

## 病毒样颗粒疫苗研究进展

赵尉吏, 吕娜, 李会强, 何亚辉, 李露露, 梁明丽, 李岩异\*

华北制药金坦生物技术股份有限公司, 石家庄 050035

**摘要:** 病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)是含有某种病毒一个或多个结构蛋白的空心颗粒形态, 结构上类似完整病毒, 具有与完整病毒相似的免疫原性并通过激活抗原提呈细胞诱导免疫应答, 由于不含有完整的病毒基因组, 因此适用于开发更安全、成本更低的候选疫苗。系统阐述了VLPs的分类、表征、优势及表达系统, 回顾了VLPs疫苗的发展历程, 并汇总了已上市的疫苗品种。同时, 介绍了部分在研的预防性或治疗性VLPs疫苗, 并探讨了新的开发策略, 进一步拓宽了VLPs疫苗的研发领域, 为未来的研究与应用提供了更广阔的前景。

**关键词:** 病毒样颗粒; VLPs疫苗; 表征工具; 表达系统

**DOI:** 10.19586/j.2095-2341.2024.0069

中图分类号: Q939.47, R392.1 文献标志码: A

## Research Progress of Virus-like Particles Vaccine

ZHAO Weili, LYU Na, LI Huiqiang, HE Yahui, LI Lulu, LIANG Mingli, LI Yanyi\*

North China Pharmaceutical Jintan Biotechnology Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China

**Abstract:** Virus-like particles (VLPs) are hollow particles containing one or more structural proteins of a certain virus. Structurally similar to intact viruses, they possess immunogenicity similar to that of intact viruses and could induce immune responses by activating antigen-presenting cells. Due to the absence of viral genomes, VLPs can be developed into safer and more cost-effective vaccine candidates. This article systematically elaborated on the classification, characterization, advantages, and expression systems of VLPs, reviewed the development history of VLP vaccines, and summarized the varieties of vaccines that have been approved for market use. At the same time, it introduced some preventive or therapeutic VLP vaccines that were currently under research and development, and explored new development strategies, further broadening the field of VLP vaccine research and development, and providing broader prospects for future research and application.

**Key words:** virus-like particles; VLP vaccines; characterization tools; expression system

疫苗是控制和预防传染病<sup>[1]</sup>最有效的干预措施。一直到20世纪80年代, 传统的疫苗策略主要是制备减毒或灭活病毒, 两者都保持了良好的病毒颗粒性状和病毒表面蛋白, 且减毒活疫苗还能在体内复制, 从而有效地诱导中和抗体产生。这些疫苗能够诱导宿主体内产生效应B细胞和T细胞, 引起有效的免疫反应并维持免疫效力。尽管这两类疫苗都得到了广泛的应用, 但是其毒力强和灭活不完全的安全性问题仍然不容忽视。尤其是对于那些生物安全级别较高的病毒, 这两类疫

苗生产工艺较为复杂、成本较高, 因而亟需寻找疫苗开发的替代方法。

在此背景下, 病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)作为疫苗领域的一项重大创新, 逐渐崭露头角。VLPs由病毒的一个或多个结构蛋白自发组装而成, 呈现出空心颗粒的形态, 能够精准模拟天然病毒的复杂构象。它们在结构上与完整病毒相似, 却不含遗传物质, 因此完全无致病性, 从根本上解决了传统疫苗的安全性问题。更为重要的是, VLPs保留了与完整病毒相当的免疫原性, 能

收稿日期: 2024-04-01; 接受日期: 2024-06-03

联系方式: 赵尉吏 E-mail: 18003218172@163.com; \*通信作者 李岩异 E-mail: 1416305041@qq.com

够高效激活抗原提呈细胞,触发机体强烈的体液与细胞免疫应答,为疫苗开发提供了全新的、更为安全的平台。

## 1 VLP特性

### 1.1 分类

VLPs的结构具有多样性,分为无包膜型和有包膜型,不论是否有包膜都可以是由单层或多层、单个或多个蛋白组成的<sup>[4]</sup>。

无包膜的VLPs疫苗只包含由病毒蛋白形成的颗粒,结构简单的VLPs是一种无包膜的由单一衣壳蛋白组成的VLPs,可以在原核和真核表达系统中组装形成均一的VLPs,如由乙型肝炎抗原组装而成的VLP<sup>[5]</sup>;另一方面无包膜多衣壳蛋白VLPs的制备更为复杂和具有挑战性,通常在酵母等高等真核宿主中产生,单层无包膜VLPs可以由单个蛋白或两个蛋白组成,如豇豆花叶病毒VLPs<sup>[6]</sup>。双层无囊膜VLPs可以由两个及以上蛋白组装而成,如L1和L2蛋白组成的HPV-VLPs<sup>[7]</sup>,或者4个蛋白的口蹄疫病毒<sup>[8]</sup>。蓝舌病病毒<sup>[9]</sup>和轮状病毒的VLPs<sup>[10]</sup>均是由多种相互作用的衣壳蛋白在异源宿主中成功组装成的多层VLPs,由4种外壳蛋白形成的三层VLPs。

一般来说,有包膜的病毒除了病毒本身的蛋白外,还包含宿主的细胞膜,包被的VLPs在从细胞中组装和出芽VLPs的过程中从表达细胞系获得其脂质膜。一个或多个类型的糖蛋白刺突可嵌入脂质双分子层中,这些糖蛋白是产生中和抗体的目标免疫抗原。这类VLPs在结构上不如无包膜VLPs均匀,生物物理特性较差。流感病毒VLPs<sup>[11]</sup>是研究最多的包膜VLPs,通常由基质M1蛋白组成,糖蛋白血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)嵌入脂质双分子层。

