استفاده از ذرات شبه ویروسی (VLPs) در تولید واکسن

فرشاد همتی دیناروند[۱]، اسرا ملکشاهی[۲]، علیرضا افشاری‌فر[۳]، محسن همتی دیناروند[۴*]

۱-دانشجوی دکترای ویروس شناسی گیاهی، مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

۲-کارشناسی ارشد ویروس شناسی پزشکی، گروه ویروس شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

۳-استاد ویروس شناسی گیاهی، مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

۴-دانشجوی دکترای بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

یافته / دوره ۲۳ / شماره ۵ / زمستان ۱۴۰۰ / مسلسل ۹۰

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۶/۱۳ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۹/۱۳

مقدمه: ذرات شبه ویروسی (**Virus-Like Particles; VLPs**) ریزساختارهایی هستند که از نظر شکل، اندازه و سایر ویژگی‌های ریخت‌شناسی به ویروس‌های طبیعی شباهت دارند، با این تفاوت که ذرات شبه ویروسی فاقد ژنوم هستند. به دلیل وجود ساختارهای تکراری در پیکره **VLP**ها امکان تحریک قوی سیستم ایمنی وجود دارد. بنابراین، استفاده از این ذرات باعث افزایش ایمنی بدن در هنگام دریافت و پس دریافت این ذرات می شود و به دلیل عدم وجود ژنوم فاقد توان بیماری زایی هستند. برای تولید **VLP** ممکن است از چندین سیستم استفاده شود. انتخاب نوع سیستم تولید بستگی به عوامل متعددی دارد، از جمله هزینه و نیاز به تغییرات پس از ترجمه که می‌تواند در تولید پاسخ ایمن بهینه ضروری باشد. علاوه بر این، ویروس‌های گیاهی به دلیل ساختاری که دارند به خوبی قادر به تحریک سیستم ایمنی پستانداران هستند. از طرف دیگر، برای پستانداران توان بیماری‌زایی ندارند. به همین خاطر می‌توان آن‌ها را به عنوان یک زیر مجموعه از **VLP**ها به حساب آورد. برخی از واکسن‌های مبتنی بر **VLP** ها و ویروس‌های گیاهی برای جلوگیری از چندین بیماری عفونی طراحی شده‌اند و مورد تأیید قرار گرفته‌اند و بسیاری دیگر در مرحله بالینی یا تحقیق هستند. علاقه به استفاده از **VLP**ها برای تولید واکسن اخیراً به دلیل مزایای آن در برابر واکسن‌های سنتی یا قدیمی‌تر افزایش یافته است. در این مقاله مروری سعی شده است تا سیستم‌های تولید **VLP** از نظر معایب و مزایا با هم مقایسه شوند.

واژه‌های کلیدی: ذرات شبه ویروسی، سیستم بیان، ویروس گیاهی، واکسن.

***آدرس مکاتبه: شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی.**

پست الکترونیک: mohsen_h43@yahoo.com

مقدمه

ذرات شبه ویروسی (virus-like particles; VLPs) یک نوع از پیکره ویروس است که ریخت‌شناسی ویروس طبیعی را تقلید می‌کند اما فاقد مواد ژنومی بیماری‌زا است (۱،۲). با این حال VLPها ترکیب آنتی‌ژنتیکی طبیعی از پروتئین‌های ایمنی‌زا و ساختار تکراری پیکره اصلی ویروس را حفظ می‌کنند (۳). این ذرات به خاطر اندازه، شکل و سطح‌شان که اپی‌توپ‌ها را در یک آرایه تکراری متراکم به نمایش می‌گذارند، پتانسیل القا پاسخ قوی ایمنی را دارند (۷-۴). VLPها به دنبال بیان پروتئین‌هایی خاص و سپس سر هم بندی آن‌ها به‌صورت خود به خودی به وجود می‌آیند. در حال حاضر واکسن‌های غیر نوترکیب علیه بیماری‌های ویروسی از عوامل بیماری‌زای کشت شده آزمایشگاهی، که باید ضعیف یا غیرفعال شوند ساخته می‌شوند که به دلیل ناقص انجام شدن احتمالی این اعمال بیماری زایی آن حفظ شده و با مهار زیستی (bio-containmen) همراه است (۸). یک رویکرد بالقوه ایمن‌تر سنتز واکسن‌ها بر اساس بیان اجزای اختصاصی عوامل بیماری‌زا است که می‌تواند از خواص تحریک سیستم ایمنی بدن بواسطه ویروس اصلی تقلید کند بدون اینکه باعث بیماری شود. بنابر این، VLP ها نماینده‌ای عالی برای چنین واکسن‌های مصنوعی هستند (۹). هدف از نگارش این مقاله‌ی مروری بررسی کاربرد و پتانسیل VLPها برای تولید واکسن به کمک سیستم‌های بیانی می‌باشد.

