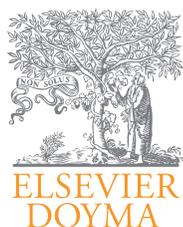




Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.



Vacunas

www.elsevier.es/vac



Artículo especial

Las vacunas de la gripe basadas en las partículas *virus-like* obtenidas mediante sistemas de expresión génica en células de insectos

J. Reina*

Unidad de Virología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca, Baleares, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 06/02/2012

Aceptado el 07/05/2012

Palabras clave:

Virus gripales

Partículas *virus-like*

Vacuna antigripal

Vacuna FluBock

R E S U M E N

Las partículas designadas como *virus-like* (VLP) son complejos proteicos multiméricos que se asemejan a la organización externa de los virus salvajes, pero carecen de genoma viral. Por ello, los VLP constituyen una estrategia segura y efectiva para la inducción de anticuerpos neutralizantes contra las proteínas de superficie. Recientemente se han desarrollado VLP de los virus gripales como una nueva generación de candidatos vacunales derivados de cultivos celulares, no obtenidos de huevos. FluBock es una vacuna recombinante trivalente (rHA) que se ha obtenido en cultivo de células de insectos utilizando el sistema de expresión génica del baculovirus. Esta vacuna proteica altamente purificada contiene el triple (135 µg) de la concentración antigénica clásica, se tolera bien, induce una intensa inmunogenicidad y una respuesta duradera de anticuerpos y proporciona una protección cruzada contra las derivas antigénicas de los virus gripales.

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Influenza vaccines based on virus-like particles (VLPs) manufactured in cell insect genetic expression systems

A B S T R A C T

Virus-like particles (VLPs) are multimeric protein complexes mimicking the organization of native viruses but lack the viral genome. VLPs therefore constitute a safe and effective approach for the induction of neutralizing antibodies to surface proteins. Influenza VLPs have recently been developed as a new generation of non-egg based cell culture-derived vaccine candidates against influenza infection. FluBock, a recombinant trivalent hemagglutinin (rHA) vaccine produced in insect cell culture using the baculovirus expression system, provides an attractive alternative to classical inactivated influenza vaccines. The highly purified protein vaccine, administered with a three-fold higher

Keywords:

Influenza viruses

Virus-like particles

Influenza vaccines

FluBock vaccine

*Autor para correspondencia. Unidad de Virología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases, Ctra. de Valldemossa 79, 07010 Palma de Mallorca, Baleares, España.

Correo electrónico: jorge.reina@ssib.es (J. Reina).

antigen content (135 μ g), is well tolerated and results in stronger immunogenicity, a long lasting immune response and provides cross-protection against drift influenza viruses.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Actualmente la gripe es una de las principales enfermedades infecciosas de etiología viral y supone un importante problema de salud pública. Las epidemias estacionales y las pandemias ocasionales determinan un incremento significativo de las afecciones respiratorias que originan problemas de saturación y aumento de los ingresos hospitalarios.

Debido a que la gripe es una zoonosis —su reservorio natural son las aves migratorias salvajes—, nunca será posible suprimirla por completo. Por ello, la única y mejor forma de prevenir la enfermedad, especialmente en los designados como grupos de riesgo, es a través de los programas de vacunación^{1,2}.

Con los años han ido mejorando los sistemas y los métodos de preparación y elaboración de vacunas antigripales; sin embargo, la pandemia de 2009 demostró la existencia de serias dificultades para obtener una nueva vacuna antigripal específica para un subtipo nuevo³. La utilización de los huevos de pollo para obtener la vacuna requiere un mínimo de 4-6 meses en todo el proceso de elaboración, probablemente demasiado largo frente a una pandemia de alta patogenicidad. Para obviar este problema se están elaborando vacunas antigripales basadas en cultivos celulares, que acortan el periodo de producción y evitan las posibles alergias a las proteínas del huevo^{4,5}.

En los últimos años se ha iniciado una nueva tecnología vacunal basada en las llamadas *virus-like particles* (VLP). Las VLP son complejos proteicos multiméricos que se asemejan en la organización y la conformación a los virus naturales pero sin la presencia del genoma viral, lo cual las hace candidatos óptimos para la elaboración de vacunas totalmente seguras. El tamaño de las VLP oscila entre 22 y 200 nm, lo que se corresponde generalmente con el tamaño del propio virus, y además se mantiene la morfología original dependiendo del tipo de proteínas que se incorporen^{6,7}.

