivalent	ID Biomedical Corporation of Quebec	A/California/7/2009 NYMC X-179A (H1N1) A/Switzerland/9715293/2013 NIB-88 (H3N2) B/Phuket/3073/2013 B/Brisbane/60/2008	Inactivada	Intramuscular	Huevo
Influenza A (H5N1) Virus MonovalentVaccine, Adjuvanted	ID Biomedical Corporation of Quebec	A/Indonesia/05/2005 (H5N1)	Inactivada	Intramuscular	Huevo
Fluvirin	Novartis Vaccines and Diagnostics	A/Christchurch/16/2010 NIB-74 (H1N1) A/Switzerland/9715293/2013 NIB-88 (H3N2) B/Phuket/3073/2013	Inactivada	Intramuscular	Huevo
Influenza A (H1N1) 2009 MonovalentVaccine	NovartisVaccines and Diagnostics	A/California/7/2009 (H1N1) v-like virus	Inactivada	Intramuscular	Huevo
Agriflu	NovartisVaccines and Diagnostics	A/California/7/2009 NYMC X-181 (H1N1) A/Texas/50/2012 NYMCX-223 (H3N2) B/Massachusetts/2/2012	Inactivada	Intramuscular	Huevo
FLUAD	NovartisVaccines and Diagnostics	A/California/7/2009 NYMC X-181 (H1N1) A/Switzerland/9715293/2013 NIB-88 (H3N2) B/Brisbane/9/201	Inactivada	Intramuscular	Huevo
Aflunov	NovartisVaccines and Diagnostics	A/turkey/Turkey/1/05 NIBRG-23 (H5N1)	Inactivada	Intramuscular	Huevo
Foclivia	NovartisVaccines and Diagnostics	A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)	Inactivada	Intramuscular	Huevo
Vaxigrip	Sanofi Pasteur	A/California/7/2009 NYMC X-179A (H1N1) A/South Australia/55/2014 IVR-175 (H3N2) B/Phuket/3073/2013	Inactivada	Intramuscular	Huevo
Fluzone	Sanofi Pasteur	A/California/07/2009 X-179A (H1N1) A/Switzerland/9715293/2013 NIB-88 (H3N2) B/Phuket/3073/2013	Inactivada	Intramuscular	Huevo
FluzoneQuadrivalent	Sanofi Pasteur	A/California/07/2009 X-179A (H1N1) A/HongKong/4801/2014 X-263B (H3N2) B/Phuket/3073/2013 B/Brisbane/60/2008	Inactivada	Intramuscular	Huevo

Nombre Comercial	Fabricante	Virus	Columna 1	Aplicación	Producido en
FluzoneIntradermalQuadrivalent	Sanofi Pasteur	A/California/07/2009 X-179A (H1N1) A/Switzerland/9715293/2013 NIB-88 (H3N2) B/Phuket/3073/2013 B/Brisbane/60/2008	Inactivada	Intradermal	Huevo
Fluzone High-Dose	Sanofi Pasteur	A/California/07/2009 X-179A (H1N1) A/Switzerland/9715293/2013 NIB-88 (H3N2) B/Phuket/3073/2013	Inactivada	Intramuscular	Huevo
FluzoneIntradermal	Sanofi Pasteur	A/California/07/2009 X-179A (H1N1) A/Texas/50/2012 X-223A (H3N2) B/Massachusetts/02/2012	Inactivada	Intradermal	Huevo
Influenza A (H1N1) 2009 MonovalentVaccine	Sanofi-Pasteur	A/California/7/2009 (H1N1) v-like virus	Inactivada	Intramuscular	Huevo
Influenza Virus Vaccine, H5N1	Sanofi-Pasteur	H5N1 (A/Vietnam/1203/2004)	Inactivada	Intramuscular	Huevo
IDFlu	Sanofi-Pasteur	A/California/7/2009 NYMC X-179A (H1N1) A/South Australia/55/2014 IVR-175 (H3N2) B/Phuket/3073/2013	Inactivada	Intradermal	Huevo
Intanza	Sanofi-Pasteur	A/California/07/2009 X-179A (H1N1) A/Switzerland/9715293/2013 NIB-88 (H3N2) B/Phuket/3073/2013	Inactivada	Intradermal	Huevo
Influenza A (H1N1) 2009 monovalentvaccine	Medimmune	A/California/7/2009 (H1N1) v.	Viva atenuada	Intranasal	Huevo
FluMist	Medimmune	A/Bolivia/559/2013 (H1N1) A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) B/Phuket/3073/2013 B/Brisbane/60/2008	Viva atenuada	Intranasal	Huevo
Afluria	bioCSL	A/California/7/2009 NYMC X-181 (H1N1) A/South Australia/55/2014 448IVR-175 (H3N2) B/Phuket/3073/2013	Inactivada	Intramuscular	Huevo
FluaRIX	GlaxoSmithKline Biologicals	A/Christchurch/16/2010 NIB-74XP (H1N1) A/Switzerland/9715293/2013 NIB-88 (H3N2) B/Phuket/3073/2013	Inactivada	Intramuscular	Huevo



Nombre Comercial	Fabricante	Virus	Columna 1	Aplicación	Producido en
Adjupanrix	GlaxoSmithKline Biologicals	A/VietNam/1194/2004 NIBRG-14 (H5N1)	Inactivada	Intramuscular	Huevo
Influvac	Abbott	A/California/7/2009 X-181 (H1N1) A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) B/Phuket/3073/2013	Inactivada	Intramuscular	Huevo

