

Derleme/ Review

## Virus Benzeri Partiküller ve Aşıların Geliştirilmesinde Önemi

## Virus-Like Particles and Its Importance in Vaccine Development

Buket GÜL<sup>1\*</sup>, Ferah ALKAN<sup>1,2</sup>,

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji A.D., Ankara, TÜRKİYE.

\* Sorumlu yazar: Buket GÜL; E-mail: [buketguldivm@gmail.com](mailto:buketguldivm@gmail.com)

### ÖZET

Aşı, hem insanlarda hem de hayvanlarda patojen mikroorganizmaları kontrol etme ve hastalıkları önlemede etkili yol olarak kullanılan biyolojik maddedir. Hayvanların viral hastalıklarına karşı kullanılan geleneksel aşılarda, inaktive edilmiş veya zayıflatılmış virus aşılardan oluşmaktadır. Ancak son yıllarda mikroorganizmaların alt ünitelerini içeren aşılaraya yönelik çalışmalar dikkat çekicidir. Bunlardan "Virus Benzeri Parçacık" (Virus Like Particle, VLP) aşıları, aşı kavramına farklı sınırlar açan yaklaşımlardan birini temsil eder. Kapsit yapısından oluşan, virus genomu içermeyen bu yapılar otantik virionun doğal konfigürasyonunu taklit ederek hem humoral hem de hücreye bağlı bağışıklık tepkilerini etkili bir şekilde ortaya çıkarır. VLP'ler taklit ettikleri hedef antijene karşı immün sistemi uyarımlarının yanı sıra farklı antijenler için taşıyıcılık yaparak da aşıların geliştirilmesine katkı sağlarlar. Bu derlemede VLP'lerin genel özellikleri, immün sistemi uyarma mekanizmaları, üretimleri ve VLP içeren aşı geliştirme teknolojisinin potansiyel avantajlarından bahsedilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Aşı, Virus, Virus benzeri partikül (VLP).

### ABSTRACT

Vaccine is the biological substance used as the most effective way to control of the pathogenic microorganisms and prevent of the disease in humans and animals. Conventional vaccines used against viral diseases of animals consist of inactivated or attenuated virus vaccines. However, studies on vaccines containing subunits of microorganisms have drawn attention in recent years. Among these, "Virus Like Particle" (VLP) vaccines represent one of the approaches that open different limits to the vaccine concept. These structures, which consist of capsid structure and do not contain the virus genome, mimic the natural configuration of the authentic virion, effectively revealing both humoral and cell-dependent immune responses. In addition to stimulating the immune system against the target antigen they imitate, VLPs also contribute to the development of vaccines by acting as carriers for different antigens. In this review, the general characteristics of VLPs, their immune system stimulation mechanisms, their production and potential advantages of vaccine development technology including VLP are discussed.

**Keywords:** Virus, Virus-like particle (VLP), Vaccine.

**Atıf Yapmak İçin:** Gül B, Alkan F. Virus benzeri partiküller ve aşıların geliştirilmesinde önemi. *Van Sag Bil Derg* 2022, 15, (1) 88-94. <https://doi.org/10.52976/van-saglik.908047>.

**Geliş Zamanı:** 02/04/2021

**Kabul Zamanı:** 19/01/2022

**Basılama Zamanı:** 30/04/2022

## GİRİŞ

İnsan ve hayvanlarda enfeksiyonlara karşı korunma sağlayan en etkili ve uygun maliyetli yöntem olan aşılar, M.Ö ki yıllarda başlayarak günümüze kadar çeşitli uygulamalardan geçerek, tüm virus kullanımını ya da virus alt ünitelerinin (nükleik asit, protein) kullanımını içeren farklı formülasyonlar şeklinde hazırlanmıştır. Halen bazı aşılarada yer alan "Virus Benzeri Parçacıklar" (Virus like-particle, VLP), yapısal konfigürasyonlarının sahip olduğu immünojenik özelliklerinin yanı sıra oluşturdukları yüksek güvenlik profilleri nedeniyle son yıllarda protein alt ünite aşı çalışmalarının önemli konularındandır (Lee ve ark., 2011). Nitekim Aralık

2019 tarihi itibariyle Çin'de tanımlanan ve halen tüm dünyayı etkileyen SARS-CoV-2 pandemisi nedeniyle, ülkemiz ve diğer birçok ülkede VLP aşısı geliştirme çalışmaları da hızla devam etmektedir (Xu ve ark., 2020).