تقسیم بندی ذرات شبه ویروسی براساس ساختار

ذرات شبه ویروسی از یک یا چند پروتئین ساختاری تشکیل شده‌اند. هنگامی که این ذرات به صورت نوترکیب بیان می‌شوند توانایی خود سرهم بندی دارند. این پروتئین‌ها می‌توانند در لایه‌های یک، دو یا سه تایی مرتب شوند (۱۰). در مورد پاپیلوماویروس انسانی (Human Papilloma Virus (HPV)) (۱۱) ، VLPها از یک پروتئین ساختاری واحد تشکیل می‌شوند، زمانی که تعدادی از این پروتئین‌ها به صورت تکراری در کنار هم قرار می‌گیرند، پیکره‌ی اصلی ذره را می‌سازد. VLPهای پیچیده‌تر شامل چندین پروتئین ساختاری هستند، به عنوان مثال VLPهای خانواده Reoviridae از ۲ تا ۴ پروتئین مختلف که در چندین لایه قرار گرفته اند تشکیل می شوند (۱۰). VLPها همچنین می‌توانند یک پوشش لیپیدی خارجی داشته باشند. در این حالت، پروتئین ساختاری اصلی (Structural protein core) از طریق فرآیند جوانه‌زنی از سلول خارج می‌شود و کپسید را در قسمتی از غشای سلولی می‌پوشاند. این مورد در VLP های HIV-1، که از پلی‌پروتئین Gag تشکیل شده اند و بخشی از غشای سلول میزبان را به عنوان پوشش می‌گیرند صدق می‌کند (۱۲). VLPهای آنفولانزا هم توسط پروتئین ساختاری اصلی (Protein core) و سنبله‌های هماگلوتینینی که در سطح آن قرار می‌گیرند، شکل می‌گیرد (۱۳). بنابراین، انتخاب رده سلولی تولید کننده بسیار مهم است زیرا VLP های پوشش دار حاوی پروتئین‌های بیان شده در غشای آن خواهند بود. به تازگی، نوع جدیدی از VLP با نام "VLPهای نوترکیب" توسعه یافته است که ساختار آن‌ها از یک پروتئین ویروسی تشکیل شده در حالی که پروتئین‌های پوششی از یک ویروس دوم مشتق شده‌اند (۱۴). این نوع از VLPها امکانی را فرآهم می‌کنند تا بتوان از آن‌ها به عنوان سیستم تحویل دارو استفاده کرد. به طوری که پپتید مورد نظر را می‌توان روی پیکره سوار کرد. پروتئین‌های پوششی می‌توانند به عنوان یک علامت برای گیرنده‌های بافتی خاص عمل کنند. بنابراین، VLPها کاربردهای جدیدی در انتقال دارو، ژن درمانی و درمان سرطان دارند (۱۷-۱۵).

سیستم‌های تولید VLP

به طور کلی چند روش برای تولید VLPها وجود دارد که شامل روش‌های ژنتیکی، شیمیایی، آنزیمی، فیزیکی و

استفاده از سیستم های بیانی می باشند. امروزه روش سیستم بیانی مورد توجه قرار گرفته است (۱۸). سیستم بیانی در تولید VLP باید شرایط لازم برای تغییرات تا شدن پروتئین و تغییرات پس از ترجمه را مورد توجه قرار دهد. امروزه چندین سیستم اصلی برای بیان و تولید VLPها مورد استفاده قرار می‌گیرد که هر کدام دارای مزایا و معایبی هستند (جدول ۱).

جدول۱. مزایا و معایب سیستم‌های مختلف تولید VLP

نوع سیستم تولید	مزایا	معایب
E.coli	-سهولت بیان -قابلیت مقیاس پذیری -هزینه تولید پایین	-اجازه گلیکوزیلیشن نمی دهد -اندوتوکسین ها
مخمر	-سهولت بیان -قابلیت مقیاس پذیری -هزینه تولید پایین	-غلظت نا مناسب گلیکوزیلیشن پروتئین (مانند تغییر بالای پروتئین مانوز) -خطر پیچ خوردگی و مونتاژ اشتباه
سلول های حشره	-می‌تواند مقادیر زیادی از **VLP** در شرایط کشت سلولی با تراکم بالا تولید کند -قابلیت مقیاس پذیری - خطر کشت عوامل بیماری‌زای فرصت طلب در مقایسه با کشت سلولی پستانداران کاهش می یابد -ترکیب سلول های حشره/باکولوویروس می‌تواند به عنوان یک ادجوانت عمل کند تا پاسخ ایمنی بیشتر شود	-محدود به تغییر بالای پروتئین مانوز - حذف آلودگی باکولوویروس ممکن است دشوار باشد - اجزای سلول حشره / باکولوویروس ممکن است پاسخ ایمنی را در برابر اپیتوپ های خواسته شده را پنهان کند
سلول‌های پستانداران	- سلول های تولید کننده به سلول های میزبان طبیعی ارتباط نزدیکی دارند -**PTM** مناسب و مونتاژ صحیح**VLPs** -سهولت بیان	-هزینه ی تولید بالا -بهره وری پایین - پایداری: تجزیه آنتی‌ژن
گیاهان	-قابلیت مقیاس پذیری -هیچ آلودگی ویروسی انسانی در آن نیست	- سطوح پایین بیان -نمی‌تواند **PTM**ها و مونتاژ **VLP**را تحمل کند

سیستم بیان باکتری‌ها و مخمرها

باکتری‌ها و مخمرها به راحتی سیستم‌های تولید مقرون به صرفه را ایجاد می‌کنند. باکتری‌ها یک سیستم بیان مناسب برایVLP هایی هستند که تنها از یک یا دو پروتئین ساختاری تشکیل شده‌اند و فاقد پوشش پروتئینی هستند. مزیت اصلی که این سیستم دارد این است که عملکرد بالایی برای تولید پروتئین‌های مورد نظر را دارد، این در حالی است که باکتری‌ها قادر به انجام تغییرات پس از ترجمه که می‌تواند برای ایمنی‌زایی VLP بسیار مهم باشد نیستند (۹). با این وجود، باکتری‌ها برای تولید ذرات شبه ویروسی غیر پوشش‌دار مبتنی بر اجزائی از یک پاتوژن با قابلیت خود سرهم بندی در میزبان باکتریایی یا به عنوان اتصالاتی از آنتی‌ژن‌های هدف واکسن به پروتئین‌های سطحی باکتریوفاژ استفاده شده‌اند (۱۹). مخمر یک میزبان تثبیت شده خوب برای بیان پروتئین نوترکیب می‌باشد و همچنین برای تولید VLP استفاده می‌شود. با توجه به توانایی مخمر برای انجام اصلاحات پس از ترجمه، این نشان دهنده یک گام رو به جلو در تولید VLP است. به تازگی، VLP Chikungunya با استفاده از *P. pastoris* تولید شده و نتایج امیدوار کننده‌ای از لحاظ ایمن‌سازی به دست آمده است. با این وجود، اصلاحات پس از ترجمه در مخمرها به ویژه در گلیکوزیلاسیون پروتئین دقیقا همانند انسان نیست (۱۸). با توجه به این محدودیت‌ها این سیستم بیانی عموماً برای تولید VLP های غیرپوشش دار استفاده شده است. با این وجود تولید VLP های پوشش دار Pr55Gag 1-HIV در مخمر با استفاده از ساکرومایسس سرویزیه اسفروپالست ها بدست آمده است. در این مدل، VLPهای کروی تولید

