

BÀI TỔNG QUAN

TẠO CÁC HẠT TƯƠNG TỰ VIRUS (VIRUS-LIKE PARTICLE): TRIỂN VỌNG TRONG NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN VACCINE THỂ HỆ MỚI

Đổng Văn Quyền, Đinh Duy Kháng

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Virus-like particle (VLP) hay hạt tương tự virus được tạo ra bởi các protein cấu trúc của virus. Các protein này khi được đồng biểu hiện ở một hệ thống tái tổ hợp như tế bào nấm men, tế bào động vật, tế bào thực vật hoặc tế bào côn trùng... sẽ tự động lắp ghép lại với nhau để hình thành lên các hạt có cấu trúc giống với cấu trúc tự nhiên của virus. VLP có thể được xem là tập hợp của một hoặc nhiều loại protein với các đặc tính nổi trội sử dụng như vaccine hoặc làm nền cho việc phát triển các vaccine thể hệ mới. Bằng công nghệ DNA tái tổ hợp người ta có thể chèn các gen kháng nguyên ngoại lai vào cấu trúc VLP tạo nên các VLP lai biểu hiện gen kháng nguyên này trên bề mặt tạo các vaccine đa giá. VLP còn được sử dụng như các chất mang để gắn kháng nguyên ngoại lai bao gồm cả các kháng nguyên phi protein bằng phản ứng cộng hóa trị. Các kết quả nghiên cứu gần đây đã chứng minh tính sinh miễn dịch của vaccine VLP và khả năng bảo vệ vật chủ khỏi các tác nhân gây bệnh tương ứng. Đây là một hướng nghiên cứu mới đầy triển vọng, đang được triển khai nghiên cứu và ứng dụng tại nhiều phòng thí nghiệm tiên tiến và các công ty dược phẩm hàng đầu trên thế giới, nhằm thay thế các công nghệ sản xuất vaccine truyền thống. Vaccine VLP viêm gan B và vaccine VLP ung thư cổ tử cung là 2 loại vaccine đầu tiên được sản xuất bằng công nghệ tiên tiến này và đã được Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) chứng nhận. Trong bài báo này, chúng tôi sẽ thảo luận về sự phát triển của công nghệ VLP, đặc điểm và tính sinh miễn dịch của VLP và ứng dụng của chúng trong việc tạo vaccine thể hệ mới.

Từ khóa: công nghệ virus-like particles, đồng chuyển nạp, tế bào côn trùng, tính sinh miễn dịch, vaccine

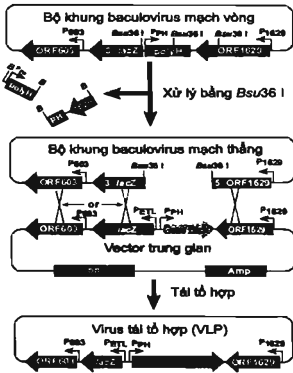
PHƯƠNG PHÁP TẠO HẠT GIỐNG VIRUS (VLP)

Để tạo ra các VLP, người ta thường sử dụng các protein có tính sinh miễn dịch cao của virus gây bệnh, thông thường là các protein bề mặt và/hoặc protein lõi (Grgacic *et al.*, 2006). Đầu tiên các gen mã hóa cho các kháng nguyên quan trọng của virus sẽ được thiết kế vào vector trung gian (baculovirus transfer vector). Tiếp theo đó, vector này được đồng chuyển nạp (co-transfect) vào tế bào chủ (tế bào côn trùng nuôi cấy *in vitro*) với DNA khung của baculovirus đã được xử lý với enzyme *Bsu36 I*. Việc xử lý với *Bsu36 I* đã loại bỏ các thành phần quan trọng (đầu C của ORF1269, promoter polyhedrin và polyhedrin ORF) cần thiết cho việc tổng hợp và nhân lên của baculovirus trong tế bào chủ từ bộ khung DNA của baculovirus. Cách duy nhất để DNA của baculovirus có thể tổng hợp nên virus khi được đưa vào trong tế bào nuôi cấy là chúng phải được bổ sung lại vùng bị loại bỏ này. Do đó khi đồng chuyển nạp với baculovirus transfer vector, các vùng thiết yếu (ORF1629) sẽ được bổ sung từ vector trung gian

này bằng cơ chế tái tổ hợp trình tự tương đồng, đồng thời gen đích cũng được chuyển sang DNA khung của baculovirus. Trong tế bào chủ, bộ khung DNA này sẽ tái bản và đóng gói tạo nên các virus tái tổ hợp biểu hiện protein cần nghiên cứu (Gene of Interest - GOI) (Hình 1, 2).

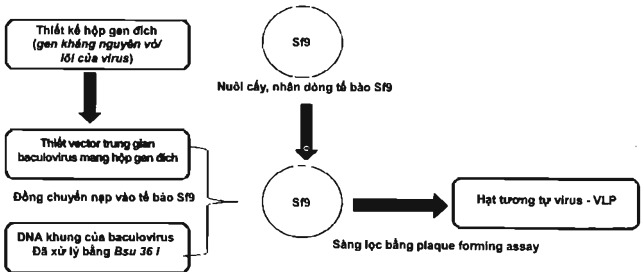
Các protein kháng nguyên quan trọng của virus (kháng nguyên bề mặt hoặc kháng nguyên lõi) khi được biểu hiện ra sẽ tự động lắp ghép lại với nhau tạo ra các hạt VLP. VLP có cấu trúc tương tự như các hạt virus tự nhiên nhưng không mang vật liệu di truyền của virus, do đó không có khả năng lây nhiễm. Do có cấu trúc tương tự virus tự nhiên và là tập hợp của các protein kháng nguyên quan trọng của virus, VLP sẽ được hệ thống miễn dịch của vật chủ nhận biết và tạo đáp ứng miễn dịch phòng vệ cao tương tự như khi bị nhiễm virus tự nhiên. Phương pháp này hứa hẹn là một trong những bước đột phá mới trong cuộc chiến chống lại virus nguy hiểm như HIV, cúm A/H5N1 và virus truyền nhiễm khác.

CÁC HỆ THỐNG BIỂU HIỆN TẠO VLP



Hình 1. Sơ đồ tái tổ hợp giữa bộ khung DNA của baculovirus và vector trung gian (baculovirus transfer vector) mang gen kháng nguyên ngoại lai để tạo VLP.

Có nhiều hệ thống biểu hiện để sản xuất VLP bao gồm: (1) các dòng tế bào động vật có vú, (2) tế bào côn trùng; (3) các chủng nấm men khác nhau như *Saccharomyces cerevisiae* và *Pichia pastoris*, (4) *Escherichia coli* và các chủng vi khuẩn khác. Vaccine VLP theo đường miệng (vaccine HBV, vaccine virus Norwalk) đã được tạo ra từ các loài thực vật khác nhau bao gồm thuốc lá, rau diếp và khoai tây (Kong *et al.*, 2001, Tacket *et al.*, 1998, Mason *et al.*, 1996). Các hệ thống biểu hiện này đều có những ưu và nhược điểm riêng. Việc dễ dàng trong biểu hiện, khả năng mở rộng quy mô và chi phí sản xuất thấp đã khiến nấm men là một lựa chọn phổ biến, tuy nhiên xét về các yếu tố khác như glycosyl hóa, gấp nếp (folding) chính xác các protein tái tổ hợp biểu hiện ra và quá trình lắp ráp thành các hạt tương tự virus cũng như tối ưu hóa codon... hệ thống này vẫn bộc lộ những hạn chế, vì vậy đòi hỏi cần có hệ thống sản xuất thay thế tối ưu hơn. *Escherichia coli* có ưu điểm là dễ dàng nuôi cấy, đòi hỏi thiết bị và môi trường nuôi cấy rẻ tiền... nhưng protein biểu hiện ở hệ thống này không được glycosyl hóa, trong khi nấm men bị hạn chế bởi khả năng sửa chữa sau dịch mã đặc biệt là với các glycoprotein có mannose cao và khả năng này đôi khi không ổn định.