### 1.2 表征工具

VLPs的重要表征涵盖了多个方面,包括生物化学、生物物理以及生物学特性。这些表征对于理解和评估VLPs的结构、稳定性以及免疫原性至关重要,为VLPs在疫苗研发等领域的应用提供了关键信息。在生物化学特性方面,VLPs的表征主要包括分子量、氨基酸序列和纯度。常用的方法包括质谱(mass spectrum, MS)法、十二烷基硫酸

钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)、反相高效液相色谱(reversed-phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC)、琼脂糖凝胶试验<sup>[12-15]</sup>。在生物物理特性方面,VLPs的表征主要包括形态、大小以及稳定性。主要方法有透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)、冷冻电镜(cryo electron microscopy, Cryo-EM)和原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)超速离心法、动态光散射(dynamic light scattering, DLS)、圆盘离心粒度分析(disk centrifugal particle size analysis, DCP)、电喷雾微分迁移率分析(electrospray differential mobility analysis, ES-DMA)、非对称场流-光散射绝对分子量色谱系统(asymmetric flow field-flow fractionation coupled with multiple-angle light scattering, AF4-MALS)等技术<sup>[16-19]</sup>。在生物学特性方面,VLPs的表征在于活性评估。主要方法有酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、斑点杂交、免疫沉淀或免疫扩散试验、表面等离子体共振(surface plasma resonance, SPR)等技术<sup>[20]</sup>。

### 1.3 优势

VLPs疫苗与其他常见的疫苗种类相比,其特点鲜明,具体优点体现在以下几个方面。

**1.3.1 高度免疫原性** VLPs的重复表面几何结构被认为是病原体相关的结构模式(pathogen associated structural pattern, PASP)<sup>[21]</sup>,其结构上与病毒极为相似,因此能够精确地模拟天然病毒在生物体内的行为。作为20~200 nm大小的颗粒抗原,VLPs能够迅速被排入淋巴结(lymph nodes, LNs),并与抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APCs)和B细胞发生密切相互作用<sup>[22]</sup>。这种相互作用强烈地刺激免疫系统,诱导强烈的免疫应答,从而使VLPs疫苗能够提供更为高效和全面的免疫保护。Roy等<sup>[23]</sup>对绵羊分别接种蓝舌病毒(bluetongue virus, BTV)VLPs、仅含有BTV外衣壳蛋白VP2的制剂,以及VP2和VP5两种病毒外衣壳蛋白的组合制剂,结果显示100 mg VP2单独使用对强毒攻毒保护作用有限,而50 mg VP2与25 mg VP5联合使用则能完全保护。相比之下,仅含1~2 mg VP2的10 mg VLPs展现出相似的保护水平,这些发现证明了VLP中的抗原因其更接近天然构象,相比分离的病毒蛋白能更有效地激

发免疫反应。

**1.3.2 安全性高** 由于VLPs不含编码病毒蛋白的复制酶和核酸,因此不具有感染性和复制能力,从根本上消除了疫苗本身引发疾病的风险,相比一些传统疫苗可能包含弱化或灭活的病毒,虽然经过处理但仍存在一定的安全隐患<sup>[24]</sup>。

**1.3.3 通用性强** 适用于多种病原体,如乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)、人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)、噬菌体(Q $\beta$ 、AP205、MS2、PP7)、黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CuMV)、豇豆褪绿叶病毒(cowpea chlorotic mosaic virus, CCMV)、兔出血性病毒(rabbit haemorrhagic disease virus, RHDS)和犬细小病毒(canine parvovirus, CPV)等;靶点丰富,利用化学偶联和基因融合技术<sup>[25]</sup>可以有效地修饰其表面的表位,而VLPs的高度阵列化结构则能够确保异源抗原表位有序且重复地呈现在颗粒表面,进一步提升其免疫原性<sup>[26]</sup>。

**1.3.4 稳定性好** VLPs结构本身具备较高的稳定性。在生产过程中,通过引入亚基间的二硫键<sup>[27]</sup>以及应用冻干或喷雾干燥技术,可以进一步提升其稳定性。这不仅使VLPs疫苗在运输和储存过程中更为便捷,还有效延长了疫苗的有效期。

**1.3.5 大规模生产** 因其高效的生产流程易于实现大规模生产,能够保持稳定的质量和效果,且成本效益显著<sup>[28]</sup>。

## 2 VLPs表达系统

约170种不同的宿主表达系统可表达VLPs,包括细菌、昆虫、酵母及哺乳动物,这意味着作用宿主的多种病毒均有可能制备成VLPs。

### 2.1 原核表达系统

近30%的VLPs是用原核表达系统生产的,大肠杆菌是应用较为广泛的原核表达系统,通常用于表达重组蛋白,如重组人胰岛素、重组人生长激素等小蛋白或肽,能够很容易从包涵体中重新折叠。尽管VLPs可高效表达蛋白且生产成本低、安全性高,但原核表达系统中表达的蛋白质无法进行复杂的翻译后修饰,对VLPs的化学性质、四级结构以及与其他大分子物质的相互作用都有影响,因而不能表达复杂的VLPs;大肠杆菌可以表达无囊膜的VLPs,通常为病毒的结构蛋白,表达

后经过自组装形成VLPs。

### 2.2 酵母表达系统

酵母表达系统由于生长迅速、外源蛋白表达量高,因而被广泛用于无囊膜VLPs疫苗的生产,最常使用的是酿酒酵母、毕赤酵母和汉逊酵母,外源基因通过同源重组整合到酵母基因组中,在诱导条件下调控外源基因高水平表达,具备翻译后修饰的能力,如正确折叠蛋白、形成二硫键,但糖基化修饰与哺乳类细胞表达系统相比有所差异,且常见的诱导剂为甲醇,发酵过程中对甲醇的使用可能会造成积累,增大了处理压力。Sasagawa等<sup>[29]</sup>在裂殖酵母中合成了人乳头瘤病毒6型和16型的衣壳蛋白,并产生了病毒样颗粒,电镜显示这些VLPs在结构上与天然HPVs颗粒相似。