### 1. Virus Benzeri Partiküllerin Yapısal Özellikleri

VLP'ler viral kapsidi oluşturan bir veya birden fazla proteinin mükemmel biçimde dizayn edilmiş bir geometride yerleşimi ile oluşan, doğal virus partikülünü çok iyi taklit eden 25-100 nm'lik boyuta sahip partiküllerdir (Fuenmayor ve ark., 2017). Genellikle ikosahedral veya çubuk benzeri yapıda bulunurlar. Kapsit proteinleri veya zarf içerisinde

yer alan büyük yapılı proteinlerin rekombinant ekspresyon sistemleri kullanılarak ifade edildiğinde kendi kendine bir araya gelebilme özelliği (self-assembly) bulunmaktadır. Bu nedenle virusun yapısında yer alan bir ya da daha fazla sayıda proteinin kopyalarından meydana gelen yapısal birimler (VLP) doğal virus partikülü veya subviral partiküllerden antijenik olarak ayırt edilemezler (Grgacic ve Anderson, 2006; Crisci ve ark., 2012).

## 2. Virus Benzeri Partiküllerin Üretimi

### 2.1. Basit yapılı viruslardan virus benzeri partikül üretimi

Viruslarda yer alan virion yapısı, genellikle viral protein alt birimlerinden oluşan kapsid ile çevrelenmiş nükleik asit molekülünden oluşur. Yapısal olarak basit viruslardan VLP'lerin üretilmesi, bu virusların çoğunun zarfsız olup aynı protein alt biriminin çok sayıda kopyasından oluştuğu için büyük zorluklar içermez (Liu ve ark., 2012). Bu yapıya sahip VLP'lerin örnekleri Papillomavirus, Parvovirus, Calicivirus, Circovirus ve Poliomavirusların majör kapsid proteinlerinin ekspresyonu ile oluşturulabilir. Örneğin; insan Papillomavirus (HPV) VLP'leri, VLP koleksiyonunun en çok çalışılanları arasındadır ve etkili aşuların üretiminde kullanım imkanı bulmuştur. Bunlar maya (*Saccharomyces cerevisiae*) ve böcek hücrelerinde bazı papillomavirusların kapsid proteini L1'in ekspresyonu ile oluşturulurlar (sırasıyla Gardasil®, Merk, NJ, USA ve Cervarix®, GlaxoSmith Kline, London, UK) (Du ve ark., 2021).

### 2.2. Çok katmanlı kapsit yapılı viruslardan virus benzeri partikül üretimi

Çok katmanlı kapsidlerden oluşan viral partiküllerin üretilmesi için viral kapsid proteinlerinin aynı hücrede birlikte ekspresyonu gerektiğinden, VLP'lerin birleştirilmesi ve salınmasında bir takım teknik zorluklar meydana gelmektedir (Noad ve Roy 2003). Bu virus yapıları, farklı kapsit proteinlerinin eş merkezli katmanlarından oluşan kapsidlere sahiptir. Virusa ve sentezlenen partiküle bağlı olarak sayıları 2 ile 5 arasında olan bu kapsid proteinlerinin böcek hücrelerinde birlikte ekspresyonu ile

VLP'lerin üretimi gerçekleşmektedir (French ve ark., 1990; Stewart ve ark., 2013).

### 2.3. Lipid zarflı viruslardan virus benzeri partikül üretimi

Konakçıdan türetilen zarflı VLP'ler dış ortamda diğer virus yapılarından türetilen VLP'ler ile kıyaslandığında genellikle dayanıksız olarak kabul edilirler. Sıcaklık, kimyasal işlemlerle muamele, saflaştırma gibi uygulamalarda bu yapının parçacık bütünlüğü ve stabilitesi tahrip edilebilir. Bu durum özellikle de zarflı VLP'lerin immunojenitesinde azalmalara yol açar. Bu durumda farklı ekspresyon sistemlerine göre viral proteinlerin seviyesi önemli ölçüde değişiklikler gösterir (Van Oers, 2011). İnsan embriyonik böbrek 293 (HEK293), Çin hamsteri yumurtalık (CHO) ve yavru hamster böbrek (BHK-21) hücre hatları gibi çeşitli memeli hücre tipleri, zarflı VLP üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Fontana ve ark., 2014; Thompson ve ark., 2015).