Hình 2. Sơ đồ minh họa các bước tạo VLP trong tế bào côn trùng

VLP sản xuất trên hệ thống biểu hiện baculovirus mang nhiều ưu điểm như khả năng sửa chữa sau dịch mã, quá trình gấp nếp protein...tuy

nhuận hệ thống này cũng tạo ra các thách thức trong việc tinh sạch các VLP ra khỏi baculovirus, vì cả hai đều có kích thước tương tự nhau 80 - 120 nm

(Pushko *et al.*, 2005). Hệ thống nuôi cấy tế bào động vật có vú đang được ưa chuộng bởi khả năng sửa chữa sau dịch mã và lắp ráp các VLP chính xác, nhưng chúng lại là hệ thống khó kiểm soát và tốn kém cho sản xuất. Hệ thống Retrovirus có xu hướng mang các protein màng tế bào không mong muốn trong vỏ của chúng trong quá trình lắp ráp virus. Hướng nghiên cứu sản xuất tương lai có thể là việc lắp ráp VLP từ các protein của virus trong ống nghiệm bằng phương pháp hóa học (Pattenden, 2005).

VACCINE VLP

Các vaccine được sản xuất theo công nghệ truyền thống đều dựa vào việc tạo ra virus nhược độc (attenuated) hoặc virus bất hoạt (inactivated). Cả hai loại vaccine này đều tạo ra các đáp ứng miễn dịch mạnh mẽ, tuy nhiên đều có những hạn chế nhất định. Với vaccine nhược độc, khả năng virus suy yếu hồi tính trở thành virus độc lực còn đối với vaccine bất hoạt nguy cơ còn sót các virus chưa được bất hoạt hoàn toàn là những vấn đề lớn đặt ra các với các nhà sản xuất. Ngoài ra, việc tạo ra được một lượng lớn virus cung cấp cho sản xuất vaccine là vấn đề rất khó khăn, đặc biệt khi không có hệ thống nuôi cấy mô phù hợp cho phép virus sao chép hiệu quả. Với sự tiến bộ của công nghệ DNA tái tổ hợp, người ta tổng hợp được các thành phần riêng lẻ của virus và sử dụng các cấu phần virus này để sản xuất các vaccine tái tổ hợp. Tuy nhiên các vaccine dựa vào các protein đơn lẻ có hiệu quả quá thấp so với vaccine virus toàn phần. Các vaccine dưới đơn vị thường đòi hỏi liều kháng nguyên cao, mang tính lặp lại thường xuyên và cần phải kết hợp với các tá chất khác. Bên cạnh đó, việc tổng hợp được các protein tái tổ hợp có tính sinh miễn dịch giống với virus tự nhiên cũng rất khó khăn mặc dù hiện nay đã phát triển được các hệ thống biểu hiện ở tế bào bậc cao cho phép protein tái tổ hợp biểu hiện ra có thể được sửa chữa sau dịch mã, gấp nếp để tổng hợp ra các protein có cấu trúc giống với cấu trúc tự nhiên của chúng.

Các nhà khoa học đã phát triển được các vaccine mới như dùng công nghệ DNA tái tổ hợp loại bỏ các vùng độc của virus tạo ra các chủng virus sản xuất vaccine an toàn trên trứng gà có phôi (ví dụ vaccine cúm A/H5N1), hay nói cách khác là tạo chúng vaccine bằng kỹ thuật di truyền ngược. Đây được coi là bước đột phá trong công nghệ sản xuất vaccine. Mặc dù vậy, vaccine sản xuất trên trứng gà có phôi đòi hỏi thời gian lâu, hiệu suất thấp...đặc biệt trong

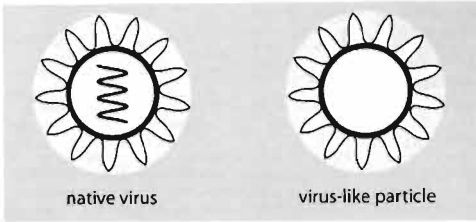
trường hợp đại dịch xảy ra sẽ không thể đáp ứng đủ yêu cầu.

Quan sát thực nghiệm cho thấy nhiều protein cấu trúc của virus có khả năng tự lắp ghép lại với nhau hình thành các hạt tương tự virus (VLP) có cấu trúc giống với các virus lây nhiễm tự nhiên, hoặc trong một số trường hợp tạo thành các hạt dưới virus (subviral particles). Quan sát này đã mở ra một hướng nghiên cứu đầy triển vọng trong phát triển các vaccine thể hệ mới đó là tạo các vaccine VLP. Vaccine VLP kết hợp các ưu điểm của vaccine virus toàn phần và các vaccine dưới đơn vị tái tổ hợp. VLP có cấu trúc tương tự như virus tự nhiên nhưng do thiếu vật liệu di truyền (nucleic acid) của virus nên chúng hoàn toàn không có khả năng lây nhiễm (Hình 3). VLP có thể được tạo ra bằng công nghệ tái tổ hợp trong các hệ thống biểu hiện mà không phụ thuộc vào sự sao chép của virus. Ví dụ, VLP của virus gây ung thư cổ tử cung ở người (human papillomavirus-HPV) không chỉ được tạo ra trong tế bào động vật có vú mà còn ở nhiều hệ thống nuôi cấy khác như vi khuẩn, nấm men, thực vật chuyển gen và baculovirus/tế bào côn trùng (Wazzecha *et al.*, 2003; Buck *et al.*, 2004; Hofmann *et al.*, 1995; Nardelli-Haeffliger *et al.*, 1997). Do cấu trúc đồng nhất, các hạt VLP có thể dễ dàng được tinh sạch bằng phương pháp ly tâm siêu tốc gradient hoặc bằng phương pháp sắc ký phân tách dựa vào kích thước (size-exclusion chromatography).

Điều quan trọng nhất là VLP có tính sinh miễn dịch cao. Với các ưu điểm trên, vaccine VLP được xem là vaccine tiềm tàng trong việc phòng chống một số bệnh virus mà cho đến nay con người chưa tìm hệ thống nuôi cấy tế bào thích hợp, ví dụ như HIV ở người. Hiện trên thị trường có hai loại vaccine VLP đã được thương mại hóa đó là vaccine VLP viêm gan B và vaccine VLP ung thư cổ tử cung. Vaccine VLP viêm gan B với tên thương mại Recombivax (Merck & Co., Inc.) và Energix (GlaxoSmithKline [GSK]), được FDA thông qua vào những năm 1980, là những hạt dưới virus có kích thước 22 nm tạo ra bởi sự tự lắp ghép của kháng nguyên bề mặt chính của virus viêm gan B (HBsAg) (Roldão *et al.*, 2010). Trong khi đó, vaccine VLP ung thư cổ tử cung được tạo ra bởi các hạt tương tự virus cấu tạo từ protein lõi L1 của HPV. Cả hai vaccine này đều có độ an toàn lý tưởng, hiệu lực cao và tạo ra đáp ứng kháng thể lâu dài. Sau 4 năm, qua các thử nghiệm lâm sàng của Merck và GSK, đã chứng minh được rằng vaccine VLP ung thư cổ tử cung có khả năng bảo vệ vật chủ lâu dài chống lại sự

lây nhiễm của HPV và tạo ra lượng kháng thể ổn định và cao hơn ít nhất 10 lần so với lượng kháng thể được tạo ra do lây nhiễm tự nhiên (Mao, 2006;

Haper *et al.*, 2006). Kết quả tương tự cũng được quan sát thấy sau 10 năm tiêm vaccine VLP viêm gan B (Chang, 1997).



Hình 3. Sơ đồ minh họa cấu trúc của hạt virus tự nhiên (native virus) và hạt tương tự virus (virus-like particle). Virus tự nhiên có mang vật liệu di truyền (các acid nucleic) nên có khả năng sao chép, trong khi đó VLP chỉ được tạo ra bởi các protein cấu trúc của virus và thiếu vật liệu di truyền do đó chúng không có khả năng tự sao chép và lây nhiễm.