### 2.3 昆虫细胞表达系统

昆虫细胞表达系统具有独特的生物学特性,广泛使用的是Bac-to-Bac系统,利用Tn7转座子的位点特异性转座特性来简化和增强产生重组Bacmid DNA<sup>[30]</sup>。利用杆状病毒作为外源基因表达载体有许多优势,能够容纳较大的外源基因,特异性强,与哺乳动物细胞相比成本更低,能够进行翻译后修饰,糖基化的糖链包含数个甘露糖或海藻糖的寡糖类。由于杆状病毒和VLP同时表达难以分离,且杆状病毒的存在容易造成污染,纯化下游必须经过化学灭活等处理消除杆状病毒的污染,但与此同时可能会对VLP质量造成损害。1987年Estes等<sup>[31]</sup>首次构建了插入猴轮状病毒基因的杆状病毒表达载体,感染甜菜夜蛾细胞后能够高表达VP6蛋白并自发组装成亚单位,保持了天然抗原决定簇。

### 2.4 哺乳动物表达系统

哺乳动物细胞表达系统有较强的蛋白质翻译后修饰功能,能够正确的折叠肽链,有效的识别蛋白质合成、加工和分泌的信号,精确地进行糖基化、磷酸化修饰,使得蛋白质具有完整的结构和功能。由于上下游的复杂性导致生产成本高、可控性和生产率较低,不适用于蛋白质的大规模生产。Bettenbaugh等<sup>[32]</sup>通过使用两种重组杆状病毒(一种编码乙型肝炎表面抗原HBsAg,一种编码丁型肝炎抗原基因L-HDAg)共转导BHK细胞来组装丁型肝炎病毒样颗粒(hepatitis delta virus-VLP, HDV-VLP),在大小和外观上类似于真实的病毒粒子,组装效率取决于细胞系、杆状病毒构建体和两种

重组病毒的相对剂量。

## 2.5 植物细胞表达系统

植物病毒表达系统通过植物病毒载体瞬时转染植物细胞表达重组蛋白。VLPs可以在多种植物细胞中产生,如马铃薯、番茄、大豆、烟草等。植物细胞表达系统具有上下游加工成本低、易于大规模和安全性高等特点,但由于表达水平低且缺乏调控因子促使蛋白聚集,在VLP组装和稳定性方面较差,体内递送过程易出现抗原降解。基于植物的VLPs结构简单,一般不超过一种重组蛋白。

## 3 商业化VLPs疫苗

迄今为止,已有多种VLPs疫苗实现商业化,是一种已经被认可的安全有效的疫苗。

### 3.1 乙型肝炎病毒疫苗

乙型肝炎病毒(HBV)可引起慢性感染,并可能引发肝硬化和肝癌。该病毒包膜蛋白基因编码3个乙肝病毒表面抗原,分别为S蛋白、pre-S1蛋白和pre-S2蛋白。

第一代HBV疫苗于1981年在Bulmberg的基础上获得批准,Bulmberg因在感染患者血清中发现了乙型肝炎表面抗原(HBsAg)而被授予诺贝尔奖<sup>[33]</sup>,但出于生物安全考虑,该血源疫苗于1986年

被改良的HBsAg重组疫苗所取代,由默沙东公司开发的第一款HBV重组疫苗(第二代)获批上市,采用重组DNA的方法,在酵母系统中表达HBsAg单体自组装成二十面体的VLP颗粒。有研究表明,酵母来源的HBsAg VLPs大小约22 nm<sup>[34]</sup>,其中60%~70%由HBsAg单体蛋白组成,其余由脂质组成<sup>[35]</sup>。总体而言,形成的VLPs具有高度免疫原性,能够诱导产生有效的中和抗体,并且是一种缺乏病毒基因组<sup>[24]</sup>的安全疫苗,然而使用单一抗原(HBsAg的小S抗原)进行疫苗接种具有一定的局限性,30%~40%的成年人在接种2剂疫苗后达到血清保护,但10%的人即使在接种第三剂<sup>[36]</sup>后可能也无法达到这一水平。

美国食品及药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的由VBI开发的第三代HBV疫苗PreHevBrio在哺乳动物细胞中表达HBV的3种表面抗原:S、pre-S1和pre-S2。Ⅲ期临床试验证实,即使在老年人和慢性病患者中,该疫苗也具有较高的免疫原性<sup>[37]</sup>。研究得出结论,与单一抗原疫苗在第三剂次疫苗接种后4周相比,该疫苗在血清保护率方面具有非劣效性,接种2剂或3剂次后的血清保护率高于接种传统乙肝疫苗(对照组)后的血清保护率。表1总结了目前已上市的HBV VLPs疫苗。

表1 已上市的HBV VLPs疫苗  
Table 1 HBV based on VLPs on the market

药品名称	上市时间	抗原表位	表达系统	佐剂	生产商
Engerix-B®	1989	S抗原	酿酒酵母	氢氧化铝	英国葛兰素史克公司
Fendrix®	2005	S抗原	酿酒酵母	AS04	英国葛兰素史克公司
Heplisav-B®	2017	S抗原	汉逊酵母	CpG1018	美国德纳维制药公司
Recombivax HB®	2018	S抗原	酿酒酵母	硫酸铝	美国默沙东公司
PreHevbrio®(Sci-B-Vac)	2021	S抗原、pre-S1抗原和pre-S2抗原	哺乳动物(CHO细胞)	氢氧化铝	美国VBI疫苗公司

### 3.2 人乳头瘤病毒(HPV)疫苗

人乳头瘤病毒(HPV)感染容易引起女性宫颈癌病变,在恶性肿瘤中,宫颈癌的发病率约为十万分之二,仅次于乳腺癌。该病毒无包膜,L区基因编码主要衣壳蛋白L1和次要衣壳蛋白L2,不论是单独的L1蛋白还是L1蛋白与L2蛋白结合,都能够自动装配成VLP。HPV病毒亚型多达100多种,其中16型和18亚型属于高危型。