شده با غشاء پلاسمایی سلول مخمر محصور بوده و از لحاظ ریخت شناسی شبیه ذرات HIV نابالغ هستند (۲۰،۲۱).

سیستم بیان حشره

یکی دیگر از سیستم‌هایی که به طور گسترده برای تولید VLPها استفاده شده است، سیستم باکلوویروس _سلول حشره (Baculovirus/Insect cell; B/IC) می باشد. از سلول‌های حشرات برای تولید تعدادی از واکسن‌های مبتنی بر VLP خصوصاً یکی از واکسن های رایج و متداولHPV ، استفاده شده است (۲۲). می توان از سلول‌های حشرات برای تولید هر دو نوع VLP های پوشش‌دار و غیر پوشش دار بهره جست. تولید واکسن‌های VLP پوشش‌دار در سلول‌های حشرات جزء پیشرفته‌ترین VLPها هستند. سیستم بیانی سلول‌های حشرات دارای تغییرات پس از ترجمه از نوع یوکاریوتی می باشند، به عنوان مثال گلیکوزیلاسیون پروتئین ها (۲۳) در بین تمام سیستم‌های بیانی، سلول‌های حشرات همراه با سیستم بیانی باکلوویروس-سلول حشره (B/IC) یکی از نوید بخش‌ترین سیستم‌ها برای فناوری VLP به منظور تولید واکسن‌های ویروسی می باشند (۲۴،۲۵).

فرآیند سیستم B/IC به دو مرحله تقسیم می‌شود: مرحله عفونت و مرحله تولید. طراحی باکلوویروس یک روش سریع و آسان است. به همین دلیل، برای تولید واکسن برعلیه ویروس‌هایی که پروتئین سطحی آن‌ها در هنگام شیوع مجدد تغییر پیدا می‌کند مناسب است. تولید پروتئین در سیستم بیانی B/ICمی‌تواند مقادیر برابری نسبت به تولید در سیستم بیانی باکتری یا مخمر باشد، اما ظرفیت آن برای انجام تغییرات پس از ترجمه‌ای که پیچیده‌تر هستند بیشتر است. بطور معمول، دو رده سلول حشره‌ای اصلی برای تولید پروتئین نوترکیب به کمک سیستم بیان B/IC استفاده می‌شود، Sf9 (Spodoptera frugiperda) و High Five cells (Trichoplusia ni). بسیاری از انواع VLP با استفاده از سیستم B/IC تولید شده‌اند، از جمله Chikungunya و HIV. یکی از معایب اصلی این سیستم این است که باکولویروس‌های پوشش داده شده همزمان با VLP تولید می‌شوند و خالص‌سازی آن را یک مرحله دشوارتر کرده و این مرحله هزینه بر است (۲۸-۲۶). در حال حاضر سیستم‌های دیگری برای تولید VLPها وجود دارد که برخلاف سیستم باکلوویروس، خالص سازی پروتئین در آن‌ها راحت است. رده سلولی پایدار می‌توانند تولید شوند که در آن پروتئین مورد نظر به طور مداوم بیان می‌شود. HIV-1 VLP ها توسط سلول‌های Drosophila S2به طور پایدار تولید می‌شوند (۷).

سیستم بیان سلول‌های پستانداران

توانایی انجام تغییرات پس از ترجمه پیچیده بر روی پروتئین‌های نوترکیب مزیت اصلی سیستم‌های بیانی سلول پستانداران و پرندگان است. با این حال، هزینه‌های تولید بالا و نگرانی‌های ایمنی بالقوه به عنوان یک چالش همچنان وجود دارد. همانند دیگر سیستم‌های بیانی نوترکیب، سلول‌های پستانداران به طور فزاینده‌ای برای تولید واکسن‌های داوطلب مبتنی بر VLP در برابر مجموعه‌ای از عوامل بیماری‌زا استفاده می‌شوند (۲۹،۳۰). اگر چه سلول‌های پستانداران میزان کمتری از پروتئین مورد نظر نسبت به سایر سیستم‌ها تولید می‌کنند، اما آن‌ها توانایی ایجاد تغییرات پس از ترجمه پیچیده‌تر و دقیق‌تری را دارند (۱۳). به همین علت، سلول‌های پستانداران معمولاً برای تولید VLPهای پوشش داده شده با چندین پروتئین ساختاری مختلف استفاده می‌شوند. چندین رده سلولی از سلول‌های پستانداران برای تولید پروتئین نوترکیب در دسترس هستند و برای رشد در محلول شیمیایی بدون سرم سازگار شده‌اند (۳۳-۳۱).