Tại sao VLP lại có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch mạnh như thế? Câu hỏi này có thể được lý giải do VLP được tạo ra bởi một hoặc nhiều protein được sắp xếp về phương diện hình học thành một dãy protein tập trung, dày đặc và lặp lại. Đây là cấu trúc độc đáo và duy nhất của các kháng nguyên vi sinh vật, trải qua hàng triệu năm tiến hóa hệ thống miễn dịch của động vật có vú đã được huấn luyện để nhận biết và phản ứng mạnh mẽ lại cấu trúc kháng nguyên này giúp bảo vệ chúng khỏi sự tấn công của các tác nhân gây bệnh vi sinh vật. Ví dụ tế bào B có thể nhận biết đặc hiệu và tạo đáp ứng miễn dịch mạnh mẽ đối với các tác nhân gây bệnh được sắp xếp theo dãy có tổ chức, liên kết nhau và lặp lại, một dạng cấu trúc đặc thù của bề mặt virus (Bachmann, 1993; Fehr, 2003). Người ta tin rằng các kháng nguyên có tính lặp lại cao (highly repetitive antigens) kích thích các phân tử globulin miễn dịch liên kết màng gắn lại với nhau tạo chuỗi oligo hình thành thụ thể tế bào B (B cell receptor-BCR) (Bachmann, Zinkernagel, 1997). Sự liên kết chéo của globulin miễn dịch Ig thông qua kháng nguyên đa phân (multivalent antigens) dẫn đến sự hình thành của các tiểu vùng tín hiệu-BCR bền vững (Thyagarajan *et al.*, 2003) Tín hiệu này kích thích sự sinh trưởng và di chuyển của tế bào B, kích hoạt cả MHC lớp II các phân tử truyền tải tín hiệu cho phép tế bào B tương tác với các tế bào trợ bào T (T-helper cells) làm tiết ra IgG và tạo

ra các tế bào ghi nhớ B tồn tại lâu dài (long-lived memory B cells). Kết quả là các kháng nguyên đa phân có thể kích thích tế bào B ở nồng độ thấp hơn rất nhiều so với các kháng nguyên đơn phân (monomeric antigens) (Brunswick *et al.*, 1988; Milich, 1997). Mặt khác, rất nhiều loại VLP bao gồm cả VLP HPV không cần phải kết hợp với các tá chất khác để gây ra đáp ứng miễn dịch mạnh mẽ (Harro *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2000).

Ngoài khả năng kích thích đáp ứng tế bào B, VLP còn gây ra đáp ứng tế bào T hiệu quả thông qua sự tương tác với các tế bào trình diện kháng nguyên (APC), đặc biệt là tế bào tua gai (dendritic cells-DCs). Sử dụng các hạt nano cộng hợp, người ta đã chứng minh được rằng các tế bào tua gai tiếp nhận tốt nhất các kháng nguyên có đường kính xấp xỉ 40 nm, kích thước phổ biến của hầu hết các virus (Fifis *et al.*, 2004). Hơn nữa, một số loại VLP thường hướng tới các tế bào tua gai tốt hơn với các tế bào khác. Ví dụ chỉ trong 90 phút sau khi tiêm VLP parvovirus lớn qua tĩnh mạch thì khoảng một nửa tế bào tua gai đã tiếp nhận các VLP này (Moron *et al.*, 2002). Một khi đã được tiếp nhận bởi tế bào trình diện kháng nguyên, cũng giống như các kháng nguyên ngoại lai khác, VLP sẽ bị xử lý và được trình diện bởi các phân tử MHC lớp II và hoạt hóa các tế bào trợ bào T. Ngoài ra, chính các VLP chứ không phải các protein dưới đơn vị của chúng có thể đi vào

dịch nội bào tế bào tua gai, tại đó chúng được xử lý và trình diện tới các lympho bào T gây độc (cytotoxic lymphocyte - CTL) bởi các phân tử MHC lớp I (Rock, 1996; Bachmann *et al.*, 1996). Một số loại VLP có khả năng kích thích trực tiếp làm cho tế bào gai trở lên thành thực tế bào chức năng và hình thái. Ví dụ, trong trường hợp của các VLP virus ung thư cổ tử cung, chính các VLP chứ không phải protein lõi L1 tái tổ hợp riêng rẽ, đơn vị cấu tạo nên VLP này, có thể trực tiếp hoạt hóa các tế bào tua gai (Lenz *et al.*, 2001; Rudolf *et al.*, 2001), dẫn đến sự biểu hiện của các phân tử điều khiển đáp ứng miễn dịch (costimulatory molecules) và cytokine. Đây là các chất đóng vai trò quan trọng trong việc hoạt hóa tế bào T CD8⁺. Các VLP HIV (Tsunetsugu-Yokata *et al.*, 2003), virus Ebola (Bosio *et al.*, 2004) và virus PPV (Moron *et al.*, 2004) được thông báo là có thể kích thích sự chuyển tế bào tua gai. Rõ ràng, hệ thống miễn dịch có nhiều cơ chế phân tử khác nhau giúp chúng có thể đáp ứng mạnh mẽ lại các virus lây nhiễm.

CƠ CHẾ TẠO ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CỦA VLP

Để tạo đáp ứng miễn dịch hiệu quả với hiệu giá kháng thể cao, các kháng nguyên đích phải bộc lộ trên bề mặt VLP với mật độ cao. Nhờ sự tiến bộ của các ngành khoa học sinh học khác, đặc biệt là ngành sinh học cấu trúc, rất nhiều protein của virus đã được phân tích cấu trúc do đó chúng ta có được lượng thông tin rất lớn về các protein cấu trúc của virus và từ đó có thể cải biến VLP theo hướng xác định, tạo ra các VLP hoạt động như những giàn trình diện kháng nguyên. Phương pháp phổ biến nhất để tạo các VLP mang cùng một lúc nhiều quyết định kháng nguyên (epitopes) đó là dùng kỹ thuật gen để chèn các các gen kháng nguyên khác nhau vào VLP. Rất nhiều loại VLP đã được cải biến để đạt mục đích trên và nhiều vaccine VLP đã được thử nghiệm thành công trên mô hình động vật chống lại các bệnh virus như virus sốt xuất huyết (malaria) (Schodel *et al.*, 1994) và virus cúm (Neirynck *et al.*, 1999). Ưu điểm của kỹ thuật lai ghép kháng nguyên này đó là khi đã chèn thành công gen kháng nguyên ngoại lai vào VLP thì đảm bảo kháng nguyên này sẽ được biểu hiện với cấu hình tương tự với cấu hình tự nhiên của chúng và với mật độ cao trên bề mặt của VLP. Mặc dù vậy cũng có những khó khăn trong việc tạo các VLP lai (chimeric VLP). Các peptide được chèn vào VLP chỉ mang lại hiệu quả khi chúng được bộc lộ trên bề mặt VLP và không cản trở quá trình gấp nếp (folding) và lắp ghép của các protein. Trong rất

nhiều trường hợp, để có thể chèn các kháng nguyên ngoại lai và biểu hiện được chúng trên bề mặt VLP người ta thường thay thế các kháng nguyên này vào đúng vị trí các epitop thiết yếu của virus mẹ. Tuy nhiên chúng ta không thể dự đoán trước được liệu các peptide chèn vào này có tương thích với VLP hay không và liệu chúng có tính sinh miễn dịch không. Một hạn chế khác của kỹ thuật tạo VLP lai đó là chỉ chèn được các peptide có kích thước từ 20 đến 30 amino acid hoặc ít hơn, mặc dù cũng có một số trường hợp ngoại lệ chèn được các peptide có kích thước lớn hơn (Kratz *et al.*, 1999).