Fuente: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM093833>; <http://www.phac-aspc.gc.ca/naci-ccni/flu-grippe-eng.php>; <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/Vacunas/Vacunas.pdf>; http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages%2Fmedicines%2Flanding%2Fepar_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d124&searchTab=&alreadyLoaded=true&isNewQuery=true&status=Authorised&status=Withdrawn&status=Suspended&status=Refused&keyword=influenza&searchType=name&taxonomyPath=Diseases.Virus+Diseases.RNA+Virus+Infections.Orthomyxoviridae+Infections&treeNumber=¤tCategory=Influenza%2C+Human&searchGenericType=generics
<https://www.medicines.org.uk/emc/>

Existen claras ventajas que han llevado a aceptar el uso de sustratos celulares en el desarrollo de vacunas contra la influenza,^{11,13,14} en la Tabla 2 se presenta un análisis comparativo. Como desventajas mayores del uso del embrión de pollo en la producción de virus de influenza, son los cambios antigénicos irreversibles que ocurren

durante la glicosilación de la hemaglutinina,¹⁵ que pueden ocasionar que una partícula viral producida en este sistema sea sustancialmente diferente a un virus silvestre transmitido de una persona infectada a otras, bajo este escenario la protección conferida por un antígeno diferente al infeccioso podría ser limitada.

Tabla 2
Comparación de la producción de la vacuna contra la gripe en embrión de pollo y en células de mamíferos MDCK

Sustrato	Ventajas	Desventajas
Embrión de pollo	Altas tasas de producción de virus	Requiere una extensa planificación anticipada
	Ausencia de replicación de agentes adventicios	Mucha mano de obra
	Buena antigenicidad	Requiere de 1–2 huevos por dosis de vacuna producida
	Incapacidad para causar tumores	Dificultad de manejo y control
	Amplia experiencia en la manufactura	Cambios antigénicos a través de los pasajes de huevo
	Conocimiento del tipo de reacciones adversas que pueden ocurrir en la población inmunizada con vacunas producidas en huevo.	La letalidad del virus H5N1 sobre los embriones Requiere niveles altos de bioseguridad
Líneas celulares de mamíferos	Suministro disponible de sustrato	Baja tasa de producción de virus
	Facilidad de capacidad de control de procesos y escalabilidad	Propagación de agentes adventicios debido a múltiples pasajes
	Reducción de los riesgos de contaminación microbiana, la eliminación del timerosal	Los cambios en el pH requisito para la replicación debido a cambios en la parte HA2
	Buena antigenicidad	Requerimiento para inmovilización, tripsina, y suero fetal de ternera
	Menor frecuencia de reacciones alérgicas	El aumento de la reactogenicidad local con la vacuna basada en MDCK

Fuente: Adaptado y modificado de Bardiya N & Bae JH. Influenza vaccines: recent advances in production technologies. Appl Microbiol Biotechnol 2005; 67: 299–305.

En varios países las campañas de vacunación contra la influenza son realizadas de manera anual, pero a pesar de los esfuerzos hechos, la eficacia de la vacuna no ha resultado ser la deseada y no ha sido capaz de prevenir los brotes de influenza. En EUA se han realizado estudios para evaluar la eficacia de las vacunas contra la influenza estacional y durante los últimos 5 años estas han tenido una eficacia promedio del 46%, siendo el valor más alto de 60% para la temporada de 2010-2011 y el más bajo en la temporada de 2014-2015 con 23%.¹⁶ Estos datos no solo aplican para EUA, diferentes países han tenido valores que entran en estos intervalos durante el mismo periodo.¹⁷⁻¹⁹ La realización de estos estudios se ha basado en estudios observacionales, los cuales posteriormente han confirmado la enfermedad con estudios de laboratorio y la aplicación de la vacuna se confirma en base a documentos que sustenten dicha aplicación.²⁰⁻²¹

Posibles causas de la baja efectividad de las vacunas

No se conoce con certeza la razón de la baja efectividad de las vacunas, una de ellas podría ser que la selección de virus para la producción de antígeno vacunal, se realiza con base en predicciones epidemiológicas (tabla1), por lo que su espectro de protección se ve limitada a los virus incluidos o a aquellos que puedan ser inactivadas por el sistema inmunitario debido a un cruce antigénico,²² esta posibilidad se incrementa al considerar los tiempos de producción de las mismas, ya que el tiempo que transcurre entre el comienzo de la producción de la vacuna y la temporada de influenza es de meses, durante ese tiempo los virus predominantes en circulación pueden llegar a cambiar, esto se vio muy marcado en el caso en la temporada 2014-2015 en EUA con una eficacia de la vacuna del 24%.²³ Durante esa temporada el virus elegido para la vacuna contra la influenza A(H3N2) fue el A/Texas/50/2012 mientras que el virus que se encontró en circulación esa temporada fue uno similar al A/Switzerland/9715293/2013, dando como resultado una baja eficacia de la vacuna.⁸ De igual manera no se puede descartar que durante estos periodos de tiempo los virus presenten pequeñas mutaciones, si estas llegasen a ocurrir en el gen de la HA o neuraminidasa, podrían ocasionar cambios antigénicos que dificulten la inactivación viral por los anticuerpos inducidos por la vacuna.^{24,25}