سیستم بیان گیاهان

در طول دو دهه گذشته گیاهان پتانسیل زیادی برای تولید پروتئین های نوترکیب جهت اهداف صنعتی یا دارویی از جمله تولید واکسن نشان داده‌اند (۳۴, ۳۵). به عنوان سیستم عامل‌های تولید، سیستم‌های بیان گیاهی سریع، بسیار مقیاس پذیر، مقرون به صرفه و عاری از عوامل بیماری‌زای پستانداران می‌باشند (۳۹-۳۶). علاوه بر این، ساختار پروتئین، سرهم بندی و تغییرات پس از ترجمه در گیاهان شبیه به آن‌هایی

است که در سلول‌های پستانداران می‌باشد (۴۲-۴۰). مشابه با سلول‌های پستانداران، حشرات و مخمر، گیاهان می‌توانند برای تولید هر دو نوع VLPهای پوشش‌دار و غیر پوشش‌دار استفاده شوند. هر دو نوع واکسن‌های داوطلب VLP پوشش‌دار و غیر پوشش‌دار در گیاه در مقیاس وسیع تحت شرایط مناسب تولید شده‌اند و به مرحله آزمایشات بالینی توسعه یافته‌اند (۴۵-۴۳). برای بیان و تولید یک پروتئین خاص در گیاه معمولاً از باکتری گیاهی*Agrobacterium tumefaciens* استفاده می‌شود. این باکتری می‌تواند سلول‌های گیاهی را آلوده و ژن خاصی را به میزبان گیاهی وارد کند (۴۶). تا کنون نمونه‌های متعددی از VLPهای مختلف (مانند آنفولانزا، HPV، HBV، SARS-CoV-2) به کمک این سیستم در گیاهان تولید شده است (۵).

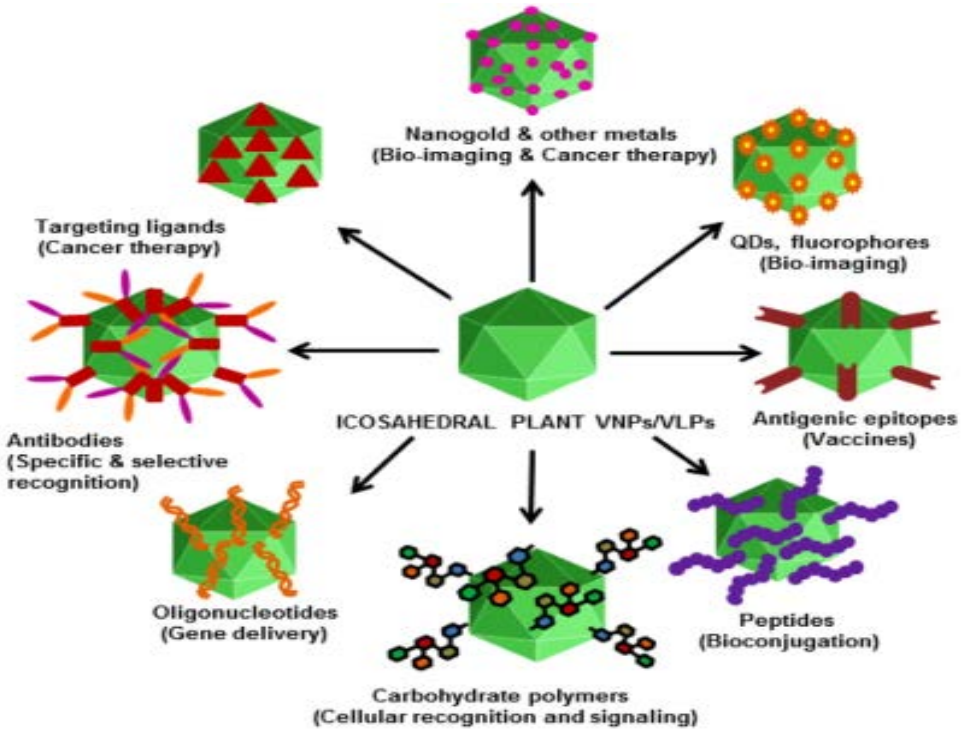
استفاده از ویروس‌های گیاهی

ذرات ویروس‌های گیاهی نوترکیب (Recombinant plant virus particles; rPVPs) برای تولید واکسن مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. آن‌ها می‌توانند به عنوان یک زیرمجموعه از VLP طبقه‌بندی شوند، زیرا آنها ذرات ویروسی هستند که در پستانداران ایجاد بیماری نمی‌کنند. با این حال، اغلب rPVP ها توان بالقوه تکثیر در گیاهان را حفظ می‌کنند و این مسئله از طرفی باعث ایجاد چالش‌های امنیتی و زیست محیطی می‌شود و از طرف دیگر این یک مزیت محسوب خواهد شد زیرا این امکان را برای تولید سریع و آسان این نوع از VLPها را در حجم بالا می‌دهد. با این وجود، rPVP دارای همه‌ی مزایای VLPها است و در نتیجه امکان تولید واکسن‌های مؤثر را فراهم می‌آورد. بسیاری از ویروس‌های گیاهی مانند tobacco mosaic virus، cowpea mosaic virus، potato virus X، alfalfa mosaic virus، papaya mosaic virus در حال حاضر برای تولید واکسن مورد استفاده قرار می‌گیرند (جدول۲) (۴۷،۴۸).

جدول۲. rPVP های استفاده شده برای تهیه‌ی واکسن.