Este tipo de vacunas formadas por VLP ya existen y se ha demostrado su eficacia clínica contra los virus de la hepatitis E, Norwalk, rotavirus, coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y especialmente papilomavirus. En este último caso ya se comercializan dos vacunas con tecnología de VLP que se están utilizando, previa aprobación por la *Food and Drug Administration* (FDA) y ECDC, en los programas de vacunación infantil contra el papilomavirus humano⁸.

Por lo tanto, las VLP son un gran paso para la elaboración de nuevas vacunas, ya que su naturaleza repetitiva y la elevada densidad de los epítomos determinan una estimulación intensa del sistema inmunitario del huésped^{6,7}. Aunque contra la gripe hay gran cantidad y variedad de formas y presentaciones vacunales, el desarrollo de la tecnología de las VLP podría ser un paso adelante en la obtención rápida de grandes

cantidades de vacunas a bajo precio y en un tiempo mucho más corto que con la metodología convencional.

Ventajas del sistema de expresión génica en insectos

En comparación con el cultivo en embriones de pollo y en líneas celulares, los sistemas de expresión génica en insectos presentan las siguientes ventajas biológicas y prácticas: a) los antígenos rHA se producen en procesos de biofermentación a gran escala, con lo que se obtiene una vacuna de base proteica en un contexto de baja endotoxicidad; b) no precisa de la adaptación y selección de las cepas gripales en los huevos embrionados y permite elaborar vacunas con cepas de elevada patogenicidad aviar; c) el proceso de clonación e inserción genética es rápido y eficiente y permite acortar el tiempo de elaboración vacunal hasta un máximo de 2 meses; d) esta tecnología no precisa de instalaciones de alta bioseguridad, ya que no se trabaja con los virus gripales activos, lo cual comporta una producción vacunal más rápida y a menor coste, incluso con la aparición de cepas antigénicamente nuevas o de alta patogenicidad; e) las células de los insectos crecen sin la necesidad de añadir suero bovino fetal u otros productos biológicos procedentes de mamíferos, lo que reduce significativamente la posibilidad de introducir sustancias o agentes biológicos durante el proceso de elaboración; la distancia genética entre los insectos y los vertebrados es lo suficientemente amplia para reducir enormemente la probabilidad de que las células de los insectos sirvan de huéspedes para los virus de los vertebrados y la probabilidad de que los vertebrados sirvan de huéspedes para los virus propios de los insectos, y f) los procedimientos de purificación proteica de los rHA no conllevan el empleo de elementos químicos o físicos que puedan desnaturalizar o alterar la actividad antigénica y/o inmunogénica de los principios activos, lo que además determina menor riesgo de toxicidad por residuos químicos. Además, una de las principales ventajas clínicas es que este tipo de vacunas no contiene ovoalbúmina u otras proteínas de huevo, lo cual permite su utilización en personas con alergias a este tipo de productos^{6,7,9-11}.

Una de las desventajas iniciales, ya superada, era el proceso de glucosilación final de las proteínas, ya que las células de los insectos utilizan la manosa como residuo glucídico, cuando lo ideal para el virus de la gripe es los residuos de ácido siálico⁷. La producción de vacunas gripales con VLP en células de insectos, a través de los sistemas de expresión con baculovirus recombinantes, ofrece elevados niveles de productividad, y se obtiene una media de 5-10 mg de VLP purificados en 1 l de cultivo celular, que es una cantidad equivalente a la que se obtiene actualmente con 1 l de fluido alantoideo derivado de los huevos embrionados (método clá-

sico de obtención vacunal)^{6,7}. Además, como los cultivos celulares de insectos se mantienen en un medio líquido en suspensión, se puede aplicar la tecnología de los biorreactores a gran escala para la obtención de cantidades ilimitadas de estas células hospedadoras.

Estudios experimentales

En el caso del virus de la gripe, las VLP se ensamblan en el interior de las células de insectos y se liberan al medio de cultivo como si fueran partículas completas tras un proceso de infección convencional; de este modo, y dependiendo del gen que se les haya introducido previamente, las VLP expresan y exponen en su superficie las glucoproteínas específicas del virus gripal estudiado. Las glucoproteínas virales en las VLP se presentan en su conformación tridimensional nativa y sin las modificaciones que podrían producirse con los elementos químicos o físicos que se utilizan en los procesos de inactivación vacunal. Se han obtenido VLP gripales infectando células de insecto con los cuatro genes estructurales HA, NA, M1 y M2 y con sólo los genes HA, NA y M1 a través del baculovirus¹²⁻¹⁴.