VLP còn có thể được sử dụng như các giá đỡ để gắn các hợp chất có bản chất không phải là protein nhờ phản ứng cộng hóa trị. Khả năng các hợp chất phi protein có thể gắn vào VLP là nhờ các nhóm amin hoặc sulfhydryl trên bề mặt của VLP. Phương pháp phổ biến nhất mà các nhà nghiên cứu sử dụng đó là gắn các hợp chất này vào các amino acid lysine trên protein vỏ bọc lộ trên bề mặt VLP. Ví dụ, bằng việc sử dụng các cầu nối liên kết chéo lưỡng chức (bifunctional cross-linker) với "tay" hoạt động là các amin và sulfhydryl, các peptide mang cysteine có thể được gắn vào VLP MS2 hoặc VLP Qβ bacteriophage hoặc các hạt HBsAg (Jegerlehner *et al.*, 2002; Chackerian *et al.*, 2006). Tương tự, các amino acid lysine bộc lộ trên bề mặt VLP có thể được biotin hóa và sau đó gắn vào các kháng nguyên đích đã biotin hóa nhờ phân tử "cầu nối" streptavidin (Chackerian *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2004). Ngoài ra người ta còn có thể cải biến tạo thêm các vị trí gắn kết trên bề mặt VLP. Ví dụ, bằng phương pháp này người ta đã tạo ra các VLP MS2 và VLP virus cowpea mosaic chỉ chứa một amino acid cysteine bộc lộ trên bề mặt (Wang *et al.*, 2002; Peabody, 2003). Các VLP mang cysteine này có thể gắn kết dễ dàng với các kháng nguyên đã biến đổi có các nhóm maleimide hoạt hóa sulfhydryl. Nói chung, kỹ thuật này được áp dụng linh hoạt tùy vào nguồn gốc và đặc điểm của các VLP khác nhau. Điều quan trọng nhất là chúng ta phải xác định được các quyết định kháng nguyên quan trọng của các virus gây bệnh và biểu hiện được chúng ở cấu hình giống với cấu hình tự nhiên của chúng. Ưu điểm nổi bật của việc gắn các hợp chất phi protein vào VLP bằng phản ứng cộng hóa trị là chúng ta có thể gắn nhiều loại kháng nguyên với các kích thước khác nhau. Ví dụ điển hình là người ta đã gắn thành công toàn bộ interleukin-17, một phân tử có khối lượng khoảng 35 kDa, lên bề mặt VLP bằng phương pháp này (Rohn *et al.*, 2006). Các hợp chất có kích thước lớn hơn sẽ làm tăng khả năng tạo đáp ứng miễn dịch phổ rộng

hơn với các epitop mạch thẳng cũng như mạch vòng trên phân tử đích. Đây là yếu tố rất quan trọng của hệ miễn dịch trong việc nhận biết các chất gây bệnh. Bởi vì hầu hết các chất gây bệnh đều trải qua sự biến đổi kháng nguyên ở một vài mức độ, kháng thể tạo ra chỉ bởi một epitop đơn lẻ tế bào B thường có hiệu quả thấp. Phản ứng cộng hợp ngoài việc cho phép gắn các hợp chất với protein còn cho phép gắn các hapten lên bề mặt VLP (Raja *et al.*, 2003). Một dẫn chứng gần đây nhất là vaccine cai nghiện thuốc lá phát triển bởi Cytos Biotechnology, vaccine này được tạo ra bằng cách gắn nicotine, một dạng hapten lên bề mặt VLP. Các nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng pha I cho thấy vaccine VLP cộng hợp nicotine tạo ra kháng thể lớp IgG đặc hiệu nicotine hiệu quả cao trong vật chủ được tiêm chủng (Maurer *et al.*, 2005).

TÁN CÔNG CÁC PHÂN TỬ BẢN THÂN (SELF-MOLECULES)

Theo truyền thống, vaccine khi đưa vào cơ thể sẽ tạo kháng thể chỉ chống lại tác nhân gây bệnh. Gần đây đang nổi lên sự quan tâm đến việc phát triển các vaccine mới với mục đích có tính kích thích đáp ứng miễn dịch tạo ra kháng thể kháng lại các phân tử bản thân - phân tử của chính vật chủ (self-molecules) liên quan đến quá trình phát triển bệnh mãn tính. Hướng nghiên cứu này được kích lệ bởi cả sự thành công của liệu pháp điều trị bệnh bằng kháng thể đơn dòng (Stockwin, Holmes, 2003) và cả do hạn chế của liệu pháp này đó là kháng thể cần phải được bổ sung thường xuyên, giá thành cao và nguy cơ vật chủ tạo ra kháng thể kháng kháng thể (Hwang, Foote 2005).

Khả năng tạo đáp ứng kháng thể kháng lại các protein bản thân có vẻ như bị hạn chế bởi cơ chế dung nạp (tolerance) tế bào B, cơ chế loại bỏ hoặc làm giảm độ nhạy hoặc thay đổi tính đặc hiệu của các tế bào B tự hoạt hóa (Hartley *et al.*, 1991; Tiegs *et al.*, 1993). Tuy nhiên, sự dung nạp tế bào B là không hiệu quả, ước tính chỉ khoảng 20% các tế bào B trưởng thành sống lâu là có thể tự hoạt hóa (Wardemann *et al.*, 2003). Vì sự dung nạp của tế bào B là rất ít và vẫn có những lỗ hổng, vì vậy không có gì ngạc nhiên khi các kháng thể kháng lại các phân tử bản thân có thể được tạo ra bằng việc tiêm chủng. Khó khăn chính để tạo ra các kháng thể IgG hiệu quả cao chống lại các kháng nguyên bản thân là phải vượt qua được sự dung nạp của tế bào T. Các cơ chế dung nạp nghiêm ngặt của tế bào T trung tâm và ngoại biên đảm bảo rằng các tế bào B tự hoạt hóa không thể nhận được sự trợ giúp của tế bào T và do

đó không thể tăng sinh và sản xuất các kháng thể tự kháng IgG có hại tiềm tàng. Vì vậy, một chiến lược cho việc kích thích IgG tự kháng (antiself IgG) hiện nay là chỉ gây miễn dịch bằng các kháng nguyên bản thân được gắn với các epitop của tế bào T hỗ trợ ngoại lai bằng phương pháp hóa học hoặc bằng phương pháp di truyền (Spohn, Bachmann, 2003). Mặc dù công nghệ này đòi hỏi cũng có thể kích thích phản ứng tạo kháng thể chống lại các protein của chính bản thân, nhưng điều này thường đòi hỏi các liều kháng nguyên lớn kết hợp với các tá chất mạnh. Ngoài ra, hiệu quả của IgG kháng lại kháng nguyên bản thân thường rất thấp và giảm nhanh chóng, đặc biệt khi so sánh với các đáp ứng miễn dịch kích thích bởi các vaccine chống lại các kháng nguyên lạ. Ngược lại, các kháng nguyên bản thân được biểu hiện trên tạo VLP vốn đã có tính sinh miễn dịch ở các liều thấp và không cần các tá chất hỗ trợ miễn dịch. Chackerian và đồng tác giả (2001) đã chứng minh rằng khi một kháng nguyên bản thân được kết hợp với VLP, nó sẽ tạo ra hiệu quả IgG cao gấp 1000 lần so với khi kháng nguyên bản thân này chỉ được gắn với một epitop của tế bào T hỗ trợ ngoại lai. Hơn nữa, biểu hiện trên VLP làm một kháng nguyên bản thân có tính sinh miễn dịch như một kháng nguyên lạ được trình diện trong điều kiện tương tự. Mức độ đáp ứng của IgG tự kháng liên quan chặt chẽ với mật độ kháng nguyên bản thân được biểu hiện trên bề mặt VLP (Chackerian *et al.*, 2002; Jegerlehner *et al.*, 2002). Những kết quả này đã chỉ ra rằng sự nhận biết của tế bào B với các thành phần đa cấu trúc "giống như xa lạ" có thể lấn át các cơ chế thông thường duy trì sự dung nạp của tế bào B.