En años recientes se han realizado estudios en EUA sobre la eficacia de las vacunas en los cuales se ha visto que la vacunación anual tiene un factor que interfiere la protección que brinda la vacuna.^{20,26,27} Estas publicaciones analizan la eficacia de la vacuna y el estatus de vacunación,

siendo 8 temporadas el periodo más largo evaluado.²⁷ Se pudo observar que el valor más elevado de la eficacia de la vacuna fue por parte de los individuos que no habían sido vacunados en los últimos 5 años. Esta interferencia puede ser causada por varios factores, entre ellos se encuentran el efecto de Hoskins, que postula que la exposición al virus de la influenza puede activar respuestas por parte del sistema inmunitario contra el virus que causó la infección con anterioridad y no necesariamente al de la última vacuna aplicada; otro factor puede ser la posibilidad de cambios en la antigenicidad de los virus en circulación o el agotamiento del sistema inmune.²⁷ A pesar de esto, hay estudios que demuestran que la vacunación deja una protección residual durante las temporadas posteriores a la aplicación.⁹ Estudios posteriores serán necesarios para entender mejor este efecto pero no por eso la vacunación anual deja de estar recomendada, sino que sería prudente entender cómo evitar la disminución de la eficacia de las vacunas por la repetida aplicación de estas.

Deriva antigénica

Debido a la alta mutabilidad del virus de influenza, durante el transcurso del tiempo en el que los virus infectan y se transmiten entre diversos individuos, estos se exponen al sistema inmunitario de cada hospedero, lo que ocasiona una continua selección de variantes virales, fenómeno conocido como deriva antigénica, la continua variación antigénica impide que pueda utilizarse el mismo virus en la producción de la vacuna. Por lo tanto la composición de estas vacunas se adecua acorde a los cambios que se encuentran en circulación. Sin embargo varios reportes indican que la deriva antigénica del virus de la influenza H1N1 ha sido mínima desde su aparición en 2009,^{24,25,28} por lo que la OMS no ha considerado necesario cambiar la composición de la vacuna y ha seguido recomendando el uso de virus similares al A/California/7/2009 (H1N1)pdm09.²⁹⁻³⁸ No obstante, el análisis de la tasa de mutaciones aceptadas ha sido mayor en el gen de la hemaglutinina (HA), que en los genes de la neuraminidasa (NA) y nucleoproteína (NP).³⁹

Esto implica que el virus tolera mejor los cambios estructurales en la HA, es decir, las principales diferencias que se pueden encontrar entre diversos virus de la influenza estarán en esta glicoproteína. Dichos cambios le podrían facilitar al virus evadir la respuesta inmune generado contra una variante previa. Por otra parte, tal como se aprecia en la tabla 2, la mayoría de las plataformas de producción de vacunas, usan embrión de pollo como sustrato, que como previamente se mencionó, generan virus antigénicamente diferentes.^{15,40} Tomando

en consideración estas observaciones, La hipótesis sería que ambas tienen relación con la baja efectividad de protección atribuida a estas vacunas, así como la necesidad de generar nuevas vacunas anualmente. Por otra parte, en el caso de las vacunas desarrolladas en diversas líneas celulares también se ha constatado que la adaptación del virus a estos sustratos involucra cambios en la estructura antigénica de las glicoproteínas.⁴¹

Efecto de las modificaciones estructurales en los glúcidos de la Hemaglutinina

Como lo hemos mencionado, el sustrato de producción de la vacuna es un factor importante que podría impactar en la efectividad vacunal, aunque recientemente ya se están produciendo vacunas contra la influenza sobre líneas celulares, estas son de origen animal o de insecto; la comparación entre los virus producidos en uno u otro sustrato ha confirmado que también inducen diferencias estructurales en la HA, que podrían afectar su antigenicidad y capacidad de protección.⁴²⁻⁴⁴ El tipo de célula donde se reproduce el virus de influenza influye directamente con la estructura que presentarán todas aquellas proteínas que por su naturaleza sean glicosiladas, ya que dicho proceso es dependiente del tipo de enzimas presentes en uno u otro sustrato.

Una vacuna efectiva contra la influenza debería inducir en el paciente anticuerpos neutralizantes específicos contra la HA y NA del virus, ya que estas estructuras son fundamentales para el ciclo infeccioso, La HA es la glicoproteína que se encuentra en mayor abundancia en la superficie del virus, es responsable de la adhesión y penetración a la célula.⁴⁵ La HA es sintetizada por los ribosomas en el retículo endoplásmico rugoso (RER) como un polipéptido y desplazada al lumen del RER de la célula infectada.⁴⁵ Una vez finalizada la traducción la HA se encuentra en el lumen del RER donde comienza un proceso de modificación post-traducciona consistente en la N- glicosilación, que finaliza en el aparato de Golgi.^{45,46}

Dentro del lumen del RER, se transfieren N-oligosacáridos a los residuos de asparagina de la HA, esto mediante un acarreador lipídico llamado dolicol fosfato. El sitio al que se adicionan los carbohidratos debe contener una secuencia aminoacídica Asn-X-Ser/Thr, en las que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina.^{46,47,48} Sin embargo no todos los sitios de glicosilación potenciales son glicosilados.⁴⁶