La inmunidad contra la gripe en los seres humanos es un fenómeno multifactorial, de modo que todavía no tenemos suficiente conocimiento experimental sobre el papel de la virulencia, la inmunidad innata, la inmunidad humoral y local (pulmonar) y la inmunidad celular¹⁵. Una ventaja de las VLP es que carecen de genoma y, por lo tanto, de actividad replicativa, pero presentan un comportamiento inmunológico idéntico que los virus gripales naturales. Las VLP tienen la capacidad de activar los procesos de presentación antigénica tanto endógenos como exógenos, lo que permite la presentación de los péptidos virales a las moléculas MHC de clases I y II^{10,16}. Estas vacunas multiepitópicas son mucho más eficaces que las de un solo componente en la inducción de las respuestas inmunitarias, lo que evita el fenómeno del escape de cepas mutantes. Las proteínas de las VLP son procesadas y presentadas por las moléculas MHC de clase I, lo que promueve su contacto con los linfocitos T. Además, las VLP fijan anticuerpos, lo que permite que las capturen los macrófagos y fagocitos a través de los fragmentos Fc y se incremente la activación de las moléculas MHC de clase II^{6,7}. Los antígenos expresados en su conformación tridimensional original inducen una mayor y mejor respuesta inmunitaria que las mismas proteínas en sus formas inactivadas. Debe tenerse presente que la mayoría de los anticuerpos neutralizantes, los verdaderamente efectivos contra los virus gripales, se inducen exclusivamente contra los epítomos conformacionales sólo presentes en las estructuras con envolturas, pero además algunos epítomos sólo son expuestos al exterior, contacto con el sistema inmunitario, después de unirse a los receptores de las células huésped^{1,13}.

Mientras que la eficacia de las vacunas con VLP se ha demostrado en diferentes modelos animales, su eficacia inmunogénica y protectora contra la gripe todavía no se había demostrado en los animales envejecidos. La edad determina una disminución de la calidad y la cantidad de la respuesta inmunitaria a los diferentes antígenos exógenos. Los estudios

animales realizados por Wen et al¹⁷ han demostrado claramente la eficacia de la vacuna antigripal con VLP en los ratones de más edad. Estos ratones no sólo resistieron la infección gripal, sino que su morbimortalidad se redujo significativamente, y se ha observado que la tasa de anticuerpos protectores se mantenía durante lapsos > 6 meses^{16,17}. La elevada capacidad de las VLP para la inducción y la presentación antigénica a las células dendríticas parece ser el principal mecanismo de eficacia inmunológica. Este tipo de células, a diferencia de los linfocitos *natural killer* y citotóxicos, parece que no pierde su eficacia con la edad de los animales estudiados, y probablemente tampoco la perdería en el ser humano¹⁵. Además, la inmunidad protectora obtenida no precisa incrementar la cantidad antigénica de la vacuna. La concentración de anticuerpos fue comparable a la obtenida en animales más jóvenes y siempre ligeramente superiores a las obtenidas con la aplicación de la vacuna antigripal inactivada¹⁷. Estos resultados en animales hacen pensar en una respuesta protectora similar al aplicarlos a personas mayores de 65 años, en quienes las respuestas inmunitarias son deficitarias y se requiere mayor carga antigénica o el empleo de adyuvantes para alcanzar tasas protectoras de efectividad demostrable.

Galarza et al¹⁸ fueron los primeros que comunicaron el efecto protector contra la gripe tras la inmunización intramuscular en ratones con las VLP que contenían los genes M1 y HA derivados de la cepa A/Udorn 72 (H3N2). Las tasas de anticuerpos inducidas eran significativamente superiores a las obtenidas con las vacunas atenuadas y/o inactivadas. Además, se observó que se obtenía protección tanto contra el virus donante (homólogo) como contra subtipos relacionados (heterólogo), lo que amplía el espectro de la eficacia vacunal^{6,7,18}.