Sự biểu hiện của các kháng nguyên bản thân trên VLP đang được ứng dụng rất thành công để tán công các phân tử liên quan đến các quá trình phát sinh bệnh của rất nhiều loại bệnh mãn tính, gồm có bệnh Alzheimer (AD - Alzheimer's disease), bệnh thấp khớp và một số loại ung thư. Rất nhiều trong số các vaccine này đang cho thấy hiệu quả lâm sàng trên các mô hình động vật thí nghiệm và một vài loại bệnh đang trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng. Dĩ nhiên, bất cứ vaccine nào kích thích các phản ứng tạo kháng thể kháng lại protein bản thân cũng sẽ gây ra những lo lắng về tính an toàn. Sự tiềm ẩn các ảnh hưởng có hại của một vaccine kích thích sự tạo kháng thể tự sinh (autoantibodies) phần lớn phụ thuộc vào mục tiêu tấn công, và trong một số trường hợp có thể được dự đoán bằng thí nghiệm với các kháng thể đơn dòng (Bachmann, Dyer, 2004). Sự phát triển của một vaccine cho bệnh Alzheimer là một ví dụ đặc biệt điển hình. Sự tích lũy các plaques

chứa peptide amyloid- β (A β) lắng kết (aggregated) là một dấu hiệu nhận biết của bệnh Alzheimer và các tác nhân tấn công A β là các liệu pháp chữa bệnh Alzheimer tiềm năng. Việc tiêm chủng A β đã làm giảm các plaques này và cải thiện sự suy giảm nhận thức ở chuột thí nghiệm bị bệnh Alzheimer (Janus *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2000). Sau đó, trong một thử nghiệm lâm sàng pha II, các bệnh nhân bị Alzheimer từ nhẹ cho đến vừa phải được tiêm chủng với peptide A β toàn phần kết hợp với một tá chất bổ trợ miễn dịch mạnh. Mặc dù không phải tất cả bệnh nhân đều phản ứng với sự tiêm chủng, nhưng những bệnh nhân đã tạo ra các đáp ứng miễn dịch hiệu quả cao chống lại A β cũng cho tỷ lệ suy giảm nhận thức (cognitive decline) thấp hơn so với nhóm đối chứng (Hock *et al.*, 2003). Không may, một tỉ lệ nhỏ (khoảng 5%) bệnh nhân bị viêm màng não (Meningoencephalitis) bị cho là do các phản ứng của tế bào T liên quan chặt chẽ với quy trình tiêm chủng (Nicoll *et al.*, 2003). Do đó, trong trường hợp này, một vaccine phòng Alzheimer hiệu quả có thể phụ thuộc vào việc tạo ra các kháng thể kháng A β hiệu quả và ổn định mà không gây ra các phản ứng của tế bào T tạo kháng thể tự kháng gây viêm. Để khắc phục nhược điểm này, vaccine dựa vào VLP tấn công một peptide ngắn ở đầu N của A β (không chứa epitop của tế bào T) có thể là một giải pháp hữu ích. Mặc dù các peptide ngắn thường có tính sinh miễn dịch yếu, nhưng các kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy hai vaccine VLP-A β tấn công epitop này đã tạo ra đáp ứng kháng thể IgG kháng A β với hiệu quả cao (Chackerian *et al.*, 2006; Zamora *et al.*, 2006). Trên một mô hình động vật thí nghiệm người ta đã chứng minh được tác dụng của các kháng thể kháng lại peptide làm giảm nhẹ bệnh (Zamora *et al.*, 2006) và không gây ra các phản ứng không mong muốn của tế bào T (Chackerian *et al.*, 2006). Do đó, tính linh hoạt của hệ thống biểu hiện VLP sẽ cho phép sự biến đổi của các vaccine để đáp ứng các yêu cầu về độ an toàn và hiệu quả.

VLP SỬ DỤNG NHƯ CÁC NỀN TẢNG KÍCH THÍCH ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH QUÁ TRUNG GIAN TẾ BÀO

Miễn dịch bảo vệ đối với nhiều tác nhân gây bệnh và các khối u được cho là cần đến các tế bào lympho T gây độc. Như đã miêu tả ở phần trước trong bài báo này, nhiều loại VLP có các đặc điểm thuận lợi cao cho việc kích thích đáp ứng mạnh mẽ của tế bào lympho T gây độc. Các đặc điểm này bao gồm:

Ưu tiên tấn công các tế bào tua gai (DCs);

Phân phối hiệu quả đến cả hai phân tử MHC I và MHC II;

Khả năng hoạt hóa trực tiếp sự thành thục của tế bào tua gai.

Do đó, các VLP đang được ứng dụng như các nền tảng để kích thích các phản ứng của tế bào lympho T độc chống lại các tác nhân gây bệnh và các kháng nguyên có nguồn gốc từ tế bào u.

Việc sử dụng VLP như nền tảng để kích thích các phản ứng của tế bào lympho T độc chống lại các kháng nguyên khác loài đặt ra một loạt những thách thức khác so với các vaccine nhắm vào việc kích thích các phản ứng miễn dịch dịch thể. Không giống các epitop của tế bào B, các epitop của tế bào T không cần được bộc lộ trên bề mặt hạt VLP hoặc có mặt với mật độ cao. Do đó, việc tạo ra các VLP lai cho mục đích này vẫn là một thách thức lớn. Các VLP lai không những có thể được tạo ra bằng sự kết hợp hoặc dung hợp các epitop đích với các protein capsid chính của virus (như đã được miêu tả ở phần trước) mà còn có thể bằng việc tạo ra sự dung hợp giữa các kháng nguyên đích với các protein là các thành phần cấu trúc thứ yếu của các VLP (và thường không cần thiết cho sự hình thành hạt). Các peptide lớn và thậm chí các protein toàn phần có thể được thêm vào các protein cấu trúc thứ yếu mà không gây cản trở sự lắp ráp capsid. Hướng đến các protein lớn có thể là hướng đi đúng trong các trường hợp mà các epitop đích của tế bào lympho T độc có liên quan nhất vẫn chưa được xác định. Ví dụ, Greystone *et al.*, (1998) đã tạo được một protein lai mang protein capsid thứ yếu của HPV là L2 và một oncoprotein phi cấu trúc E7 mã hóa bởi HPV. Khi protein capsid chính của HPV được đồng biểu hiện bên nhau, L2-E7 được chèn một cách hiệu quả vào các VLP và vì E7 được chèn ở phía trong VLP nên domain dung hợp đã không gây cản trở cho sự bám gắn lên tế bào. Các VLP lai L1/L2-E7 tạo ra các đáp ứng mạnh mẽ của tế bào lympho T độc, bảo vệ chuột khỏi nguy hiểm khi chúng bị công cường độc với một dòng tế bào u biểu hiện E7. Tương tự, Tegersedt và đồng tác giả (2005) đã dung hợp một domain 683 amino acid có nguồn gốc từ kháng nguyên u HER-2/neu với MPyV VP2. Sự tiêm chủng các VLP Her2(1-683)Py đã bảo vệ chuột khỏi sự tấn công của một dòng tế bào ung thư biểu mô vú nhiễm Her2 và chống lại sự tăng sinh quá mức của các tế bào ung thư biểu mô vú bản địa.