Posteriormente a la adición de oligosacáridos y antes de que la HA sea enviada al aparato de Golgi, se eliminan

tres glucosas y una manosa.⁴⁶ Una vez en el Aparato de Golgi, ocurre la glicosilación terminal, donde se modifican la estructura final de los oligosacáridos constituyentes de la HA. La combinación, tamaño y complejidad dependerá del tipo particular de glicosiltransferasas presentes en la célula infectada.⁴⁶ Una vez que el proceso de maduración de la HA está terminado esta es transportada hasta la membrana celular, en donde formará parte de la membrana del virión al momento de salir de la célula.⁴⁵

Así mismo se ha observado que la glicosilación terminal es la que brinda la patogenicidad a la HA siendo este un prerrequisito para la infectividad del virus.^{43,45,47} Como se mencionó antes, el proceso de glicosilación final es dependiente del tipo de glicosiltransferasas presentes en cada tipo de célula. Por lo tanto, la estructura final de la HA será el resultado de la suma de dos factores: Uno de ellos será el plegamiento que adopte la proteína debido a la secuencia de aminoácidos, misma que estará influida por las mutaciones aceptadas en el gen la HA; El otro factor consistirá en la complejidad y variabilidad de oligosacáridos insertados en la HA a causa de las maquinaria enzimática característica de cada tipo de célula, Lo anterior explica el porqué de las diferentes formas presentadas de la HA de un mismo virus (misma secuencia de aminoácidos) propagado en diferentes sustratos celulares,⁴² en figura 1 se esquematiza este efecto.

Por otra parte, dado que una proteína homóloga tendrá mayores mutaciones conforme mayor sea su distancia evolutiva, se puede esperar que las proteínas provenientes de células de primates tengan mayor similitud a las humanas que las proteínas provenientes de otros mamíferos, por tanto podemos asumir que las variaciones en el patrón de glicosilación, se espera sean mayores conforme mayor es la distancia filogenética, entre la especie hospedera donde se produce la vacuna y la especie humana donde se transmite continuamente el virus estacional. En este sentido la glicosilación en cada sistema de producción de antígeno vacunal juega un papel central en la estructura de la hemaglutinina⁴⁹ y claramente se ha constatado las diferencias notables entre los virus producidos por un sistema y otro,^{42,50,51} también se ha demostrado que las diferencias en la glicosilación tienen consecuencias directamente relacionadas con la capacidad de protección.⁵² Por tanto podría esperarse una mejor protección entre más cercana sea la distancia filogenética entre la célula usada como sustrato de producción de la vacuna con la célula humana.

¿Qué se necesita hacer para mejorar la efectividad de las vacunas contra la influenza?

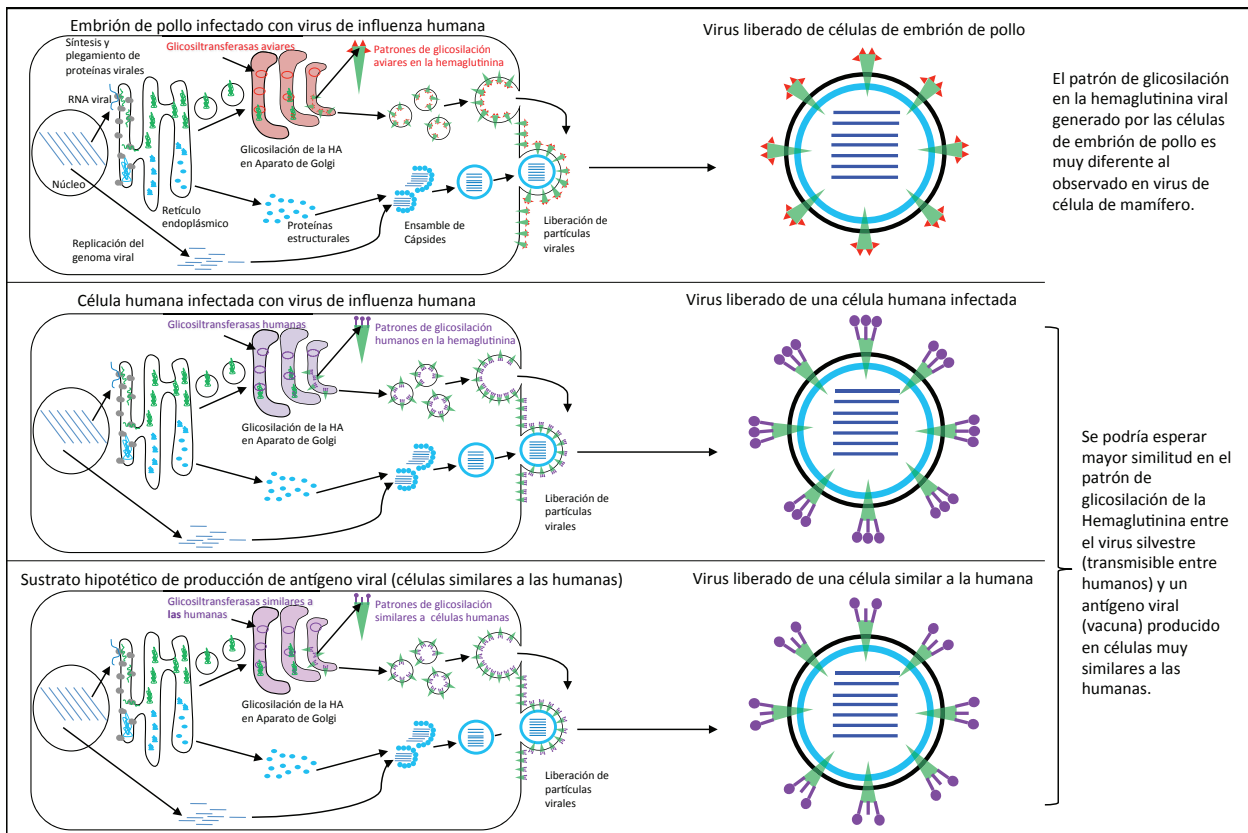
Diversas son las estrategias que se han planteado para mejorar las vacunas, algunos esfuerzos han permitido generar vacunas recombinantes en Baculovirus o Adenovirus;⁵³ también se investiga el desarrollo de partículas tipo virus, los cuales semejan la estructura viral y en la cual se exponen antígenos virales.⁵⁴ En la búsqueda de una vacuna universal contra la influenza, se han logrado generar anticuerpos que tienen la capacidad de inactivar la infectividad de un espectro amplio de serotipos de influenza y se han encontrado sitios en la Hemaglutinina (HA), indispensables para la infección viral,⁵⁵ estos sitios son clave para el desarrollo de vacunas recombinantes.