## 3. Virus Benzeri Partiküllerin Üretim Sistemleri

### 3.1. Bakteri / maya ekspresyon sistemleri

Bakteriler sadece bir veya iki yapısal protein içeren zarfsız VLP'ler oluşturmak için uygun ekspresyon sistemleri olup ilgili proteinin yüksek miktarlarda (kültür sisteminde 0.75 ila 700µg protein /ml arasında) ekspresyonunun sağlanması avantajına sahiptirler (Tan ve ark., 2004). Bununla birlikte immunojenite için esas gerekli olan translasyon sonrası modifikasyonlara (PTM'lere) olanak sağlamıyor olmaları önemli bir dezavantaj oluştururken maya ekspresyon sistemlerinin bu modifikasyonlara olanak sağlaması VLP yapılarının üretiminde sıklıkla kullanımını mümkün hale getirmiştir. Bakteri ve maya ekspresyon sistemlerinin kullanıldığı çalışmaların (Aires ve ark., 2006; Saraswat ve ark., 2016) yanı sıra ticari olarak kullanıma sunulan aşular da (Gardasil®, Merk, NJ, USA gibi) bulunmaktadır.

### 3.2. Bakulovirus/ böcek hücresi ekspresyon sistemi (B/IC)

B/IC sistemleri bakteri ve maya sistemleri ile kıyaslanabilir ölçekte protein miktarları (0,0018 ila 10 µg/ml arasında) üretebilirler. Ayrıca kompleks PTM'leri gerçekleştirmekte diğerlerine kıyasla daha yüksek verim sağlarlar (Fuenmayor ve ark., 2017). Bakuloviruslar sınırlı bir konak aralığına (yani böcekler için) sahip olmaları ve dolayısıyla omurgalılar için güvenli olmaları gibi bir avantaja da sahiptirler (Crisci ve ark., 2012). B/IC ekspresyonunda, rekombinant protein üretimi amacıyla Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) ve *Trichoplusia ni* (High Five™) böcek hücre hatları sıklıkla kullanılmaktadır. Chikungunya, HIV ve Domuz Parvovirusu temsil eden birçok VLP yapısı B/IC sistemi kullanılarak oluşturulmuştur (Thompson ve ark., 2015).

### 3.3. Memeli hücreleri ekspresyon sistemi

Memeli hücre sistemleri istenilen proteinlerin diğer sistemlere kıyasla daha az (verim 0,2 ila 18 µg/ml arasında) üretilmediği sistemler olmalarına karşın çok daha kompleks protein yapılarının (karmaşık zarflı VLP'ler) üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu sistemler uygun modifikasyonlar ve özgün montaj için tercih edilebilir olmakla birlikte üretimleri daha maliyetlidir (Grgacic ve Anderson, 2006). Memeli hücre hattı olan HEK293 kullanılarak kuduz, HIV, influenza gibi hastalık etkenleri için üretilen VLP'lerin, immun sistemi yeterli ölçüde indükleyebildiği de bildirilmiştir (Fontana ve ark., 2014; Thompson ve ark., 2015; Fuenmayor ve ark., 2018).

### 3.4. Bitki ekspresyon sistemleri

Transgenik bitkiler de VLP üretimi için kullanılmaktadır. Gram negatif bir bakteri olan *Agrobacterium tumefaciens* genel olarak hücrelerin enfeksiyonu ve transformasyonu için kullanılmaktadır. Bu bakteriler bitki hücrelerini enfekte edebildikleri gibi istenilen konakçı genomuna istenilen spesifik proteini

kodlayan geni de sokabilmektedirler. Rekombinant proteinlerin üretimi için en sık kullanılan bitkiler *Nicotiana tabacum* ve *Arabidopsis thaliana*'dır. Oral aşı girişimleri için ayrıca tütün ve marul yaprakları, patates de dahil olmak üzere çeşitli bitkilerden Hepatitis B virus ve Norwalkvirusu VLP'leri üretilmiştir (Grgacic ve Anderson, 2006; Chen ve Lai, 2013).