Gardasil®是首个获批的四价人乳头瘤病毒

(HPV)预防性疫苗,2006年获美国FDA批准上市,2017年在我国国内获批,通过重组酿酒酵母表达L1蛋白组成VLP,能够预防4种HPV病毒(6型、11型、16型和18型),Gardasil9®在Gardasil®基础上新增了5种亚型(31型、33型、45型、52型、58型)<sup>[38]</sup>,于2018年在国内获批。2022年8月,九价HPV疫苗适用人群拓展至9~45岁。Cervarix®和Cecolin®都是针对HPV16和HPV18的二价HPV疫苗,馨可宁®由我国厦门万泰沧海公司研发,在

大肠杆菌中成功表达,在小鼠、山羊和兔子中显示出高免疫原性<sup>[39]</sup>,2019年获批上市,并于2021年通过了世界卫生组织(World Health Organization, WHO)的产品预认证。需要注意的是,基因重组表达的由单体L1蛋白自组装的VLP大小形态各异,稳定性较差,因此在纯化工艺中会先解

聚成单体L1蛋白,再重新装配成颗粒均一的VLPs,质量更稳定,具有更佳的免疫原性。HPV疫苗是安全的,局部不良反应如肿胀、疼痛、发红等,在短期内大多是轻微和可逆的。全身性反应较少见,可能包括恶心、发烧、头痛和疲劳等(表2)<sup>[40]</sup>。

表2 已上市的HPV VLPs疫苗

Table 2 HPV prophylactic vaccines based on VLPs on the market

药品名称	上市时间	抗原表位	表达系统	佐剂	生产商
Cervarix <sup>®</sup>	2006	L1 HPV 16 L1 HPV 18	昆虫-杆状病毒	氢氧化铝 ASO4	英国葛兰素史克公司
Gardasil <sup>®</sup>	2009	L1 HPV 6 L1 HPV 11 L1 HPV 16 L1 HPV 18	酿酒酵母	羟基磷酸硫酸铝	美国默沙东公司
Gardasil9 <sup>®</sup>	2014	L1 HPV 6 L1 HPV 11 L1 HPV 16 L1 HPV 18 L1 HPV 31 L1 HPV 33 L1 HPV 45 L1 HPV 52 L1 HPV 58	酿酒酵母	羟基磷酸硫酸铝	美国默沙东公司
馨可宁 <sup>®</sup>	2019	L1 HPV 16 L1 HPV 18	大肠杆菌	氢氧化铝	厦门万泰
沃泽惠 <sup>®</sup>	2022	L1 HPV 16 L1 HPV 18	毕赤酵母	磷酸铝	沃森生物

### 3.3 戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)疫苗

在中国、印度、肯尼亚、苏丹、尼泊尔和孟加拉国等国家有50%以上的急性病毒性肝炎是由戊型肝炎病毒(HEV)引起的<sup>[41]</sup>。研究估计,全球每年有3500万HEV病例,平均死亡率为0.2%~4.0%,而孕妇的平均死亡率高达25%<sup>[42]</sup>。HEV是一种无包膜病毒,大小为27~35 nm,分为I、II、III和IV<sup>[43]</sup>4种不同的基因型。基因型I和II型仅限于人类,而基因型III和IV型则可感染其他哺乳动物,它们随后可将病毒传播给人类。该病毒的正链RNA基因组包含3个开放阅读框,其中一个编码病毒衣壳蛋白,该衣壳由3个结构域组成,即壳结构域(S)和两个突出结构域(P1, P2)<sup>[44]</sup>。Hecolin<sup>®</sup>于2012年在中国获批,该疫苗由厦门万泰沧海公司研发,在大肠杆菌中表达重组抗原P239,自动组装

成20~30 nm大小的VLPs<sup>[45]</sup>。形成的VLPs在小鼠和恒河猴中都具有高度免疫原性。Hecolin<sup>®</sup>在人体中表现出良好的安全性和100%有效性。目前正在评估疫苗在高危人群中的安全性和有效性<sup>[46]</sup>。

### 3.4 疟疾疫苗

疟疾是一种由疟原虫引起的通过以按蚊为主要媒介传播的全球性急性寄生虫传染病。WTO数据显示,2022年全球约有2.49亿例疟疾病例,死亡人数约为60.8万人。其中非洲地区受疟疾影响最严重,其病例占全球总数的94%,死亡人数占全球的95%,该地区疟疾死亡人数的80%为5岁以下儿童。RTS,S/AS01(Mosquirix<sup>™</sup>)是全球第一款疟疾疫苗。将恶性疟原虫外壳蛋白的主要成分环孢子抗原CSP与HBsAg融合作为载体组装成VLPs,

经纯化,添加 AS01 佐剂制备成疫苗<sup>[47]</sup>。2021 年 10 月,WHO 建议在撒哈拉以南的非洲和中高恶性疟原虫传播地区的儿童中广泛使用 RTS,S/AS01 疫苗。2023 年 12 月,R21/Matrix-M 被列入 WTO 资格预审疫苗清单,这是全球第二款疟疾疫苗,这两种疫苗都被证明在预防儿童疟疾方面是安全有效的。

## 4 在研 VLPs 疫苗

迄今为止,全球已经开发了多种不同类型的 VLPs,其中包括结构简单的病毒的 VLPs,如人乳头瘤病毒、犬细小病毒、诺如病毒或戊型肝炎病毒;也包括具有脂质包膜的 VLPs,如乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、埃博拉病毒、单纯疱疹病毒、呼吸道合胞病毒、人免疫缺陷病毒或裂谷热病毒等;还包括具有多个蛋白质层的 VLPs,如脊髓灰质炎病毒、肠病毒 71 型、蓝舌病毒或轮状病毒 VLPs 等。本节介绍了部分预防性或治疗性 VLPs 疫苗研发的最新进展。