La primera vacuna gripal con tecnología de VLP

Actualmente la empresa estadounidense *Protein Sciences Corporation* ha desarrollado la primera vacuna antigripal con la tecnología de VLP (FluBok). Esta vacuna es una recombinante trivalente que contiene 45 µg de cada una de las hemaglutininas virales (rHA) (total, 135 µg), el triple del contenido antigénico de las vacunas inactivadas (45 µg). La elevada carga antigénica tiene como objetivo la inducción de protección cruzada inmunológica contra otros subtipos gripales y obtener inmunidad e inmunogenicidad de mayor duración tras la aplicación¹⁹⁻²¹.

Las tres proteínas antigénicas se obtienen en cultivos celulares no transformantes y no tumorigénicos de origen invertebrado, insectos (expressSF+), capaces de crecer en un medio sin necesidad de adicionar suero bovino fetal. La línea celular deriva del cultivo Sf9 procedente de *Spodoptera frugiperda*. Cada una de las proteínas pertenecientes a la hemaglutinina gripal se expresa en esta línea celular empleando un vector viral (baculovirus *Autographa californica*, *Nucleopolyhedrovirus*)¹⁹⁻²¹.

En los últimos años se han realizado cuatro estudios clínicos aleatorizados de comparación con una vacuna inactivada convencional (PSC01, PSC03, PSC04 y PSC06) para demostrar la seguridad, la eficacia y la capacidad protectora de esta nueva

Tabla 1 – Ensayos clínicos con la vacuna FluBok. Respuesta posvacunal en anticuerpos (inhibición de la hemaglutinación)

| Estudio | PSC01 | PSC04 | PSC06 | PSC03 |
|----------------|-----------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| Edad (años) | 18-49 | 18-49 | 50-64 | > 65 |
| A (H1N1) | A/New Caledonia | A/Solomon Islands | A/Solomon Islands | A/New Caledonia |
| Seroprotección | 87% | 98% | 96% | 95% |
| Seroconversión | 60% | 78% | 72% | 43% |
| A (H3N2) | A/Wyoming | A/Wyoming | A/Wyoming | A/Wyoming |
| Seroprotección | 100% | 96% | 85% | 97% |
| Seroconversión | 77% | 81% | 61% | 78% |
| B | B/Jiangsu | B/Malaysia | B/Malaysia | B/Ohio |
| Seroprotección | 65% | 96% | 93% | 92% |
| Seroconversión | 63% | 53% | 41% | 29% |

Modificado de Cox et al²¹.

vacunal antigripal²²⁻²⁷. En estos estudios se ha analizado a 6.577 adultos con edad > 18 años; se ha observado que los efectos adversos locales más comunicados son el dolor en el punto de inyección (37%), enrojecimiento (4%) y edema (3%), y los sistémicos son cefaleas (15%), fatiga (15%), mialgias (10%), náuseas (6%) y artralgias (4%); sin embargo, estos efectos y otros menores no presentaron una incidencia significativamente superior a la descrita con la vacuna convencional. Por lo tanto, se puede afirmar que este nuevo tipo de vacuna es como mínimo igual de segura y presenta los mismos efectos adversos o colaterales que las demás vacunas inactivadas actualmente comercializadas^{22,23}.

Los estudios de inmunogenicidad basados en la inducción de anticuerpos específicos, determinados por la técnica de inhibición de la hemaglutinación (IH), calculados mediante la seroprotección (título de IH > 1/40) y la seroconversión (incremento en 4 títulos entre el periodo prevacunal y el posvacunal), han mostrado valores elevados en esos cuatro ensayos clínicos (tabla 1). Aunque en cada uno de ellos la vacuna se ha enfrentado a cepas gripales antigénicamente distintas, las tasas de seroprotección obtenidas oscilan entre el 63 y el 100% y las de seroconversión, entre el 29 y el 81%; como era de esperar, se obtienen peores resultados contra los virus gripales tipo B^{21,22}.

Los estudios realizados por King et al²⁴ en la población infantil de 6-35 meses han demostrado que esta vacuna es segura y bien tolerada por este grupo etario, comparada con vacuna trivalente inactivada, aunque presenta un porcentaje algo mayor de efectos locales. Sin embargo, los estudios de inmunogenicidad han mostrado una menor respuesta que con la vacuna convencional; la mayoría de los niños vacunados no presentaban títulos protectores ni seroconversión tras el proceso vacunal. Por lo tanto, por ahora no se debería recomendar esta nueva vacuna para los niños menores de 35 meses²⁴.