## 4. Virus Benzeri Partiküllerin Aşılarında Kullanımı

### 4.1. Aşı immunojenleri olarak kullanımları

Canlılar arasındaki biyolojik farklılıklar göz önüne alınarak, istenilen bağışıklık tepkilerinin elde edebilmesi için VLP'ler, partikül boyutu ve zarf yapısında olduğu gibi, konaktaki hedef dokuda (dendritik hücreler, mukozal yüzeyler gibi) ve uygulama yollarında farklılıklar meydana getirecek şekilde tasarlanabilir (Crisci ve ark., 2012). İnsan ve hayvanlarda görülen hastalıklardan korunmak için VLP'lerin immunojen olarak kullanılmasının amaçlandığı bazı aşı çalışmalarına ilgili bilgiler Tablo 1'de sunulmuştur.

### 4.2. Yabancı antijenlerin gösteriminde platform olarak kullanımları

VLP'ler türetildikleri homolog virus için aşı olarak kullanılmalarının yanı sıra başka hedef antijenlere karşı bağışıklık tepkilerini de artırabilirler. Bu durumda VLP kapsidleri hem başka virus, bakteri veya parazitin epitoplari için bir sunum iskelesi hem de bağışıklık tepkisini arttırmak için bir adjuvan görevi görürler. Çeşitli yöntemlerle oluşturulan bu Kimerik VLP'ler, heterolog antijen yapılarının, partikül formunda kendiliğinden birleşemeyen antijenlerin veya optimum immunojeniteye sahip olmayan antijenik yapıların (HIV ve HCV gibi) VLP partiküllerine dahil edilmeleriyle, tamamen farklı bir virus veya patojen poliproteinlerinin veya epitoplari'nin (Örn. Sıtma veya İnsan Rinovirus epitoplari veya İnfluenza M2) sunumu için bir VLP platformu oluşturarak kullanılabilirler (Plummer ve Manchester, 2011).

**Tablo 1.** İnsan ve hayvanlarda yapılan bazı VLP aşı çalışmaları

Virus	Antijen	İfade sistemi	Referans
Human Papillomavirus-11 (HPV 11)	L1 proteini	Bitki	Warzecha ve ark., 2003
İnsan immun yetmezlik virus (HIV-1)	HIV gag proteinleri (GagTN ve GagRT)	Bakulovirus	Pillay ve ark., 2009
Ebola virus	VP40 proteini	Memeli hücresi	Johnson ve ark., 2006
Newcastle disease virus (NDV)	HN, F, NP ve MP proteinleri	Memeli hücresi	McGinnes ve ark., 2010
Şiddetli akut solunum sendromunu (SARS)	S, E, M protein	Bakulovirus	Mortola ve Roy, 2004
Influenza A	M1 protein	Bakulovirus	Krammer ve ark., 2010
Domuz veziküler hastalığı virusu (SVDV)	3CD proteini	Bakulovirus	Ko ve ark., 2005
Zika virus	Zika E protein	Memeli hücresi	Boigard ve ark., 2017
Kırım Kongo kanamalı ateşi virus (CCHFV)	CCHFV nükleoprotein ve glikoprotein	Memeli hücresi	Hinkula ve ark., 2017
Domuz parvovirus	VP2 protein	Bakteri	Ji ve ark., 2017
Nervus nekrosis virus	RGNNV kapsid proteini	Maya hücresi	Wi ve ark., 2015
SARS-CoV-2 (COVID-19)	S proteini	Bitki	Iqbal ve ark., 2020
Peste des petits ruminants virus (PPR)	M, F, H proteinleri	Bakulovirus	Yan ve ark., 2020
Feline calicivirus (FCV)	VP2 proteini	Bakulovirus	DiMartino ve Marsilio, 2010
Rotavirus (RV)	VP2, VP6 protein	Memeli hücresi / Bakulovirus	Changotra ve ark., 2017
Bulaşıcı bursal hastalık virus (IBDV)	VP2, VP3 protein	Bakulovirus	Hu ve Bentley, 2001
Şap virus (FMDV)	P1, 2A, 3C proteinleri	Bakulovirus	Cao ve ark., 2009