Todas estas estrategias son promisorias. La mayoría de estas vacunas se han enfocado en utilizar como antígeno principal a la HA y muchas de ellas han avanzado a la experimentación en fases clínicas, ya que han demostrado efectividad inmunogénica.^{54,56} Sin embargo, considerando

lo que hemos comentado, aún hay oportunidades de mejora, ya que una limitante de estas vacunas, es que su estructura antigénica podría ser significativamente diferente a la estructura antigénica de los virus infectivos transmitidos entre seres humanos, debido a los mencionados procesos de glicosilación ocurridos en cada sustrato de producción,⁴⁵ esto está ilustrado en la figura 1.

Considerando la distancia evolutiva entre los animales a partir de los cuales se han desarrollado los actuales antígenos producidos en células, proponemos como hipótesis que los virus más similares antigénicamente a los transmitidos entre humanos, serán aquellos desarrollados en células de primates (Línea celular VERO), y debido a esto serán también más protectores que las vacunas desarrolladas en sustratos como las células MDCK o células de Insecto. Debido a que apenas se ha iniciado el uso de estas vacunas, aun no se tienen datos acerca su efectividad real en la población inmunizada, sin embargo podremos confirmar o rechazar nuestra hipótesis en los estudios retrospectivos que se efectúen en el futuro para determinar la protección en las temporadas venideras de influenza.

Figura 1.
Efecto estimado de la replicación viral en diversas células hospederas, sobre la estructura de la hemaglutinina del virus de la influenza humana



Comparación del proceso de síntesis y ensamble de viriones en tres hospederos diferentes del virus de la influenza humana: el panel superior muestra una célula de embrión de pollo; el panel central es una célula respiratoria humana; el panel inferior, representa una célula muy similar a la célula humana usada como sustrato de producción de antígeno viral. Se espera que cada especie hospedera del virus de la influenza, genere un cambio estructural notable, aquí esquematizado por los triángulos rojos o los círculos violetas, que representan diversos patrones de glicosilación. Tal como se puede observar en la figura, los virus con estructura más similar son los ubicados en el panel central e inferior, dicha similitud es debida a la alta similitud entre las células hospederas, por tanto podemos esperar también que los sistemas responsables de la glicosilación, ubicados en el aparato de Golgi, son también muy similares. Por otra parte, un virus desarrollado en un célula filogenéticamente más distante a las otras dos, en este caso de embrión de pollo, generará patrones de glicosilación muy diferentes (aquí representado con triángulos rojos), esto debido a que las glicosiltransferasas del aparato de Golgi de esta células, son más distantes a estas enzimas presentes en las células humanas.

Fuente: Imagen diseñada por los autores.

Por otra parte, si nuestra hipótesis resulta acertada, y se logra mayor protección con vacunas desarrolladas en células de primates en comparación con las desarrolladas

en células de otros animales, podríamos esperar aún mayor efectividad si logramos desarrollar un sustrato con sistemas de glicosilación equivalentes a los presentes en las células humanas. Los sistemas actuales de edición celular mediante Crispr/Cas9 quizá permitan en poco tiempo generar células que sinteticen antígenos virales estructuralmente muy similares o idénticos a los virus de influenza silvestres (Figura 1). El desarrollo de un sustrato con la maquinaria enzimática adecuada para generar glicoproteínas idénticas a las producidas por las células humanas tendría un alcance aun mayor, ya que existen productos biotecnológicos, que aun con la tecnología de DNA recombinante, no pueden considerarse idénticos a los humanos, debido al tipo de modificación postraduccional presente en los sistemas actuales de expresión.

El impacto de usar una vacuna, elaborada con un antígeno viral estructuralmente idéntico a los virus silvestres transmitidos entre humanos, podría brindar una mejor protección dado que los anticuerpos inducidos en el paciente serían capaces de reconocer mejor a los epitopos de los virus silvestres, en comparación con los anticuerpos inducidos por antígenos con una estructura más distante (Figura2).