Los ensayos clínicos realizados en la población de 50-64 años han mostrado que FluBok es igualmente una vacuna segura e inmunogénica, con resultados nunca inferiores a los obtenidos con la vacuna convencional. Cabe destacar que se ha observado que la respuesta serológica al subtipo gripal A (H3N2) es significativamente superior a la obtenida con la vacuna convencional, además de detectarse respuestas

Tabla 2 – Ensayos clínicos con la vacuna FluBock. Respuesta posvacunal en anticuerpos (inhibición de la hemaglutinación)

| | A/Solomon Island | A/Wisconsin | B/Malaysia |
|------------|------------------|-------------|------------|
| FluBok | 78% | 81% | 52% |
| FluBok-Vp | 56% | 57% | 22% |
| FluBok-NVp | 83% | 87% | 60% |

NVp: previamente no vacunados; Vp: previamente vacunados. Modificado de Treanor et al²².

inmunológicas heterotípicas dirigidas contra otros subtipos no incluidos en la vacuna²⁶.

Finalmente, los ensayos realizados en mayores de 65 años han confirmado la mayoría de los resultados previos, es decir, que esta vacuna es bien tolerada y segura para la población anciana. Las tasas de seroconversión en esta población fueron superiores a las obtenidas por la vacuna convencional contra los virus gripales A (H3N2) y A (H1N1), pero significativamente inferiores contra el virus gripal tipo B (tabla 2). Este aspecto se debe tomar con cierta precaución, ya que los antígenos utilizados en las dos vacunas no eran exactamente los mismos; por lo tanto, se debería volver a ensayar la respuesta contra la gripe B²⁵.

Los análisis realizados con la cepa gripal pandémica A (H1N1) 2009 han mostrado, en los modelos experimentales en ratones, que en estos animales se induce una importante respuesta inmunitaria que los protege de la infección experimental posterior²⁸. En el estudio realizado por López-Macías et al²⁹ con la cepa pandémica y los VLP en población humana, se observa que se produjo una robusta respuesta inmunitaria (anticuerpos protectores) tras una sola dosis vacunal, con unas tasas de seroprotección (título > 1/40) del 82 al 92% y una seroconversión del 64 al 85% de la población vacunada (18-64 años).

Con todos estos datos de seguridad y eficacia clínica, la vacuna FluBok fue designada como *Fast Track* por la FDA en diciembre de 2006, y los laboratorios *Protein Sciences* obtuvie-

ron la *Biological License Application* en abril de 2008, y esperaban obtener de la FDA la aprobación definitiva para su comercialización en 2009. Sin embargo, a finales de ese año la FDA no dio el visto bueno definitivo a esta nueva vacuna, salvo en el grupo de 18-49 años, debido a los datos insuficientes sobre seguridad y eficacia, aunque avalan la tecnología de las VLP y la posibilidad de obtener grandes cantidades vacunales en corto plazo³⁰.