### 4.1 新型冠状病毒疫苗

近几年由严重呼吸综合征冠状病毒-2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)引起的新型冠状病毒感染(coronavirus disease 2019, COVID-19)(简称新冠病毒)备受关注。冠状病毒是一个大型病毒家族,除了 COVID-19,还可引起中东呼吸综合征(middle east respiratory syndrome, MERS)和重症急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)等多种呼吸道传染性疾病<sup>[48]</sup>。目前世界范围内共有 50 多种新冠病毒疫苗获批,还有数百种疫苗处于临床试验阶段,尽管如此,随着变异株的不断涌现,仍然需要不断开发有效的、可拓展的疫苗。新冠病毒的 S 蛋白受体结构域(receptor binding domain, RBD)与人体细胞表面受体血管紧张素转化酶 2(angiotensin converting enzyme, ACE2)蛋白结合从而介导病毒进入细胞内部,是开发的重要靶点。利用 VLP 平台开发的疫苗已经作出了许多努力, Mohsen 团队建立了 CuMVTT 的 VLP 疫苗平台,通过基因融合方法将破伤风毒素(tetanus toxin, TT)表位融合至黄瓜花叶病毒样颗粒(CuMV),TT 能够增强 B 细胞和 TH 细胞的相互作用,此外还装配了 TLR7/8 激动剂诱导免疫应答,该平台已被证明在小鼠、猫、狗、兔和马中具有高度免疫原性<sup>[49]</sup>;利用这个

平台将 SARS-CoV-2 的 RBM 基因融合到 CuMVTT-VLPs,在大肠杆菌中表达了嵌合型 VLP 疫苗,称为 CuMVTT-RBM,可实现大规模生产(每 1 000 L 发酵制备 250 万剂),在 4 °C 下可稳定储存 14 个月,在小鼠和兔中诱导了较高的抗 RBD 抗体滴度和抗刺突抗体滴度<sup>[28]</sup>。Yilmaz 等<sup>[50]</sup>利用 HEK293 细胞表达了 SARS-CoV-2 的 S-6p、N、M 和 E 结构蛋白,并吸附于 K 型 CpG ODN 佐剂,获得了 4 种结构蛋白的囊泡状 VLPs,结果表明接种疫苗的动物能有效产生 S 抗体、RBD 抗体和 N IgG 抗体,为有效预防肺组织的病变,该疫苗正在进行 II 期临床试验。英国葛兰素史克公司(Glaxosmithkline, GSK)与 Medicago 公司合作的产品 Covifenz<sup>[51]</sup>,是第一款植物源性的重组新冠病毒疫苗,利用本氏烟表达 S 蛋白,自发组装成 CoVLPs,并结合 AS03 佐剂,在免疫原性方面两个年龄组 18~64 岁及 65 岁以上人群都诱导出了 10 倍于康复者血清的中和抗体滴度,2022 年在加拿大获批上市,由于受到需求和市场环境等形势的影响,不再推进商业化。

### 4.2 诺如疫苗

诺如病毒(norovirus, NV)感染可引起人和动物发生急性肠胃炎,主要表现症状为腹泻、发热或呕吐,严重可能导致死亡。NV 直径约 25~35 nm,单股正链无包膜二十面体 RNA 病毒,包含 3 个开放阅读框(open reading frame, ORF),ORF2 编码病毒衣壳蛋白 VP1,相对分子质量约 56 kD,VP1 能够与受体组织血型抗原(HBGAs)结合,通过内吞作用进入细胞<sup>[52]</sup>,因此,在疫苗设计的过程中研究者们常将 VP1 作为关键的靶点,以期提高疫苗对 NV 病毒的免疫防御效果,从而实现有效的预防和控制。目前,全球有 8 款诺如病毒疫苗已进入临床试验阶段,其中有 5 款为 VLP 疫苗,我国有 3 款 VLP 疫苗。进展最快的是兰州生物制品研究所和国药中生生物技术研究院共同开发的由汉逊酵母表达的双价诺如病毒疫苗(G I .1、G II .4),该疫苗于 2023 年 5 月开展 III 期临床试验;安徽智飞龙科马利用毕赤酵母生产的四价 VLP 疫苗(G I .1、G II .3、G II .4、G II .17)正在进行 II 期临床试验;2024 年 1 月,康华生物发布公告将重组六价诺如病毒疫苗(G I .1、G II .2、G II .3、G II .4、G II .6 和 G II .17)的海外权益授权给 HilleVax 公司,该疫苗理论上可以预防 90% 以上的诺如病毒引起的感染,2023 年分别在澳大利亚和美国取得临床试验许可。

### 4.3 流感疫苗

由流感病毒引起的流行性感感冒多以高热、头痛、咳嗽、全身肌肉酸痛为主,传染性强、发病率高,病毒表面糖蛋白血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)是疫苗研发的主要靶点,除此之外还有包膜蛋白 M2、基质蛋白(matrix protein, M)和核蛋白(nucleoprotein, NP)。HA 由一个球状的头部和一个茎共同组成。目前已上市的季节性流感疫苗以 HA 的头部为目标靶位进行中和,然而 HA 易发生变异,因此需要不断开发新的疫苗<sup>[53]</sup>。

Buffin 等<sup>[54]</sup>的研究表明,哺乳动物的 VLPs 在抗原呈递和生物学特性方面都接近于真实的病毒颗粒的外部。通过瞬时转染 CHO-K1、Vero 或 293 T 细胞系,表达 HA、NA 和基质 M 蛋白,制备了流感 VLPs,经过生物反应器生产和纯化,筛选出了两款由 239T 表达的 VLPs,对 BALB/c 小鼠进行肌肉注射,VLPs 在低剂量时具有高度的免疫原性。Alain 等<sup>[55]</sup>将 M2 蛋白的多肽融合到 AP205 噬菌体外壳蛋白的 N 端或 C 端组装成 VLPs,在体内暴露于 AP205 噬菌体 N 端的 M2 蛋白肽可在免疫时产生强烈的特异性抗体反应,保护 100% 的小鼠免受致命流感感染。