Để hoạt hóa các tế bào T CD8⁺, các tế bào trình diện kháng nguyên (APC) cũng cần phải cung cấp các tín hiệu đồng kích thích phù hợp, các tín hiệu này chỉ được tạo ra nhờ sự trưởng thành của các APC. Một số loại VLP, như VLP HPV và VLP PPV, có thể tạo ra những tín hiệu này bằng cách kích thích trực tiếp sự trưởng thành về kiểu hình và chức năng của các tế bào tua gai (Lenz *et al.*, 2001, Rudolf *et al.*, 2001). Khả năng kích thích các tế bào tua gai được phản ánh chính xác ở khả năng của các vaccine VLP trong việc kích thích các phản ứng của các tế bào lympho T độc. Các vaccine VLP HPV và VLP PPV có thể gây ra các đáp ứng mạnh mẽ và lâu dài của tế bào lympho T độc sau khi sau một lần tiêm chủng và không cần bổ sung tá chất hỗ trợ miễn dịch (Greenstone *et al.*, 1998; Sedlik *et al.*, 1997). Thực tế, việc không cần phải bổ sung tá chất có ý nghĩa rất lớn vì các tá chất bổ sung vào vaccine thường liên quan đến các phản ứng phụ gây viêm có hại hoặc các phản ứng tự miễn dịch không mong muốn. Một điều quan trọng đáng để chú ý đó là không phải tất cả các loại VLP đều có khả năng điều chỉnh miễn dịch bẩm sinh. Các VLP HBcAg và Qβ đều không hoạt hóa các tế bào tua gai và gây ra đáp ứng yếu của tế bào lympho T độc khi vắng mặt tá chất hỗ trợ. Tuy nhiên, tính sinh miễn dịch của nhiều VLP có thể được cải thiện bằng việc gắn các VLP với các chất có hoạt tính hỗ trợ (Kang *et al.*, 2003; Skountzou *et al.*, 2007). Ví dụ, Stormi và đồng tác giả đã làm tăng đáng kể khả năng gây ra các đáp ứng của tế bào lympho T gây độc bằng việc gắn vào phía trong VLP các đoạn oligonucleotide CpG (Stormi *et al.*, 2004). Mặc dù trên mô hình chuột thực nghiệm người ta thấy sự tiềm chủng liều đơn có thể báo về vật chủ khỏi tác nhân ung thư, nhưng trong hầu hết các trường hợp đều đòi hỏi việc tiêm miễn dịch lặp lại để có thể tạo đáp ứng miễn dịch tối ưu. Một vấn đề đáng chú ý khi sử dụng các VLP để kích thích đáp ứng của tế bào lympho T độc là các kháng thể được tạo ra bởi sự tiềm chủng ban đầu có thể hạn chế tính hiệu quả của những lần tiêm chủng tiếp theo. Với các vaccine tế bào lympho T độc dựa vào HPV, giả thuyết cho rằng các kháng thể đặc hiệu với VLP gây cản trở sự hấp thu qua trung gian thụ thể hoặc những tương tác giữa các VLP và các tế bào tua gai dẫn đến sự trưởng thành của tế bào tua gai (Da Silva *et al.*, 2001). Điều này nhấn mạnh lo lắng chung đó là các kháng thể tồn tại từ trước có thể hạn chế việc sử dụng các VLP có nguồn gốc từ các virus lây nhiễm ở người, như HPV hoặc HBV. Các phương pháp prime-boost regimens sử dụng các VLP khác loài có nguồn gốc từ các virus không lây nhiễm người có thể là một giải pháp cho vấn đề này

(Da Silva *et al.*, 2003). Tuy nhiên, các kháng thể tồn tại từ trước không phải luôn ảnh hưởng bất lợi cho việc tiêm chủng bổ trợ. Đáng chú ý, các VLP gắn CpG hỗ trợ một cách hiệu quả các đáp ứng của tế bào lympho T độc ngay cả khi có mặt các kháng thể kháng VLP (Schwartz *et al.*, 2005; Ruedl *et al.*, 2005). Do đó, việc sử dụng các VLP gắn CpG có thể loại bỏ yêu cầu về sự cần thiết phải kết hợp các thành phần khác loài.

Mặc dù các VLP có tiềm năng lớn như các vaccine tế bào lympho T độc, nhưng một vài nghiên cứu đã so sánh trực tiếp hiệu quả của các vaccine tế bào lympho T độc dựa trên VLP với những chiến lược vaccine hiện đại, như gắn các tế bào tua gai ngoài tế bào (ex vivo), dùng các virus hoặc vi khuẩn tái tổ hợp sống hoặc tiêm chủng DNA. Rõ ràng các VLP có những ưu điểm về lý thuyết và/hoặc thực tiễn vượt trội các kỹ thuật này. Ví dụ, các vaccine tế bào dựa vào các tế bào tua gai kích thích (pulsed DCs) cần nhiều lao động và đắt tiền, các chủng tái tổ hợp ẩn chứa những lo lắng về tính an toàn và việc tiêm chủng DNA chỉ có hiệu quả khi nó kết hợp với thành phần khác. Tuy nhiên, cần thêm nhiều nghiên cứu chi tiết mới có thể trả lời những tranh cãi về tính hiệu quả này.

BÌNH LUẬN

Các VLP có thể được xem như những hệ thống biểu hiện có thể được sử dụng để tạo ra đáp ứng miễn dịch có hiệu lực cao và phổ rộng chống lại nhiều loại tác nhân gây bệnh khác nhau. Kích thước, bản chất tự nhiên và cấu trúc tập trung và lặp lại của các VLP là cơ sở cho tính sinh miễn dịch bẩm sinh của chúng. Nhiều loại VLP đang được ứng dụng như các nền tảng vaccine; tuy nhiên vẫn còn có những cân nhắc về kỹ thuật và thực hành xác định tính ứng dụng của những loại VLP khác nhau, bao gồm những điểm sau:

1. **Khả năng thích ứng để biểu hiện các loại kháng nguyên đích:** Khả năng sắp xếp các kháng nguyên trên hoặc trong các VLP có thể khác nhau đáng kể phụ thuộc vào loại VLP. Cải biến di truyền các protein capsid của virus đang được sử dụng thành công để sản công nhiều kháng nguyên peptide khác nhau và cũng có thể làm giảm những ảnh hưởng lên việc lắp ghép VLP. Sự kết hợp hóa học cho phép một loạt protein và các phân tử đích không phải protein được gắn với các VLP nhưng lại phụ thuộc vào sự tương tác giữa các phần đã xác định trên cả VLP và kháng nguyên đích.

2. **Các đặc tính sinh miễn dịch đặc biệt:** Khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch của tế bào B và T liên quan đến các loại VLP khác nhau có thể bị ảnh hưởng bởi một số các nhân tố đặc hiệu với VLP. Những nhân tố này có thể bao gồm các tương tác đặc hiệu giữa thụ thể và virus làm ảnh hưởng đến tương tác chức năng với các tế bào trình diện kháng nguyên. Việc so sánh đối chiếu về khả năng tạo các đáp ứng miễn dịch của các VLP khác nhau có thể hữu ích cho việc hiểu rõ đặc tính sinh miễn dịch của VLP.

3. **Tính phức tạp trong sản xuất và hiệu suất:** Việc các VLP có thể được sản xuất ở mức độ cao trong các hệ thống biểu hiện như vi khuẩn, nấm men hoặc thực vật sẽ là những ưu điểm đáng kể về mặt sản xuất. Việc gắn các trình tự đích vào VLP bằng kỹ thuật di truyền có thể có nhiều thuận lợi hơn việc gắn kết bằng phương pháp hóa học.

4. **Sự bền vững về môi trường:** Mặc dù các VLP nhìn chung có độ bền cao, nhưng việc tạo ra các loại VLP có thể chống lại những biến đổi về nhiệt độ có lẽ sẽ tốt hơn trong những điều kiện nơi nó khó duy trì được chuỗi nguyên tử tương tác yếu.

5. **Sự miễn dịch tồn tại trước:** Các kháng thể tồn tại từ trước kháng lại VLP có thể ảnh hưởng bất lợi đến tính sinh miễn dịch. Trong trường hợp này, sử dụng các VLP có nguồn gốc từ các tác nhân không gây bệnh cho người có thể sẽ thuận lợi hơn.