B I B L I O G R A F Í A

- Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. En: Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields virology*. 5.^a ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2007. p. 1691-740.
- Belshe RB. Influenza as a zoonosis: how likely is a pandemic? *Lancet*. 1998;351:460-1.
- Wright PF. Vaccine preparedness: are we ready for the next influenza pandemic? *N Engl J Med*. 2008;358:2540-3.
- Reisinger KS, Block SL, Izu A, Groth N, Holmes SJ. Subunit influenza vaccines produced from cell culture or in embryonated chicken eggs: comparison of safety, reactogenicity and immunogenicity. *J Infect Dis*. 2009;200:849-57.
- Neuzil KM, Bright RA. Influenza vaccine manufacture: keeping up with change. *J Infect Dis*. 2009;200:835-7.
- Kang SM, Song JM, Quan FS, Compans RW. Influenza vaccines based on virus-like particles. *Virus Res*. 2009;143:140-6.
- Vicente T, Roldao A, Peixoto C, Carrondo MJT, Alves PM. Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. *J Invertebr Pathol*. 2011;107:S42-8.
- Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, et al. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;369:2161-70.
- Holtz KM, Anderson DK, Cox MM. Production of a recombinant influenza vaccine using the baculovirus expression vector system. *Bioprocess J*. 2003;2:25-32.
- Cox MM, Anderson DK. Production of a novel influenza vaccine using insect cells: protection against drifted strains. *Influenza Other Respir Viruses*. 2007;1:35-40.
- Cox MM, Hashimoto Y. A fast track influenza virus vaccine produced in insect cells. *J Invertebr Pathol*. 2011;107:S31-41.
- Song JM, Wang BZ, Park KM, Van Rooijern N, Quan FS, Kim MC, et al. Influenza virus-like particles containing M2 induce broadly cross protective immunity. *PloS One*. 2011;6:e14538.
- Pushko P, Pearce MB, Ahmad A, Tretyakova I, Smith G, Belsler JA, et al. Influenza virus-like particle can accommodate multiple subtypes of hemagglutinin and protect from multiple influenza types and subtypes. *Vaccine*. 2011;29:5911-8.
- Gavrilov V, Orekov T, Alabanza C, Porika U, Jiang H, Connolly K, et al. Influenza virus-like particles as new tool for vaccine immunogenicity testing: validation of a neuraminidase neutralizing antibody assay. *J Virol Meth*. 2011;173:364-73.
- Reina J. El papel de la inmunidad innata en las infecciones gripales humanas. *Vacunas*. 2010;11:25-9.
- Bright RA, Carter DM, Daniluk S, Toapanta FR, Ahmad A, Gavrilov V, et al. Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin. *Vaccine*. 2007;25:3871-8.
- Wen Z, Ye L, Gao Y, Pan L, Dong K, Bu Z, et al. Immunization by influenza virus-like particles protects age mice against lethal influenza virus challenge. *Antiviral Res*. 2009;84:215-24.
- Galarza JM, Latham T, Cupo A. Virus-like particle (VLP) vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge. *Viral Immunol*. 2005;18:244-51.
- Cox MM, Patriarca PA, Treanor JJ. FluBok, a recombinant hemagglutinin influenza vaccine. *Influenza Other Respir Viruses*. 2008;2:201-9.
- Huber VC, McCullers JA. FluBok, a recombinant influenza vaccine. *Curr Opin Mol Ther*. 2008;10:75-85.
- Cox MM, Hollister JR. FluBok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. *Biologicals*. 2009;37:182-9.
- Treanor JJ, Schiff GM, Couch RB, Cate TR, Brady RC, Hay CM, 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.
- Treanor JJ, Schiff GM, Hayden FG, Brady RC, Hay CM, Meyer AL, et al. Safety and immunogenicity of a baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2007;297:1577-82.
- King JC, Cox MM, Reisinger K, Hedrick J, Graham I, Patriarca P. Evaluation of the safety, reactogenicity and immunogenicity of FluBok trivalent recombinant baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine administered intramuscularly to healthy children aged 6-59 months. *Vaccine*. 2009;27:6589-94.
- Keitel WA, Treanor JJ, El Sahky HM, Gilbert A, Meyer AL, Patriarca PA, et al. Comparative immunogenicity of recombinant influenza hemagglutinin (rHA) and trivalent inactivated vaccines (TIV) among persons >65 years old. *Vaccine*. 2009;28:379-85.
- Baxter R, Patriarca PA, Ensor K, Izikson R, Goldenthal KL, Cox MM. Evaluation of the safety, reactogenicity and immunogenicity of FluBok trivalent recombinant baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine administered intramuscularly to healthy adults 50-64 years of age. *Vaccine*. 2011;29:2272-8.
- Treanor JJ, El Sahly H, King J, Graham I, Izikson R, Kohberger R. Protective efficacy of trivalent recombinant hemagglutinin protein vaccine (FluBok) against influenza in healthy adults: a randomized, placebo-controlled trial. *Vaccine*. 2011;29:7733-9.
- Quan FS, Vunnavu A, Compans RW, Kang SM. Virus-like particle vaccine protects against 2009 H1N1 pandemic influenza virus in mice. *PloS One*. 2011;5:e9161.
- López-Macias C, Ferat-Osorio E, Tenorio-Calvo A, Isibasi A, Talavera J, Arteaga-Ruiz O, et al. Safety and immunogenicity of a virus-like particle pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine in a blinded, randomized, placebo-controlled trial of adults in Mexico. *Vaccine*. 2011;29:7826-34.
- FDA Vaccines and related biological products. FluBok (Influenza vaccine, recombinant hemagglutinin). VRBPLAC Briefing Document, version 6.0. November 19, 2009.