### 4.3. Adjuvantların taşınmasında Platform Olarak Kullanımları

Modern aşı stratejilerinin önemli bir özelliği, APC'lerin (özellikle dendritik hücrelerin) etkili bir şekilde aktivasyonu için güçlü adjuvanların eklenmesidir. Bu nedenle, VLP'lerin iç yüzeylerinden, Toll benzeri reseptör (TLR) ligandları sırasıyla TLR3, TLR7 / 8 ve TLR9'un etkin uyarılması ile sonuçlanan, dsRNA, ssRNA ve metile edilmemiş CpG'ler dahil olmak üzere farklı DC aktive edici adjuvanları paketlenmek için faydalanılmıştır (Mohsen ve ark., 2017).

Bu güçlü yanıtların altında yatan sebep, TLR9 ligandların B hücrelerini doğrudan etkileyen bir adjuvan aktivitesine sahip olmasıdır (Krieg, 2006).

### Sonuç

Virus benzeri partiküller aşı geliştirme çalışmalarında güçlü bir alanı temsil ederler. Ancak VLP aşılarının geliştirilmesinde stratejik sınırlamalar, teknik zorluklar, maliyet gibi birtakım zorluklar bulunmaktadır. Son dönemlerde bu alanda yapılan çalışmaların gelişmesiyle birlikte bu sınırlamalara yönelik ilerlemeler kaydedilmiş olup bu yönde

çalışmalar hız kazanmıştır. Bahsedilen tüm bu sınırlamalara karşın, yakın gelecekteki süreçte, optimizasyon araçlarının (yani moleküler biyoloji, genetik mühendisliği ve sistem biyolojisi) entegrasyonunun VLP'ler üzerindeki mevcut sınırlamaların bazılarının üstesinden gelmesi beklenmektedir. Ayrıca VLP aşılarının birincil veya ikincil farmakolojik etkisinden kaynaklanan toksik etkilerin tespit edilme olasılığını en üst düzeye çıkarmak için tasarlanacak toksisite vb. çalışmalarının yapılmasının VLP'lerin üretimi ve VLP bazlı aşı çalışmalarının başarısına önemli katkı sağlanacağı öngörülmektedir.

### Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

### KAYNAKLAR

- Aires KA, Ciancia Rullo AM, Carneiro SM, Villa LL, Boccardo E, Pérez-Martinez G et al. (2006). Production of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles by recombinant *Lactobacillus casei* cells. *Applied and Environmental*, 72(1), 745-752.
- Boigard H, Alimova A, Martin GR, Katz A, Gottlieb P, Galarza JM. (2017). Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. *PLoS neglected Tropical Diseases*, 11(5), e0005608.
- Cao Y, Lu Z, Sun J, Bai X, Sun P, Bao H et al. (2009). Synthesis of empty capsid-like particles of Asia I foot-and-mouth disease virus in insect-cells and their immunogenicity in guineapigs. *Veterinary Microbiology*, 137(1-2), 10-17.
- Changotra H, Vij A. (2017). Rotavirus virus-like particles (RV-VLPs) vaccines: An update. *Reviews in Medical Virology*, 27(6), e1954.
- Chen Q, Lai H. Plant-derived virus-like particles as vaccines. *Human Vaccines Immuno therapeutics*, 9(1), 26-49.
- DiMartino B, Marsilio F. (2010). Feline calici virus VP2 is involved in the self-assembly of the capsid protein into virus-like particles. *Research in veterinary science* 2010;89(2), 279-81.
- Du J, Ährlund Richter A, Näsman A, Dalianis T. Human papilloma virus (HPV) prevalence upon HPV vaccination in Swedish youth: a review based on our findings 2008–2018, and perspectives on cancer prevention. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 303,329–35.
- Fontana D, Kratje R, Echeverria M, Prieto C. Rabies virus-like particles expressed in HEK293 cells. *Vaccine*, 32, 2799-3004
- French TJ, Marshall JJ, Roy P. (1990). Assembly of double-shelled, virus like particles of bluetongue virus by the simultaneous expression of four structural proteins. *Journal of Virology*, 64(12), 5695-5700.
- Fuenmayor J, Cervera L, Gutiérrez-Granados S, Gòdia F. (2018). Transient gene expression-optimization and expression vector comparison to improve HIV-1 VLP production in HEK293 cell lines. *Applied microbiology and Biotechnology*, 102(1), 165-174.
- Fuenmayor J, Gòdia F, Cervera L. (2017). Production of virus-like particles for vaccines. *New Biotechnology*, 39,174-80.
- Grgacic EV, Anderson DA. (2006). Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods* 40(1), 60-65.
- Hinkula J, Devignot S, Åkerstrom S, Karlberg H, Watrang E, Bereczky S et al. (2017). Immunization with DNA plasmid coding for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus capsid and envelope proteins and/or virus-like particle induces protection and survival in challenged mice. *Journal of Virology* 91(10), e02076-16..
- Hu YC, Bentley WE. (2001). Effect of MOI ratio on the composition and yield of chimeric infectious disease virus-like particles by baculovirus infection: Deterministic predictions and experimental results. *Biotechnology Bioengineering*, 75,104-119.
- Iqbal Yattoo M, Hamid Z, Parray O, Wani A, UIHaq A, Saxena A. (2020). COVID-19 Recent advancements in identifying novel vaccine candidates and current status of upcoming SARS-CoV-2