ویروس	شکل	پارامترهای تست شده
Cowpea Mosaic Virus; CPMV	چند وجهی	پاسخ هومورال پاسخ سلولی ایمن سازی
Potato Virus X; PVX	میله‌ای	پاسخ هومورال پاسخ سلولی ایمن سازی
Tobacco Mosaic Virus; TMV	میله‌ای	پاسخ هومورال پاسخ سلولی ایمن سازی
Cucumber Mosaic Virus; CMV	چند وجهی	پاسخ هومورال پاسخ سلولی
Alstroemeria Mosaic Virus; ALMV	چند وجهی	پاسخ هومورال پاسخ سلولی
Papaya Mosaic Virus; PapMV	میله‌ای	پاسخ هومورال پاسخ سلولی ایمن سازی ادجوانت
Bamboo Mosaic Virus; BaMV	میله‌ای	پاسخ هومورال پاسخ سلولی
Tomato Bushy Stunt Virus; TBSV	چند وجهی	پاسخ هومورال
Plum Pox Virus; PPV	میله‌ای	پاسخ هومورال

معمولاً ویروس‌های گیاهی میله‌ای شکل، متقارن (بیست وجهی) و ساده هستند. آن‌ها یک یا دو پروتئین تکرار شده پوشش پروتئینی (Coat protein; CP) و یک ژنوم RNA دارند. این ویروس‌ها نسبتاً آسان مهندسی می‌شوند، هزینه تولید کم دارند و بسیار پایدار هستند، که امکان نگه‌داری در دمای اتاق را فراهم می‌کند، این مزیت‌ها برای واکسیناسیون در کشورهای در حال توسعه مطلوب است (۴۹).



شکل ۱. کاربردهای مختلف مبتنی بر VNPs/VLPs در فناوری نانو، نانودارو و تهیه واکسن ها (۵۰).

ساخت واکسن بر پایه ذرات شبه ویروسی

یکی از مهمترین خصوصیات VLPها، توانایی تقلید از ساختارهای درشت مولکولی ویروس‌ها و القاء پاسخ ایمنی قوی در پستانداران است که این قابل مقایسه با ایمنی القاء شده توسط ویروس‌های آلوده کننده طبیعی می‌باشد (۱۸،۵۱). با توجه به شباهت آن‌ها با ویروس‌های طبیعی از نظر شکل و اندازه، نحوه‌ی آرایش زیرواحدهای پروتئینی و ارائه‌ی اپی‌توپ‌های ایمنی‌زا در سطح VLP، این ذرات نیز همانند ویروس‌های طبیعی قادر به القاء پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال بدون استفاده از مولکول‌های کمکی هستند.

بیشتر اثربخشی ایمنی VLPها به خصوصیات ریخت‌شناسی آن‌ها (اندازه و شکل) مربوط می‌شود و نتیجه‌ی آن جذب مؤثر توسط سلول‌های ارائه دهنده آنتی‌ژن' به ویژه سلول‌های دندریتیک می‌باشد. علاوه بر این، بر خلاف دیگر آنتی‌ژن‌های خارجی، که نمی‌توانند به مسیر مجموعه سازگاری بافتی اصلی کلاس (Major - I (histocompatibility complex; MHC برسند، آنتی‌ژن‌های ارائه شده توسط VLP ها به دلیل عدم وجود عفونت یا تکثیر داخل سلولی در ارتباط با هر دو کلاس‌های MHC، کلاس I و کلاس II ارائه می‌شوند (۲،۵۲).

سیستم ایمنی بدن، ویروس ها و VLPها را بر اساس خصوصیات زیر تشخیص می‌دهد (۴)، که باید در فرآیند

ساخت واکسن در نظر گرفته شوند: ۱) سطوح ویروسی و VLP ها از نظر ساختاری بسیار سازمان یافته‌اند و حاوی آمینواسیدهای تکراری هستند که از چند صد تا هزاران مولکول CP ویروسی ساخته شده اند. این ساختارهای تکراری می توانند گیرنده‌های سلول B را به هم متصل کنند، و منجر به تحریک شدید سلول های B و القاء پاسخ‌های طولانی مدت آنتی بادی می‌شوند. از نظر ساخت واکسن، ذرات ویروسی و VLP ها باید ریخت شناسی ویروسی معمولی خود را پس از همه دستکاری‌ها حفظ کنند. ۲) اندازه ، شکل و استحکام ساختار فضایی واکسن نیز می‌تواند در پاسخ ایمنی تأثیر بگذارد. ویروس‌ها و VLPها دارای اندازه‌های بهینه (۲۰۰-۲۰ نانومتر) هستند و به آن‌ها اجازه ورود به سیستم لنفاوی را می‌دهند و توسط سلول‌های ارائه دهنده آنتی‌ژن گرفته می‌شوند. برای اطمینان از انتقال کارآمد در سیستم لنفاوی، باید از تجمع گسترده VLPها در آماده سازی واکسن جلوگیری شود. ۳) ویروس‌ها و VLPها حاوی نوکلئیک اسیدهای اختصاصی میزبان هستند که فعال کننده گیرنده‌های تلفن-مانند در سلول‌های ارائه دهنده آنتی‌ژن هستند. در صورت لزوم، VLPها می‌توانند به صورت آزمایشگاهی با DNA یا RNA مورد نظر پر شوند (۱۸).

از زمانی که سیستم‌های بیانی گیاهی معرفی شده‌اند تا کنون چندین VLP از ویروس‌های مختلف از جمله ویروس هپاتیت B، ویروس پاپیلومای انسانی، ویروس آنفولانزا، ویروس کووید-۱۹ (SARS-CoV-2)، ویروس نورواک (Norwalk virus) ، ویروس بیماری پا و دهان، و ویروس هپاتیت C به عنوان داوطلب واکسن تولید شده است (۵، ۵۳، ۵۴). اخیرا در آزمایشات فاز سه نشان داده شده که VLPهای ویروس آنفولانزا که در سیستم گیاهی تولید شده‌اند، در مقایسه با واکسن‌های تجاری آنفولانزا که در تخم مرغ تولید می‌شوند، محافظت بهتری را در بزرگسالان در برابر ویروس آنفولانزا ایجاد می‌کنند (۵۵).