KẾT LUẬN

VLP thường được sử dụng trong các nghiên cứu để xác định thành phần protein cần thiết cho việc lắp ráp virus và là một công cụ hữu ích cho việc phát triển vaccine. VLP mang các kháng nguyên bề mặt virus được bọc lộ với mật độ cao và trình diện các protein này tới tế bào có thẩm quyền miễn dịch thúc đẩy mạnh mẽ đáp ứng miễn dịch của các tế bào B và tế bào C. Ngoài ra, do VLP thiếu vật liệu di truyền nên không có khả năng tự sao chép và lây nhiễm, chúng là sự thay thế an toàn hơn cho vaccine truyền thống. Một loạt các VLP được tạo ra đã cho kết quả thử nghiệm hứa hẹn trên mô hình động vật thử nghiệm, và có tiềm năng rất lớn cho phát triển các vaccine phòng chống nhiều bệnh nguy hiểm. Đặc biệt, do khả năng gắn được nhiều loại kháng nguyên khác nhau bao gồm các protein có kích thước lớn và cả các kháng nguyên có bản chất không phải protein khiến VLP đang thu hút được sự quan tâm của các nhà khoa học và các công ty dược phẩm trên toàn thế giới nhằm phát triển vaccine thế hệ mới an toàn hơn.

hiệu quả hơn. Hiện nay vaccine viêm gan B và vaccine ung thư cổ tử cung của người là 2 vaccine được phát triển bằng công nghệ VLP và đã được FDA chứng nhận. Đây được xem là kết quả đầy hứa hẹn của vaccine thế hệ mới. Ngoài ra VLP còn được sử dụng trong liệu pháp gen như một hệ thống vận chuyển các gen hoặc chất trị liệu đến cơ quan đích.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bachmann MF, Dyer MR (2004) Therapeutic vaccination for chronic diseases: a new class of drugs insight. *Nat Rev Drug Discov* 3: 81-88.
- Bachmann MF, Lutz MB, Layton GT, Harris SJ, Fehr T, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P (1996) Dendritic cells process exogenous viral proteins and virus-like particles for class I presentation to CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 26: 2595-2600.
- Bachmann MF, Rohrer UH, Kündig TM, Bürki K, Hengartner H, Zinkernagel RM (1993) The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 262: 1448-1451.
- Bachmann MF, Zinkernagel RM (1997) Neutralizing antiviral B cell response. *Annu Rev Immunol* 15: 235-270.
- Billaud JN, Peterson D, Barr M, Chen A, Sallberg M, Garduno F, Goldstein P, McDowell W, Hughes J, Jones J, Milich D (2005) Combinatorial approach to hepadnavirus-like particle vaccine design. *J Virol* 79: 13656-13666.
- Bosio CM, Moore BD, Warfield KL, Ruthel G, Mohamadizadeh M, Aman MJ, Bavari S (2004) Ebola and Marburg virus-like particles activate human myeloid dendritic cells. *Virology* 326: 280-287.
- Brunswick M, Finkelman FD, Highet PF, Inman JK, Dintzis HM, Mond JJ (1988) Picogram quantities-Ig antibodies coupled to dextran induce B cell proliferation. *J Immunol* 140: 3364-3372.
- Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT (2004) Efficient intracellular assembly of Papillomaviral vector. *J Virol* 78: 751-757.
- Chackerian B, Lenz P, Lowy DR, Schiller JT (2002) Determinations of autoantibody induction by conjugated papillomavirus virus-like particles. *J Immunol* 169: 6120-6126.
- Chackerian B, Lenz P, Lowy DR, Schiller JT (2006) Virus and virus-like particle-based immunogens for Alzheimer's disease induce antibody response against amyloid- β without concomitant T cell responses. *Vaccine* 24: 6321-6331.

- Chackerian B, Lowy DR, Schiller JT (2001) Conjugation of a self-antigen to papillomavirus-like particles allows for efficient induction of protective autoantibodies. *J Clin Invest* 108: 415-423.
- Chang MH (1997) Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med* 336: 1855-1859.
- Da Silva DM, Pastrana DV, Schiller JT, Kast WM (2001) Effect of preexisting neutralizing antibodies on the anti-tumor immune response induced by chimeric human papillomavirus virus-like particle vaccines. *Virology* 290: 350-360.
- Da Silva DM, Schiller JT, Kast WM (2003) Heterologous boosting increases immunogenicity of chimeric papillomavirus virus-like particle vaccines. *Vaccine* 21: 3219-3227.
- Fehr T (2003) T cell -independent type I antibody response against B cell epitopes expressed repetitively on recombinant virus particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9477-9481.
- Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, Li J, Mottram PL, McKenzie IF, Plebanski M (2004) Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol* 173: 3148-3154.
- Greenstone HL, Nieland JD, de Visser KE, De Bruijn ML, Kimbauer R, Roden RB, Lowy DR, Kast WM, Schiller JT (1998) Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1800-1805.
- Grgacic EV, Anderson DA (2006) Virus-like particles passport to immune recognition. *Methods* 40: 60-65.
- Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, Jenkins D, Schiind A, Costa Clemens SA, Dubin G (2006) Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human Papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomized control trial. *Lancet* 367: 1247-1255.
- Harro CD, Pang YY, Roden RB, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, Mast TC, Robinson R, Murphy BR, Karron RA, Dillner J, Schiller JT, Lowy DR (2001) Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human Papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst* 93: 284-292.
- Hartley SB, Crosbie J, Brink R, Kantor AB, Basten A, Goodnow CC (1991) Elimination from peripheral lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature* 353: 765-769.
- Hock C, Komietzko U, Streffer JR, Tracy J, Signorelli A, Müller-Tillmanns B, Lemke U, Henke K, Moritz E, Garcia E, Wollmer MA, Umbricht D, de Quervain DJ, Hofmann M, Maddalena A, Papassotiropoulos A, Nitsch RM (2003) Antibodies against β -amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* 38: 547-554.
- Hofmann KJ, Cook JC, Joyce JG, Brown DR, Schultz LD, George HA, Rosolowsky M, Fife KH, Jansen KU (1995) Sequence determination of human Papillomavirus 6a and assembly of virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology* 209: 506-518.
- Hwang WY, Foote J (2005) Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* 36: 3-10.
- Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P, Westaway D (2000) A β peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408: 979-982.
- Jegerlehner A, Storni T, Lipowsky G, Schmid M, Pumpens P, Bachmann MF (2002) Regulation of IgG antibody responses by epitope density and CD21-mediated costimulation. *Eur J Immunol* 32: 3305-3314.
- Jegerlehner A, Tissot A, Lechner F, Sebbel P, Erdmann I, Kündig T, Bächli T, Storni T, Jennings G, Pumpens P, Renner WA, Bachmann MF (2002) A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses. *Vaccine* 20: 3104-3112.
- Kang SM, Yao Q, Guo L, Compans RW (2003) Mucosal immunization with virus-like particles of human immunodeficiency virus conjugated with cholera toxin subunit B. *J Virol* 77: 9823-9830.
- Karpenko LL, Ivanisenko VA, Pika IA, Chikaev NA, Eroshkin AM, Veremeiko TA, Ilyichev AA (2005) Insertion of foreign epitopes in HBcAg: how to make the chimeric particle assemble. *Amino Acids* 18: 329-337.
- Kong Q, Richter L, Yang YF, Arntzen CJ, Mason HS, Thanavala Y (2001) Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11539-11544.
- Kratz PA, Böttcher B, Nassal M (1999) Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1915-1920.
- Lenz P, Day PM, Pang YY, Frye SA, Jensen PN, Lowy DR, Schiller JT (2001) Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J Immunol* 166: 5346-55.
- Li Q, Cao C, Chackerian B, Schiller J, Gordon M, Ugen KE, Morgan D (2004) Overcoming antigen masking of anti-amyloidbeta antibodies reveals breaking of B cell tolerance by virus-like particles in amyloidbeta immunized amyloid precursor protein transgenic mice. *BMC Neurosci* 5: 21.

Mao C, Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Wiley DJ, Alvarez FB, Bautista OM, Jansen KU, Barr E. (2006) Efficacy of human papillomavirus-16 vaccine to prevent cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 107: 18-27.

Mason HS, Ball JM, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ (1996) Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5335-5340.

Maurer P, Jennings GT, Willers J, Rohner F, Lindman Y, Roubicek K, Renner WA, Müller P, Bachmann MF (2005) A therapeutic vaccine for nicotine dependence: preclinical efficacy, and Phase I safety and immunogenicity. *Eur J Immunol* 35: 2031-2040.

Milich DR (1997) Role of B cells in antigen preparation of the hepatitis B core. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14648-14653.

Morgan D, Diamond DM, Gotschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW (2000) A β peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408: 982-985.