### 4.4 人类免疫缺陷病毒疫苗

艾滋病是由人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)引起的全身性疾病,HIV 会侵犯人体的免疫系统,破坏 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞造成免疫功能缺失,易并发各种感染和肿瘤,最终导致死亡。HIV 已成为一个主要的全球公共卫生问题,尽管抗病毒药物有能力控制该病毒,但目前迫切需要一种针对艾滋病毒的治疗性疫苗,旨在针对那些在患者体内持续存在的 HIV,提供有效的治疗方案。Myint 团队将 HIV-1 的 *gag* 基因克隆至杆状病毒载体的多克隆位点,构建了 pAcCAG-*gag* 载体,利用重组杆状病毒感染 HeLa 细胞制备 Gag-VLPs<sup>[56]</sup>,被证实刺激人单核细胞来源的树突状细胞(dendritic cell, DC),会产生干扰素  $\alpha$ (IFN- $\alpha$ ),同时增加了 A3G 和 A3F 的蛋白质表达,抑制 HIV-1 复制<sup>[57]</sup>。

## 5 展望

作为高度模拟自然病毒颗粒的疫苗形式,VLPs 已经展现出强大的免疫原性和安全性,在应

用领域方面,VLPs 疫苗具有广泛的潜在应用。VLP 疫苗在应对新兴和重新出现的传染病方面有着广阔的应用前景。例如,针对新冠病毒等变异迅速、传播广泛的病毒,VLP 疫苗可以作为一种快速、高效的应对策略。除了传统的传染病预防领域外,VLPs 疫苗还可以应用于癌症的预防和治疗、自身免疫性疾病治疗等领域。例如,通过构建表达肿瘤相关抗原的 VLPs,可以诱导机体产生针对肿瘤细胞的免疫反应,从而达到治疗癌症的目的。此外,VLPs 疫苗还可以用于开发针对新型病原体的疫苗,为应对突发公共卫生事件提供有力武器。

VLPs 疫苗的开发策略是多样化的。一方面,利用病毒表面结构蛋白的自组装特性,使这些蛋白在体外形成类似病毒颗粒的结构,从而模拟真实病毒,激发强效免疫反应。另一方面,构建 VLPs 载体平台也是一项重要的策略。通过基因融合或化学偶联的方式,可以将目标抗原有效地展示在 VLPs 载体表面,从而展现出良好的免疫原性。无论是使用天然的还是经过改造的 VLPs 载体,结合目标抗原的设计都为 VLPs 疫苗的开发提供了新的视角,这一策略不仅为自组装型抗原的开发提供了支持,也为非自组装型抗原转化为 VLPs 疫苗提供了可能性。

要实现 VLPs 疫苗的广泛应用和持续优化,仍需克服一系列技术和应用上的障碍。首先,挑战之一是提升 VLPs 疫苗的生产效率和稳定性。虽然现有的表达系统如细菌、酵母和哺乳动物细胞等已经能够支持 VLPs 的大规模生产,但成本、产量和纯度仍然是限制其广泛应用的关键因素。未来,研究人员可能需要进一步探索新的表达系统和工艺优化策略,以提高 VLPs 疫苗的生产效率和降低成本。同时,对于 VLPs 的稳定性研究也至关重要,以确保疫苗在储存和运输过程中的有效性。其次,抗原设计和呈现方式也是 VLPs 疫苗研究的重要方向。VLPs 能够展示多个病毒抗原,但如何选择合适的抗原、如何优化其在 VLPs 表面的排列和密度,以及如何模拟自然病毒的感染过程,都是值得深入研究的问题。通过深入研究病毒与宿主细胞的相互作用,以及免疫系统的识别和应答机制,我们可以设计出更加精准和有效的 VLPs 疫苗,以诱导出更强烈、更持久的免疫应答。

针对当前面临的技术和应用障碍,我们可以

从以下几个方面进行解决。首先,加强跨学科的合作与交流,整合生物学、医学、工程学等多学科的知识与资源,共同推动VLPs疫苗研究的发展。其次,利用新兴的技术手段如基因编辑、合成生物学和纳米技术等,对VLPs疫苗的生产工艺和抗原设计进行创新和优化。再次,建立严格的质量控制体系 and 安全性评价体系,确保VLPs疫苗的安全性和有效性。

综上所述,VLPs疫苗研究的未来方向充满了无限的可能和挑战。通过不断提升生产效率、优化抗原设计、拓展应用领域以及解决当前面临的技术和应用障碍,我们有望开发出更加高效、安全和应用广泛的VLPs疫苗,为人类的健康事业做出更大的贡献。