پس از موفقیت در تولید VLPهای ویروس آنفولانزا توسط شرکت مدیکاگو، این شرکت بر اساس دانش و تجربه‌ی کسب شده اقدام به تولید VLPهای SARS-CoV-2 در گیاه کرد که از نظر اندازه و شکل کاملاً مشابه پیکره‌های طبیعی SARS-CoV-2 بودند، که این VLP تولید شده به عنوان یک واکسن داوطلب مرحله یک آزمایشات بالینی را با موفقیت پشت سر گذاشته است و در حال حاضر تحت آزمایشات بالینی مرحله دو و سه می‌باشد که پیش بینی می‌شود به میزان ۱۰ میلیون دوز در ماه از این نوع واکسن تولید شود (۵۴،۵۶).

بحث و نتیجه گیری

ذرات شبه ویروسی (VLP) آینده روشنی برای تولید واکسن‌های نسل جدید را به ما نشان می‌دهند. آن‌ها شبیه ساختار واقعی ویروس هستند که باعث پاسخ ایمنی هومورال و سلولی می‌شوند. علاوه بر این، آن‌ها حاوی هیچ ماده ژنتیکی ویروسی نیستند، که این ویژگی آن‌ها را برای تولید کنندگان واکسن که در تماس با واکسن هستند و دریافت کنندگان واکسن، بی خطر می‌سازد، زیرا خطر عفونت اتفاقی وجود ندارد. روش های مختلفی برای تهیه ی VLPها وجود دارد از جمله روش‌های ژنتیکی، روش‌های شیمیایی و آنزیمی، روش های فیزیکی و روش استفاده از سیستم های بیانی که سیستم های بیانی بر اساس نوع سلول های مورد استفاده خود شامل روش های مختلفی از جمله سیستم های بیانی باکتری ها، سیستم بیانی مخمرها، سیستم بیانی سلول حشرات، سیستم بیانی سلول های پستانداران و سیستم بیانی گیاهان. هرکدام از این روش ها دارای مزایا و معایبی نیز هستند و انتخاب نهایی سیستم بیان به ویژگی‌های واکسن مورد نیاز بستگی دارد. تا کنون واکسن های تجاری خوبی که بر اساس VLPها ساخته شده اند، وارد بازار شده است مثل Recombivax®، Energix®، Gardasil® و Cervarix™ که دوتای اول از طریق بیان VLPهای HBV و دو واکسن بعدی از طریق بیان VLPهای

HPV در سیستم‌های بیانی مخمری و سلول‌های حشره‌ای تولید شده‌اند (۵). در همه‌گیری مربوط به ویروس کرونا چندین شرکت بزرگ از جمله شرکت مدیکاگو تمرکزشان بر تولید VLP ویروس بوده و برخی از آن‌ها آزمایشات بالینی خود را با موفقیت سپری کرده‌اند (۵۴)، که این موفقیت نشان می‌دهد این سیستم تولید واکسن می‌تواند تا حدود زیادی نیاز واکسن را تامین و حتی نقص‌های واکسن‌های قبلی را برطرف سازد. هرچند واکسن‌های که تاکنون تولید شده‌اند به خوبی عمل کرده‌اند، اما دانشمندان همیشه به دنبال بهترین سیستم‌ها برای بیان و تولید واکسن‌ها بوده‌اند، چه از نظر هزینه‌های تولید و چه از نظر سادگی تولید و فرآوری. در دهه‌ی گذشته سیستم بیان گیاهی به دلیل ویژگی‌های خاص مورد توجه قرار گرفته‌اند و به نظر می‌رسد در آینده‌ای نزدیک حجم قابل توجهی از واکسن‌ها و پروتئین‌های نوترکیب در این سیستم بیانی تولید خواهد شد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از گروه گیاه پزشکی دانشگاه شیراز و گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی شیراز به خاطر حمایت‌های لازم تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References

1. Grgacic EV, Anderson DA. Virus-like particles: passport to immune recognition. Methods. 2006;40(1):60-5.
2. Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. Vaccine. 2012;31(1):58-83.
3. Ge X-Y, Li J-L, Yang X-L, Chmura AA, Zhu G, Epstein JH, et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. Nature. 2013;503(7477):535-8.
4. Bachmann MF, Jennings GT. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. Nat Rev Immunol. 2010;10(11):787-96.
5. Chen Q, Lai H. Plant-derived virus-like particles as vaccines. Hum Vaccin Immunother. 2013;9(1):26-49.
6. Acosta-Ramírez E, PérezFlores R, Majeau N, PastelinPalacios R, GilCruz C, RamírezSaldaña M, et al. Translating innate response into longlasting antibody response by the intrinsic antigenadjuvant properties of papaya mosaic virus . Immunology. 2008;124(2):186-97.
7. Buonaguro L, Tornesello M, Tagliamonte M, Gallo R, Wang L, Kamin-Lewis R, et al. Baculovirus-derived human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles activate dendritic cells and induce ex vivo T-cell responses .Journal of virology. 2006;80(18):9134-43.
8. Marsian J, Lomonossoff GP. Molecular pharming—VLPs made in plants. Curr Opin Biotechnol. 2016;37:201-6.
9. Roldão A, Mellado MCM, Castilho LR, Carrondo MJ, Alves PM. Virus-like particles in vaccine development. Expert Rev Vaccines. 2010;9(10):1149-76.
10. Lua LH, Connors NK, Sainsbury F, Chuan YP, Wibowo N, Middelberg AP. Bioengineering viruslike particles as vaccines. Biotechnol Bioeng. 2014;111(3):425-40.
11. Abdoli A, Soleimanjahi H, Fotouhi F, Teimoori A, Beiranvand SP, Kianmehr Z. Human papillomavirus type16-L1 VLP production in insect cells. Iran J Basic Med Sci. 2013;16(8):891.
12. Cervera L, Gutiérrez-Granados S, Martínez M, Blanco J, Gòdia F, Segura MM. Generation of HIV-1 Gag VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cell cultures using an optimized animal-derived component free medium. J Biotechnol. 2013;166(4):152-65.
13. Liu F, Wu X, Li L, Liu Z, Wang Z. Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: successes and challenges. Protein Expr Purif. 2013;90(2):104-16.
14. Hu G, Wang N, Yu W, Wang Z, Zou Y, Zhang Y, et al. Generation and immunogenicity of porcine circovirus type 2 chimeric virus-like particles displaying porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 epitope B. Vaccine. 2016;34(16):1896-903.