Moron G, Dadaglio G, Leclerc C (2004) New tools for antigen delivery to the MHC class I pathway. *Trends Immunol* 25: 92-97.

Morón G, Rueda P, Casal I, Leclerc C (2002) CD8 α -CD11b⁺ dendritic cells present exogenous virus-like particles to CD⁺ T cells and subsequently express CD8 α and CD205 molecules. *J Exp Med* 195: 1233-1245.

Nardelli-Haeffliger D, Roden RB, Benyacoub J, Sahli R, Krachenbuhl JP, Schiller JT, Lachat P, Potts A, De Grandi P (1997) Human Papillomavirus type 16 virus-like particles expressed in attenuated *Salmonella typhimurium* elicit mucosal and systemic neutralizing antibodies in mice. *Infect Immun* 65: 3328-3336.

Neirynck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W (1999) A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med* 5: 1157-1163.

Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO (2003) Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid- β peptide: a case report. *Nat Med* 9: 448-452.

Pantenden LK, Middelberg APJ, Niebert M, Lipin DI (2005) Toward the Preparative and Large Scale Precision Manufacture of Virus-Like Particles. *Trends Biotechnol* 23: 523-529.

Peabody DS (2003) A viral platform for chemical modification and multivalent display. *J Nanobiotechnology* 1: 5.

Pushko P, Tumpey TM, Bu F, Knell J, Robinson R, Smith G (2005) Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice. *Vaccine* 23: 5751-5759.

Raja KS, Wang Q, Gonzalez MJ, Manchester M, Johnson JE, Finn MG (2003) Hybrid virus-polymer materials 1. Synthesis and properties of PEG-decorated cowpea mosaic virus. *Biomacromolecules* 4: 472-476.

Rock KL (1996) MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today* 17: 131-137.

Röhn TA, Jennings GT, Hernandez M, Grest P, Beck M, Zou Y, Kopf M, Bachmann MF (2006) Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 36(11): 2857-2867.

Roldão A, Mellado MC, Castilho LR, Carrondo MJ, Alves PM (2010) Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 9(10):1149-1176.

Rudolf MP, Fausch SC, Da Silva DM, Kast WM (2001) Human dendritic cells are activated by chimeric human papillomavirus type-16 virus-like particles and induce epitope-specific human T cell response in vitro. *J Immunol* 166: 5917-5924.

Ruedl C, Schwarz K, Jegerlehner A, Stormi T, Manolova V, Bachmann MF (2005) Virus-like particles as carriers for T-cell epitopes: limited inhibition of T-cell priming by carrier-specific antibodies. *J Virol* 79: 717-724.

Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandevert C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P (1999) Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400: 173-177.

Schödel F, Wirtz R, Peterson D, Hughes J, Warren R, Sadoff J, Milich D (1994) Immunity to malaria elicited by hybrid hepatitis B virus core particles carrying circumsporozoite protein epitopes. *J Exp Med* 180: 1037-1046.

Schwarz K, Meijerink E, Speiser DE, Tissot AC, Cielens I, Renhof R, Dishlers A, Pumpens P, Bachmann MF (2005) Efficient homologous prime-boost strategies for T cell vaccination based on virus-like particles. *Eur J Immunol* 35: 816-821.

Sedlik C, Saron M, Sarraesca J, Casal I, Leclerc C (1997) Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7503-7508.

Skountzou I, Quan FS, Gangadhara S, Ye L, Vzorov A, Selvaraj P, Jacob J, Compans RW, Kang SM (2007)

Incorporation of glycosylphosphatidylinositol-anchored granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or CD40 ligand enhances immunogenicity of chimeric simian immunodeficiency virus-like particles. *J Virol* 81: 1083-1094.

Spohn G, Bachmann MF (2003) Therapeutic vaccination to block receptor-ligand interactions. *Expert Opin Biol Ther* 3: 469-476.

Stockwin LH, Holmes S (2003) Antibodies as therapeutic agents. *vive le rennaisance. Expert Opin Biol Ther* 3: 1133-1152.

Storni T, Ruedl C, Schwarz K, Schwendener RA, Renner WA, Bachmann MF (2004) Nonmethylated CG motifs packaged into virus-like particles induce protective cytotoxic T cell responses in the absence of systemic side effects. *J Immunol* 172: 1777-1785.

Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Clements JD, Levine MM, Amten CJ (1998) Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat Med* 4: 607-609.

Tegerstedt K, Lindencrona J, Curcio C, Andreasson K, Tullus C, Forni G, Dalianis T, Kiessling R, and Ramqvist T (2005) A single vaccination with polyomavirus VP1/VP2Her2 virus-like particles prevent outgrowth of HER-2/neu-expressing tumors. *Cancer Res* 65: 5953-5957.

Thyagarajan R, Arunkumar N, Song W (2003) Polyvalent antigens stabilize B cell antigen receptor surface signaling microdomains. *J Immunol* 170: 6099-6106.

Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D (1993) Receptor

editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* 177: 1009-1020.

Tsunetsugu-Yokota Y, Morikawa Y, Isogai M, Kawana-Tachikawa A, Odawara T, Nakamura T, Grassi F, Autran B, Iwamoto A (2003) Yeast-derived human immunodeficiency virus type 1 p55(gag) virus-like particles activated dendritic cells (DCs) and induce perforin expression in Gag-specific CD8(+) T cells by crosspresentation of DCs. *J Virol* 77: 10250-10259.

Wang Q, Lin T, Johnson JE, Finn MG (2002) Natural supramolecular building blocks. Cysteine-added mutants of cowpea mosaic virus. *Chem Biol* 9: 813-819.

Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Mefire E, Nussenzweig MC (2003) Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301: 1374-1377.

Warzecha H, Mason HS, Lane C, Tryggvesson A, Rybicki E, Williamson AL, Clements JD, Rose RC (2003) Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *J Virol* 77: 8702-8711.

Zamora E, Handisurya A, Shafi-Keramat S, Borchelt D, Rudow G, Conant K, Cox C, Troncoso JC, Kimbaurer R (2006) Papillomavirus-like particles are an effective platform for amyloid- β immunization in rabbits and transgenic mice. *J Immunol* 177: 2662-2670.

Zhang LF, Zhou J, Chen S, Cai LL, Bao QY, Zheng FY, Lu JQ, Padmanabha J, Hengst K, Malcolm K, Frazer IH (2000) HPV6b virus like particles are potent immunogens without adjuvant in man. *Vaccine* 18: 1051-1058.

PRODUCTION OF VIRUS-LIKE PARTICLES (VLP): A POTENTIAL APPROACH FOR DEVELOPMENT OF NEW GENERATION VACCINES

Dong Van Quyên*, Đinh Duy Kháng

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Virus-like particles (VLP) have gained increasing interest by scientists worldwide for their use as vaccines due to their unique particulate structure which is capable of eliciting the immune system. VLP were made of viral structural proteins and can be considered as dense and repetitive arrays of one or more protein subunits that, when overexpressed in a recombinant expression system such as yeast, mammalian cells, plant cells and baculovirus/insect cells spontaneously self-assemble into particles which are structurally similar to infectious viruses. Using genetic engineering it is possible to incorporate foreign antigens into VLP structure to generate chimeric particles that display heterologous epitopes on VLP. In addition, VLP also can be used as platform to attach large protein or nonprotein target molecules via chemical conjugation. The results of recent studies have shown the innate immunogenicity of VLP and their ability to protect the host cells from pathogens. VLP-based strategy has been proved to be a potential approach being investigated in numerous laboratories and in leading pharmaceutical companies around the world in order to develop new generation vaccine(s) replacing traditional

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37563386; E-mail: dvquyen@ibt.ac.vn

vaccine strategies. Currently, VLP-based hepatitis B virus and VLP-based human papillomavirus are the first two VLP-based vaccines that have been licensed commercially and approved by US Food and Drug Administration. In this review, we discuss the development of VLP technology, the immunogenicity of VLP and its application in development of new generation vaccines.

Keywords: *baculovirus, co-transfection, immunogenicity, self-molecules, vaccine, virus-like particles*