### 参 考 文 献

- [1] KUSHNIR N, STREATFIELD S J, YUSIBOV V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development[J]. *Vaccine*, 2012, 31(1): 58-83.
- [2] KLEID D G, YANSURA D, SMALL B, *et al.* Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine[J]. *Science*, 1981, 214(4525): 1125-1129.
- [3] LMICHEL M, TIOLLAIS P. Hepatitis B vaccines: protective efficacy and therapeutic potential[J]. *Pathol. Biol. (Paris)*, 2010, 58(4): 288-295.
- [4] LINDA H, LUA L, FRANK S, *et al.* Bioengineering virus-like particles as vaccines[J]. *Biotechnol. Bioengin.*, 2014, doi:10.1002/bit.25159[2024-08-02]. <https://doi.org/10.1002/bit.25159>.
- [5] WHITACRE D C, LEE B O, MILICH D R. Use of hepadnavirus core proteins as vaccine platforms[J]. *Expert Rev. Vaccines*, 2009, 8(11): 1565-1573.
- [6] SAUNDERS K, SAINSBURY F, LOMONOSSOFF G P. Efficient generation of cowpea mosaic virus empty virus-like particles by the proteolytic processing of precursors in insect cells and plants[J]. *Virology*, 2009, 393(2): 329-337.
- [7] KIRNBAUER R, TAUB J, GREENSTONE H, *et al.* Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles[J]. *Int. J. Mol. Sci.*, 1993, 67(12): 6929-6936.
- [8] PORTA C, KOTECHEA A, BURMAN A, *et al.* Rational engineering of recombinant picornavirus capsids to produce safe, protective vaccine antigen[J/OL]. *PLoS Pathog.*, 2013, 9(3): e1003255[2024-08-02]. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003255>.
- [9] HEWAT E A, BOOTH T F, ROY P. Structure of correctly self-assembled bluetongue virus-like particles[J]. *J. Struct. Biol.*, 1994, 112(3): 183-191.
- [10] CONNER M E, ZARLEY C D, HU B, *et al.* Virus-like particles as a rotavirus subunit vaccine[J]. *J. Interv. Cardiol.*, 1996, 174(Suppl 1): S88-S92.
- [11] KANG S M, KIM M C, COMPANS R W. Virus-like particles as universal influenza vaccines[J]. *Expert Rev. Vaccines*, 2012, 11(8): 995-1007.
- [12] FREIVALDS J, DISLERS A, OSE V, *et al.* Highly efficient production of phosphorylated hepatitis B core particles in yeast *Pichia pastoris*[J]. *Protein Expr. Purif.*, 2011, 75(2): 218-224.
- [13] KALNCIEMA I, SKRASTINA D, OSE V, *et al.* Potato virus Y-like particles as a new carrier for the presentation of foreign protein stretches[J]. *Mol. Biotechnol.*, 2012, 52(2): 129-139.
- [14] IBANEZ L I, ROOSE K, DE FILETTE M, *et al.* M2e-displaying virus-like particles with associated RNA promote T helper 1 type adaptive immunity against influenza A[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59081[2024-08-02]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059081>.
- [15] SAINSBURY F, SAUNDERS K, ALJABALI A A A, *et al.* Peptide-controlled access to the interior surface of empty virus nanoparticles[J]. *ChemBioChem*, 2011, 12(16): 2435-2440.
- [16] KUZNETSOV Y G, MCPHERSON A. Atomic force microscopy in imaging of viruses and virus-infected cells[J]. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2011, 75(2): 268-285.
- [17] ZHAO Q, ALLEN M J, WANG Y, *et al.* Disassembly and reassembly improves morphology and thermal stability of human papillomavirus type 16 virus-like particles[J]. *Nanomedicine*, 2012, 8(7): 1182-1189.
- [18] EMILHIET P, DOSSET P, GODEFROY C, *et al.* Nanoscale topography of hepatitis B antigen particles by atomic force microscopy[J]. *Biochimie*, 2011, 93(2): 254-259.
- [19] PEASE L F, LIPIN D I, TSAI D H, *et al.* Quantitative characterization of virus-like particles by asymmetrical flow field flow fractionation, electrospray differential mobility analysis, and transmission electron microscopy[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, 102(3): 845-855.
- [20] DESCHUYTENEER M, ELOUAHABI A, PLAINCHAMP D, *et al.* Molecular and structural characterization of the L1 virus-like particles that are used as vaccine antigens in Cervarix™, the AS04-adjuvanted HPV-16 and-18 cervical cancer vaccine[J]. *Hum. Vaccin.*, 2010, 6(5): 407-419.
- [21] SHAH K, CHAUBEY P, MISRA N. Bioinformatics approach for screening and modeling of putative T cell epitopes from Por B protein of *Neisseria meningitidis* as vaccine constructs[J]. *Indian J. Biotechnol.*, 2010, 9(4):351-359.
- [22] MOHSEN M O, GOMES A C, CABRAL-MIRANDA G, *et al.* Delivering adjuvants and antigens in separate nanoparticles eliminates the need of physical linkage for effective vaccination[J]. *J. Control. Release*, 2017, 251: 92-100.
- [23] NOAD R, ROY P. Virus-like particles as immunogens[J]. *Trends Microbiol.*, 2003, 11(9): 438-444.
- [24] BACHMANN M F, JENNINGS G T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns[J]. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, 10(11): 787-796.
- [25] MOHSEN M O, ZHA L, CABRAL-MIRANDA G, *et al.* Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines[J]. *Semin. Immunol.*, 2017, 34: 123-132.
- [26] FRIETZE K M, PEABODY D S, CHACKERIAN B. Engineering virus-like particles as vaccine platforms[J]. *Curr. Opin. Virol.*, 2016, 18: 44-49.
- [27] FIEDLER J D, HIGGINSON C, HOVLID M L, *et al.* Engineered mutations change the structure and stability of a virus-like particle[J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13(8): 2339-2348.