15. Yan D, Wei Y-Q, Guo H-C, Sun S-Q. The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles .Appl Microbiol Biotechnol. 2015;99(24):10415-32.
16. López-Macías C. Virus-like particle (VLP)-based vaccines for pandemic influenza: performance of a VLP vaccine during the 2009 influenza pandemic. Hum Vaccin Immunother. 2012;8(3):411-414.
17. Jeong H, Seong BL. Exploiting virus-like particles as innovative vaccines against emerging viral infections. J Microbiol. 2017;55(3):220-30.
18. Balke I, Zeltins A. Use of plant viruses and virus-like particles for the creation of novel vaccines. Advanced drug delivery reviews. 2019;145:119-29.
19. Roy P, Noad R. Viruslike particles as a vaccine delivery system: Myths and facts. Human vaccines. 2008;4(1):5-12.
20. Sakuragi S, Goto T, Sano K, Morikawa Y. HIV type 1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci. 2002;99(12):7956-61.
21. Norgan AP, Lee JR, Oestreich AJ, Payne JA, Krueger EW, Katzmann DJ. ESCRT-independent budding of HIV-1 Gag virus-like particles from Saccharomyces cerevisiae spheroplasts. PloS one. 2012;7(12):e52603.
22. Metz SW, Gardner J, Geertsema C, Le TT, Goh L, Vlak JM, et al. Effective chikungunya virus-like particle vaccine produced in insect cells. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(3):e2124.
23. Zhou Z-r, Wang M-l, Deng F, Li T-x, Hu Z-h, Wang H-l. Production of CCHF virus-like particle by a baculovirus-insect cell expression system. Virologica Sinica. 2011;26(5):338-46.
24. Mett V, Farrance CE, Green BJ, Yusibov V. Plants as biofactories. Biologicals. 2008;36(6):354-8.
25. Pushko P, Tumpey TM, Bu F, Knell J, Robinson R, Smith G. 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. 2005;23(50):5751-9.
26. Hassine IH, Gharbi J, Hamrita B, Almalki MA, Rodríguez JF, M'hadheb MB. Characterization of Coxsackievirus B4 virus-like particles VLP produced by the recombinant baculovirus-insect cell system expressing the major capsid protein. Mol Biol Rep. 2020;47(4):2835-43.
27. Matsuda T, Tanijima T, Hirose A, Masumi-Koizumi K, Katsuda T, Yamaji H. Production of influenza virus-like particles using recombinant insect cells. Biochem Eng J. 2020;163:107757.
28. Fuenmayor J, Gòdia F, Cervera L. Production of virus-like particles for vaccines. N Biotechnol. 2017;39:174-80.
29. Aires KA, Cianciarullo AM, Carneiro SM, Villa LL, Boccardo E, Pérez-Martinez G, et al. Production of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles by recombinant Lactobacillus

casei cells. Appl Environ Microbiol. 2006;72(1):745-52.
30. Tang X-C, Lu H-R, Ross TM. Baculovirus-produced influenza virus-like particles in mammalian cells protect mice from lethal influenza challenge. Viral Immunol. 2011;24(4):311-9.
31. Fontana D, Kratje R, Etcheverrigaray M, Prieto C. Immunogenic virus-like particles continuously expressed in mammalian cells as a veterinary rabies vaccine candidate. Vaccine. 2015;33(35.٤٦-٤٢٣٨:(
32. Wu C-Y, Yeh Y-C, Yang Y-C, Chou C, Liu M-T, Wu H-S, et al. Mammalian expression of virus-like particles for advanced mimicry of authentic influenza virus. PloS one. 2010;5(3):e9784.
33. Buffin S, Peubez I, Barrière F, Nicolaï M-C, Tapia T ,Dhir V, et al. Influenza A and B virus-like particles produced in mammalian cells are highly immunogenic and induce functional antibodies. Vaccine. 2019;37(46):6857-67.
34. Ramessar K, Capell T, Christou P. Molecular pharming in cereal crops. Phytochem Rev. 2008;7(3):579-92.
35. Yao J, Weng Y, Dickey A, Wang KY. Plants as factories for human pharmaceuticals: applications and challenges. Int J Mol Sci. 2015;16(12):28549-65.
36. Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. Trends Biotechnol. 2003;21(12):570-8.
37. Twyman RM. Host plants, systems and expression strategies for molecular farming. Molecular Farming. 2004:191-216.
38. Tschofen M, Knopp D, Hood E, Stöger E. Plant molecular farming: much more than medicines. Annu Rev Anal Chem. 2016 ; 12; 9 (1): 271-94.
39. Stoger E, Fischer R, Moloney M, Ma JK-C. Plant molecular pharming for the treatment of chronic and infectious diseases. Annu Rev Plant Biol. 2014;65:743-768.
40. Saldaña S, Guadarrama FE, Flores TDJO, Arias N, López S, Arias C, et al. Production of rotavirus-like particles in tomato (Lycopersicon esculentum L.) fruit by expression of capsid proteins VP2 and VP6 and immunological studies. Viral Immunol. 2006;19(1):42-53.
41. Slater A, Scott NW, Fowler MR. The genetic manipulation of plants. Plant Biotechnology Oxford, England: Oxford University Press. 2003.
42. Scotti N, Alagna F, Ferraiolo E, Formisano G, Sannino L, Buonaguro L, et al. High-level expression of the HIV-1 Pr55 gag polyprotein in transgenic tobacco chloroplasts. Planta. 2009;229(5):1109-22.
43. Pimentel TA, Yan Z, Jeffers SA, Holmes KV, Hodges RS, Burkhard P. Peptide nanoparticles as novel immunogens: design and analysis of a prototypic severe acute respiratory syndrome vaccine. Chem Biol Drug Des. 2009;73(1):53-61.