Figura 2.
Diferencias en el nivel de protección conferido por sustratos de diverso origen

Tipo de virus	Anticuerpos inducidos en pacientes inmunizados o infectados	Blanco específico de los anticuerpos (Hemaglutinina viral)	Capacidad de los anticuerpos para seroneutralizar un virus de influenza transmitido entre humanos	Protección esperada de diversos anticuerpos inducidos post-inmunización frente a la interacción con un virus de influenza infeccioso y del mismo serotipo.
Antígeno viral producido en embrión de pollo				Anticuerpos desarrollados previa inmunización con una vacuna desarrollada en embrión de pollo, que muestran nula o reducida capacidad de reconocimiento de epitopos con patrones de glicosilación conferidos por células humanas
Virus liberado de una célula humana infectada				Anticuerpos con buena efectividad de reconocimiento de epitopos con patrones de glicosilación conferidos por células humanas, estos fueron desarrollados previa inmunización con un antígeno producido en células similares a las humanas
Antígeno viral producido en una célula similar a la humana				Anticuerpos con buena capacidad de reconocimiento de epitopos no glicosilados, conservados entre cepas del mismo serotipo. Estos anticuerpos se produjeron exclusivamente como respuesta a la inmunización con regiones de la hemagglutinin sin glucanos, por tanto estos se inducen independientemente del sustrato de producción del antígeno viral.

La exposición de un paciente con un virus silvestre de influenza (panel central), así como la inmunización con uno vacunal ya sea desarrollado en embrión de pollo (panel superior) o desarrollado en una célula similar a la humana (panel inferior), inducirá la formación de anticuerpos contra sitios con o sin glicosilación. Dada la alta especificidad de reconocimiento de los anticuerpos, aquellos inducidos en respuesta a una inmunización con un antígeno desarrollado en embrión de pollo serán menos capaces de prevenir la infección ante una exposición a un virus silvestre del mismo serotipo, esto debido a una deficiente seroneutralización de los epitopos glicosilados. Esto sería una consecuencia de las diferencias estructurales entre el virus usado como inmunógeno (desarrollado en embrión de pollo), y el virus silvestre, es decir el transmitido entre humanos. Bajo este escenario podemos plantear como hipótesis, que los anticuerpos desarrollados en respuesta a una inmunización con antígeno producido en células similares a las humanas (panel inferior), tendrían mayor capacidad de reconocimiento y seroneutralización de ambos tipos de epitopos y por lo tanto serían más eficientes en la prevención de la infección ante la exposición al virus silvestre.

Fuente: Imagen diseñada por los autores.

Los resultados de los programas de vacunación y esfuerzos realizados para controlar los brotes de influenza estacional no han sido óptimos. En mi opinión, considero que debería redirigirse la investigación de nuevas

vacunas contra la influenza, enfocándose al desarrollo de un antígeno estructuralmente idéntico o al menos equivalente (desde el punto de vista de la respuesta de induzca en los pacientes), a los virus transmitidos entre humanos, sin embargo para alcanzar este objetivo primeramente es indispensable caracterizar los glucanos y la estructura de estos virus antes de la modificación conferida durante el subcultivo en líneas celulares. Una limitante que ha impedido lograr esta caracterización a partir de muestras colectadas de humanos, ha sido la dificultad de purificarlos, ya que suelen encontrarse en baja cantidad y acompañados de agentes contaminantes. Se debe trabajar en forma multidisciplinaria para alcanzar este objetivo que será un punto de referencia en cuanto al efecto real a nivel estructural que confiere cada sustrato en la producción de una vacuna.

Correspondencia:

Jorge Bravo Madrigal

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Normalistas 800. Colinas de la Normal. Guadalajara Jalisco, México. C.P. 44270
Tel 3345 5200 ext 1322.
jbravo@ciatej.mx

Referencias bibliográficas

- Hilleman MR. *Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control*. *Vaccine* 2002;20:3068-3087.
- Secretaría de Salud. Vigilancia Epidemiológica Semana 52, 2009. *Epidemiología*. 2009. CENEVECE. SECRETARIA DE SALUD, MEXICO.
- World Health Organization. Influenza (Seasonal) Fact sheet N° 211 [Internet]. 2014. [Consultado Noviembre 2015]. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
- World Health Organization. Vaccines [Internet]. [Consultado Noviembre 2015]. Disponible en <http://www.who.int/influenza/vaccines/en/>
- World Health Organization. Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) [Internet]. [Consultado Noviembre 2015]. Disponible en http://www.who.int/csr/disease/OP_GISRS_FINAL.pdf
- Esposito S, Montinaro V, Groppali E, Tenconi R, Semino M, Principi N. *Live attenuated intranasal influenza vaccine*. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2012;8(1):76-80.
- Belshe RB, Edwards KM, Vesikari T, Black SV, Walker RE, Hultquist M, et al. *Live Attenuated versus Inactivated Influenza Vaccine in Infants and Young Children*. *N Engl J Med* 2007;356(7):685-696.
- Pavia AT. *Influenza Vaccine Effectiveness: Mysteries, Enigmas, and a Few Clues*. *J Infect Dis* 2016;doi: 10.1093/infdis/jiv579
- Gaglani M, Pruszynski J, Murthy K, Clipper L, Robertson A, Reis M, et al. *Influenza vaccine effectiveness against the 2009 pandemic A(H1N1) virus differed by vaccine-type during 2013-14 in the United States*. *J Infect Dis* 2015;doi:10.1093/infdis/jiv577.
- Rimmelzwaan GF, Osterhaust AD. *Influenza vaccines: new developments*. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1:491-496.