- [28] MOHSEN M O, BALKE I, ZINKHAN S, *et al.* A scalable and highly immunogenic virus-like particle-based vaccine against SARS-CoV-2[J]. *Allergy*, 2022, 77(1): 243-257.
- [29] SASAGAWA T, PUSHKO P, STEERS G, *et al.* Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6 and type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Virology*, 1995, 206(1): 126-135.
- [30] LUCKOW V A, LEE S C, BARRY G F, *et al.* Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*[J]. *J. Virol.*, 1993, 67(8): 4566-4579.
- [31] ESTES M L, EWING-WILSON D, CHOU S M, *et al.* Chloroquine neuromyotoxicity. clinical and pathologic perspective[J]. *Am. J. Med.*, 1987, 82(3): 447-455.
- [32] BETENBAUGH M, YU M, KUEHL K, *et al.* Nucleocapsid- and virus-like particles assemble in cells infected with recombinant baculoviruses or vaccinia viruses expressing the M and the S segments of Hantaan virus[J]. *Virus Res.*, 1995, 38(2-3): 111-124.
- [33] ROLDÃO A, MELLADO M C M, CASTILHO L R, *et al.* Virus-like particles in vaccine development[J]. *Expert Rev. Vaccines*, 2010, 9(10): 1149-1176.
- [34] GURRAMKONDA C, ADNAN A, GÄBEL T, *et al.* Simple high-cell density fed-batch technique for high-level recombinant protein production with *Pichia pastoris*: application to intracellular production of hepatitis B surface antigen[J/OL]. *Microb. Cell Fact.*, 2009, 8: 13[2024-08-02]. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-13>.
- [35] GAVILANES F, GONZALEZ-ROS J M, PETERSON D L. Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins[J]. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257(13): 7770-7777.
- [36] PARASHAR U. Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)[J/OL]. *Aust. J. Rural. Health*, 2006, doi: 10.1111/j.1440-1584.2007.00928.x[2024-08-02]. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1584.2007.00928.x>.
- [37] VESIKARI T, FINN A, VAN DAMME P, *et al.* Immunogenicity and safety of a 3-antigen hepatitis B vaccine vs a single-antigen hepatitis B vaccine: a phase 3 randomized clinical trial[J/OL]. *JAMA Netw. Open*, 2021, 4(10): e2128652[2024-08-02]. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.28652>.
- [38] GUPTA A K, MACLEOD M A, ABRAMOVITS W. GARDASIL 9 (human papillomavirus 9-valent vaccine, recombinant)[J]. *Skinmed*, 2016, 14(1): 33-37.
- [39] HU Y M, HUANG S J, CHU K, *et al.* Safety of an *Escherichia coli*-expressed bivalent human papillomavirus (types 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine in an open-label phase I clinical trial[J]. *Human Vaccines Immunother.*, 2014, 10(2): 1-7.
- [40] ANASTASIA P, CYRA P, ALEXIS P, *et al.* Safety of human papillomavirus vaccines: an updated review[J]. *Drug Safety Int. J. Med. Toxicol. Drug Exp.*, 2018, 41:329-346.
- [41] LANINI S, GARBUGLIA A R, LAPA D, *et al.* Epidemiology of HEV in the mediterranean basin: 10-year prevalence in Italy [J/OL]. *BMJ Open*, 2015, 5(7): e007110[2024-08-02]. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-007110>.
- [42] WU X, CHEN P, LIN H, *et al.* Hepatitis E virus: current epidemiology and vaccine[J]. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2016, 12(10): 2603-2610.
- [43] HOLLA R P, AHMAD I, AHMAD Z, *et al.* Molecular virology of hepatitis E virus[J]. *Semin. Liver Dis.*, 2013, 33(1): 3-14.
- [44] BRADLEY D W. Hepatitis E virus: a brief review of the biology, molecular virology, and immunology of a novel virus[J]. *J. Hepatol.*, 1995, 22(1 Suppl): 140-145.
- [45] Robust manufacturing and comprehensive characterization of recombinant hepatitis E virus-like particles in Hecolin? [J]. *Vaccine*, 2014, 32(32):4039-4050.
- [46] MAZALOVSKA M, KOUOKAM J C. Progress in the production of virus-like particles for vaccination against hepatitis E virus[J/OL]. *Viruses*, 2020, 12(8): 826[2024-08-02]. <https://doi.org/10.3390/v12080826>.
- [47] ARORA N, ANBALAGAN LC, PANNU A K. Towards eradication of malaria: is the WHO's RTS, S/AS01 vaccination effective enough?[J]. *Risk Manag. Healthc. Policy*, 2021, 14: 1033-1039.
- [48] CALLAWAY E. The next generation of coronavirus vaccines: a graphical guide[J]. *Nature*, 2023, 614(7946): 22-25.
- [49] THOMS F, JENNINGS G T, MAUDRICH M, *et al.* Immunization of cats to induce neutralizing antibodies against Fel d 1, the major feline allergen in human subjects[J]. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2019, 144(1): 193-203.
- [50] YILMAZ I C, IPEKOGLU E M, BULBUL A, *et al.* Development and preclinical evaluation of virus-like particle vaccine against COVID-19 infection[J]. *Allergy*, 2022, 77(1): 258-270.
- [51] PILLET S, ARUNACHALAM P S, ANDREANI G, *et al.* Safety, immunogenicity, and protection provided by unadjuvanted and adjuvanted formulations of a recombinant plant-derived virus-like particle vaccine candidate for COVID-19 in nonhuman Primates[J]. *Cell. Mol. Immunol.*, 2022, 19(2): 222-233.
- [52] NG K K, PENDÁS-FRANCO N, ROJO J, *et al.* Crystal structure of Norwalk virus polymerase reveals the carboxyl terminus in the active site cleft[J]. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(16): 16638-16645.
- [53] JAZAYERI S D, POH C L. Development of universal influenza vaccines targeting conserved viral proteins[J/OL]. *Vaccines (Basel)*, 2019, 7(4): 169[2024-08-02]. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040169>.
- [54] BUFFIN S, PEUBEZ I, BARRIÈRE F, *et al.* Influenza A and B virus-like particles produced in mammalian cells are highly immunogenic and induce functional antibodies[J]. *Vaccine*, 2019, 37(46): 6857-6867.
- [55] TISSOT A C, RENHOFA R, SCHMITZ N, *et al.* Versatile virus-like particle carrier for epitope based vaccines[J/OL]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9809[2024-08-02]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009809>.
- [56] CHANG M O, SUZUKI T, SUZUKI H, *et al.* HIV-1 Gag-virus-like particles induce natural killer cell immune responses *via* activation and maturation of dendritic cells[J]. *J. Innate Immun.*, 2012, 4(2): 187-200.
- [57] CHANG M O, SUZUKI T, YAMAMOTO N, *et al.* HIV-1 Gag-virus-like particles inhibit HIV-1 replication in dendritic cells and T cells through IFN- $\alpha$ -dependent upregulation of APOBEC3G and 3F[J]. *J. Innate Immun.*, 2012, 4(5-6): 579-590.