44. Ravin N, Kotlyarov RY, Mardanova E, Kuprianov V, Migunov A, Stepanova L, et al. Plant-produced recombinant influenza vaccine based on virus-like HBc particles carrying an extracellular domain of M2 protein. Biochemistry (Moscow). 2012;77(1):33-40.
45. Peyret H, Lomonossoff GP. The pEAQ vector series: the easy and quick way to produce recombinant proteins in plants. Plant Mol Biol. 2013;83(1-2):51-58.
46. D'Aoust MA, Couture MMJ, Charland N, Trepanier S, Landry N, Ors F, et al. The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. Plant Biotechnol J. 2010;8 (5):607-619.
47. Lebel M-È, Chartrand K, Leclerc D, Lamarre A. Plant viruses as nanoparticle-based vaccines and adjuvants. Vaccines. 2015;3(3):620-37.
48. Santos MJD, Carrillo C, Ardila F, Ríos RD, Franzone P, Piccone ME, et al. Development of transgenic alfalfa plants containing the foot and mouth disease virus structural polyprotein gene P1 and its utilization as an experimental immunogen. Vaccine. 2005;23(15):1838-43.
49. Liu L, Cañizares MC, Monger W, Perrin Y, Tsakiris E, Porta C, et al. Cowpea mosaic virus-based systems for the production of antigens and antibodies in plants. Vaccine. 2005;23(15):1788-92.
50. Narayanan KB, Han SS. Icosahedral plant viral nanoparticles-bioinspired synthesis of nanomaterials/nanostructures. Adv Colloid Interface Sci. 2017;248:1-19.
51. Syomin B, Ilyin Y. Virus-like particles as an instrument of vaccine production. Mol Biol. 2019;53(3):323-34.
52. Matić S, Rinaldi R, Masenga V, Noris E. Efficient production of chimeric human papillomavirus 16 L1 protein bearing the M2e influenza epitope in Nicotiana benthamiana plants. BMC Biotechnology. 2011;11(1):1-12.
53. C Thuenemann E, Lenzi P, J Love A, Taliansky M, Bécares M, Zuñiga S, et al. The use of transient expression systems for the rapid production of virus-like particles in plants. Curr Pharm Des. 2013;19(31):5564-73.
54. Ward BJ, Gobeil P, Séguin A, Atkins J, Boulay I, Charbonneau P-Y, et al. Phase 1 randomized trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19. Nature medicine. 2021;27(6):1071-8.
55. Ward BJ, Makarkov A, Séguin A, Pillet S, Trépanier S, Dhaliwall J, et al. Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18–64 years) and older adults (≥ 65 years): two multicentre, randomised phase 3 trials. The Lancet. 2020;396(10261):1491-503.
56. Rosales-Mendoza S. Will plant-made biopharmaceuticals play a role in the fight against COVID-19? Expert Opin Biol Ther. 2020;20(6):545-8.

Employment of virus-like particles in vaccines production

Hemmati-Dinarvand F[1], Malekshahi A[2], Afsharifar A[3], Hemmati-Dinarvand M[4*]

1. PhD Student of Plant Virology, Plant Virology Research Center, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

2. MSc of Medical Virology, Department of Medical Virology, School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

3. Professor of Plant Virology, Plant Virology Research Center, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

4. PhD Studen of Clinical Biochemistry, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, mohsen_h43@yahoo.com.

Received: *4 Sep 2021* Accepted: *24 Nov 2021*

Abstract

Background: Virus-Like Particles (VLPs) are nanostructures that are similar to their native virus in shape, size, and other morphological features, except that virus-like particles lack a genome. Virus-Like Particles cause a high humoral and cellular immune response due to repetitive structures in their body. Therefore, the use of these particles increases the body's immunity during production and consumption because they lack genomic materials. Several systems may be used to generate VLPs. The choice of production platform depends on several factors, including cost and the need for Post-Translational Modifications that may be necessary to generate an optimal immune response. In addition, plant viruses, due to their structure, are well able to stimulate the mammalian immune system; on the other hand, since they are not able to infect mammals, they can be considered a subset of VLPs. Some VLP-based vaccines and plant viruses have been designed and tested to prevent several infectious diseases; however, some are in the clinical or research phase. Interest in using VLPs to produce vaccines has recently increased due to its advantages over conventional vaccines. In this review, an attempt has been made to compare the advantages and disadvantages of VLP production systems.

Keywords: Expression system, Plant virus, Vaccine, Virus-Like Particle.

Citation: Hemmati-Dinarvand F, Malekshahi A, Afsharifar A, Hemmati-Dinarvand M. Comparison of virus-like particles (VLPs) in the production vaccines. Yafte. 2022; 23(5):52-64.