11. Minor PD, Engelhardt OG, Wood JM, Robertson JS, Blayer S, Colegate T, et al. *Current challenges in implementing cell-derived influenza vaccines: implications for production and regulation, July 2007, NIBSC, Potters Bar, UK.* *Vaccine* 2009;27:2907–2913. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.02.064.
12. World Health Organization. Cell Culture Influenza Vaccines: The current status (7th WHO Meeting on Influenza Vaccine Technology Transfer to Developing Country Manufacturers) [Internet]. [Consultado Marzo 2016]. Disponible en http://www.who.int/phi/DAY2_20_VanDenBosch_PM_Dubai2014.pdf
13. Tree JA, Richardson C, Fooks AR, Clegg JC, Looby D. *Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus a vaccine strains.* *Vaccine* 2001;19:3444–3450.
14. Youil R, Su Q, Toner TJ, Szymkowiak C, Kwan Ws, Rubin B, et al. *Comparative study of influenza virus replication in Vero and MDCK cell lines.* *J Virol Methods* 2004;120:23–31.
15. Glezen WP. *Cell-culture-derived influenza vaccine production.* *Lancet* 2011;377: 698-700.
16. World Health Organization. Seasonal Influenza Vaccine Effectiveness, 2005–2015 [Internet]. [Consultado Noviembre 2015]. Disponible en <http://www.cdc.gov/flu/professionals/vaccination/effectiveness-studies.htm>
17. Kissling E, Valenciano M, Cohen JM, Oroszi B, Barret A-S, Rizzo C, et al. *I-MOVE Multi-Centre Case Control Study 2010–11: Overall and Stratified Estimates of Influenza Vaccine Effectiveness in Europe.* *PLoS One* 2011; 6(11): e27622.
18. Fielding JE, Grant KA, Tran T, Kelly HA. *Moderate influenza vaccine effectiveness in Victoria, Australia, 2011.* *Euro Surveill* 2012;17(11):pii=20115.
19. Skowronski DM, Janjua NZ, De Serres G, Winter AL, Dickinson JA, Gardy JL, et al. *A Sentinel Platform to Evaluate Influenza Vaccine Effectiveness and New Variant Circulation, Canada 2010–2011 Season.* *Clin Infect Dis* 2012;55(3):332–342.
20. Ohmit SE, Thompson MG, Petrie JG, Thaker SN, Jackson ML, Belongia EA, et al. *Influenza Vaccine Effectiveness in the 2011–2012 Season: Protection Against Each Circulating Virus and the Effect of Prior Vaccination on Estimates.* *Clin Infect Dis* 2014;58(3):319–327.
21. McLean HQ, Thompson MG, Sundaram ME, Kieke BA, Gaglani M, Murthy K, et al. *Influenza Vaccine Effectiveness in the United States During 2012–2013: Variable Protection by Age and Virus Type.* *J Infect Dis* 2015;211:1529–1540.
22. Lambert LC, Fauci AS. *Influenza vaccines for the future.* *N Engl J Med* 2010;363:2036–2044.
23. World Health Organization. Protection from Flu Vaccination Reduced this Season [Internet]. [Consultado Noviembre 2015]. Disponible en <http://www.cdc.gov/media/releases/2015/p0115-flu-vaccination.html>
24. Padilla C, Condori F, Huaranga M, Marcos P, Rojas N, Gutierrez V, et al. *Full Genome Analysis of Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Isolated from Peru, 2013.* *Genome Announc* 2014;2(2): e00191-14.
25. Dakhave M, Khirwale A, Patil K, Kadam A, Potdar V. *Whole-Genome Sequence Analysis of Postpandemic Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Isolates from India.* *Genome Announc* 2013;1(5):e00727-13.
26. Sullivan S & Kelly H. *Stratified Estimates of Influenza Vaccine Effectiveness by Prior Vaccination: Caution Required.* *Clin Infect Dis* 2013;57(3):474-476.
27. McLean HQ, Thompson MG, Sundaram ME, Meece JK, McClure ML, Fiedrich TC, et al. *Impact of Repeated Vaccination on Vaccine Effectiveness Against Influenza A(H3N2) and B During 8 Seasons.* *Clin Infect Dis* 2014;59:1375–1385.
28. Petri J, Polina M, Hannimari K-K, Valkonen M, Kantele A, Ikonen N, et al. *Complete Genome Sequences of Influenza A/H1N1 Strains Isolated from Patients during the 2013–2014 Epidemic Season in Finland.* *Genome Announc* 2015;3(2):e01523-14.
29. World Health Organization. Recommended viruses for influenza vaccines for use in the 2010–2011 northern hemisphere influenza season. [Internet]. [Consultado Noviembre 2015]. Disponible en http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/2010_11north/en/
30. World Health Organization. Recommended viruses for influenza vaccines for use in the 2011–2012 northern hemisphere influenza season [Internet]. [Consultado Noviembre 2015]. Disponible en http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/2011_12north/en/
31. World Health Organization. Recommended viruses for influenza vaccines for use in the 2012–2013 northern hemisphere influenza season [Internet]. [Consultado Noviembre 2015]. Disponible en http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2012_13_north/en/
32. World Health Organization. Recommended viruses for influenza vaccines for use in the 2013–14 northern hemisphere influenza season [Internet]. [Consultado Noviembre 2015]. Disponible en http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2013_14_north/en/
33. World Health Organization. Recommended viruses for influenza vaccines for use in the 2014–2015 northern hemisphere influenza season [Internet]. [Consultado Noviembre 2015]. Disponible en http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2014_15_north/en/
34. World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2011 southern hemisphere influenza season [Internet]. [Consultado Noviembre 2015]. Disponible en <http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/2011south/en/>
35. World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2012 southern hemisphere influenza season [Internet]. [Consultado Noviembre 2015]. Disponible en <http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2012south/en/>
36. World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2013 southern hemisphere influenza season [Internet]. [Consultado Noviembre 2015]. Disponible en http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2013_south/en/

37. World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2014 southern hemisphere influenza season [Internet]. [Consultado Noviembre 2015]. Disponible en http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2014_south/en/
38. World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2015 southern hemisphere influenza season [Internet]. [Consultado Noviembre de 2015]. Disponible en http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2015_south/en/
39. Klein EY, Serohijos AW, Choi JM, Shakhnovich EI, Pekosz A. *Influenza A H1N1 pandemic strain evolution--divergence and the potential for antigenic drift variants*. PLoS One 2014;9:e93632.
40. Govorkova EA, Kodihalli S, Alymova IV, Fanget B, Webster RG. *Growth and immunogenicity of influenza viruses cultivated in Vero or MDCK cells and in embryonated chicken eggs*. Dev Biol Stand 1999;98:39-51; discussion 73-34.
41. Roedig JV, Rapp E, Hoper D, Genzel Y, Reichl U. *Impact of host cell line adaptation on quasispecies composition and glycosylation of influenza A virus hemagglutinin*. PLoS One 2011;6:e27989.
42. An Y, Rininger JA, Jarvis DL, Jing X, Ye Z, Aumiller JJ, et al. *Comparative Glycomics Analysis of Influenza Hemagglutinin (H5N1) Produced in Vaccine Relevant Cell Platforms*. J Proteome Res 2013;12:3707-3720.
43. Zhang X, Chen S, Jiang Y, Huang J, Yang D, Zhu J, et al. *Hemagglutinin glycosylation modulates the pathogenicity and antigenicity of the H5N1 avian influenza virus*. Vet. Microbiol 2015;175:244-256.
44. Gambaryan AS, Marinina VP, Tuzikov AB, Bovin NV, Rudneva IA, Sinitsyn BV, et al. *Effects of Host-Dependent Glycosylation of Hemagglutinin on Receptor-Binding Properties of H1 N1 Human Influenza A Virus Grown in MDCK Cells and in Embryonated Eggs*. Virology 1998;247:170-177.
45. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, et al. *Fields Virology*. 4a ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins;2001.
46. Stryer L, Berg J, Tymoczko J. *Bioquímica con aplicaciones clínicas*. 7a ed. España: Reverte; 2013.
47. Sun X, Jayaraman A, Maniprasad P, Raman R, Houser KV, Pappas C, et al. *N-Linked Glycosylation of the Hemagglutinin Protein Influences Virulence and Antigenicity of the 1918 Pandemic and Seasonal H1N1 Influenza A Viruses*. VirolJ 2013;87(15):8756-8766.
48. Helenius A, Aebi M. *Intracellular functions of N-linked glycans*. Science 2001;291:2364-2369.
49. Butler M, Spearman M. *The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering*. Curr Opin Biotechnol 2014;30:107-112.
50. Romanova J, Katinger D, Ferko B, Voglauer R, Mochalova L, Bovin N, et al. *Distinct host range of influenza H3N2 virus isolates in Vero and MDCK cells is determined by cell specific glycosylation pattern*. Virology 2003;307:90-97.
51. Hutter J, Rodig JV, Hoper D, Seeberger PH, Reichl U, Rapp E, et al. *Toward animal cell culture-based influenza vaccine design: viral hemagglutinin N-glycosylation markedly impacts immunogenicity*. J Immunol 2013;190: 220-230.
52. Schwarzer J, Rapp E, Hennig R, Genzel Y, Jordan I, Sandig V, et al. *Glycan analysis in cell culture-based influenza vaccine production: influence of host cell line and virus strain on the glycosylation pattern of viral hemagglutinin*. Vaccine 2009;27:4325-4336.
53. Prabakaran M, Madhan S, Prabhu N, Qiang J, Kwang J. *Gastrointestinal delivery of baculovirus displaying influenza virus hemagglutinin protects mice against heterologous H5N1 infection*. J Virol 2010;84:3201-3209.
54. Low JG, Lee LS, Ooi EE, Ethirajulu K, Yeo P, Matter A, et al. *Safety and immunogenicity of a virus-like particle pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine: results from a double-blinded, randomized Phase I clinical trial in healthy Asian volunteers*. Vaccine 2014;32:5041-5048.
55. Brandenburg B, Koudstaal W, Goudsmit J, Klaren V, Tang C, Bujny MV, et al. *Mechanisms of hemagglutinin targeted influenza virus neutralization*. PLoS One 2013;8:e80034.
56. Schuind A, Segall N, Drame M, Innis BL. *Immunogenicity and safety of an EB66 cell-culture-derived A/Indonesia/5/2005 (H5N1)-AS03-adjuvanted influenza vaccine: Phase-I randomized trial*. J Infect Dis 2015;212:531-541.