- vaccines. *Human Vaccines Immunotherapeutics*, 1-14.
- Ji, P, Liu Y, Chen Y, Wang A, Jiang D, Zhao B, Zhang G. (2017). Porcine parvovirus capsid protein expressed in *Escherichia coli* self-assembled into virus-like particles with high immunogenicity in mice and guinea pigs. *Antiviral Research*, 139, 146-152.
- Johnson RF, Bell P, Harty RN. (2006). Effect of Ebola virus proteins GP, NP and VP35 on VP40 VLP morphology. *Virology Journal*, 3(1), 1-7.
- Ko Y, Kang S, Nah J, Paton D, Oem J, Wilsden G et al. (2005). Noninfectious virus-like particle antigen for detection of swine vesicular disease virus antibodies in pigs by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(8), 922-929.
- Krammer F, Schinko T, Palmberger D, Tauer C, Messner P, Grabher R. (2010). Trichoplusiani cells (High Five TM) are highly efficient for the production of influenza A virus-like particles: a comparison of two insect cell lines as production platforms for influenza vaccines. *Molecular Biotechnology*, 45, 226-234.
- Krieg AM. (2006). Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(6), 471-484.
- Lee DH, Park JK, Lee YN, Song JM, Kang SM, Lee JB et al. (2011). H9N2 avian influenza virus-like particle vaccine provides protective a strategy for the differentiation of infected from vaccinated animals. *Vaccine*, 29(23), 4003-4007.
- Liu F, Ge S, Li L, Wu X, Liu Z, Wang Z. (2012). Virus-like particles: potential veterinary vaccine immunogens. *Research in Veterinary Science*, 93(2), 553-559.
- McGinnes W, Pantua H, Laliberte JP, Gravel KA, Jain S, Morrison TG. (2010). Assembly and biological and immunological properties of Newcastle disease virus-like particles. *Journal of Virology*, 84(9), 4513-4523.
- Mohsen MO, Zha L, Cabral-Miranda G, Bachmann MF. (2017). Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Seminars in Immunology*, 34, 123-132.
- Mortola E, Roy P. (2004). Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expression system. *FEBS Letters*, 576, 174-178.
- Noad R, Roy P (2003). Virus-like particles as immunogens. *Trends in Microbiology*, 11(9), 438-444.
- Pillay S, Meyers A, Williamson A, Rybicki E. (2009). Optimization of chimeric HIV-1 virus-like particle production in a baculovirus- insect cell expression system. *Biotechnology Progress*, 25(4), 1153-1160.
- Plummer EM, Manchester M. (2011). Viral nano particles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. *Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 3(2), 174-196.
- Saraswat S, Athmaram TN, Parida M, Agarwal A, Saha A, Dash PK. (2016). Expression and characterization of yeast derived chikungunya virus like particles (CHIK-VLPs) and its evaluation as a potential vaccine candidate. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(7), e0004782.
- Stewart M, Dubois E, Sailleau C, Bréard E, Viarouge C, Desprat A et al. (2013). Bluetongue virus serotype 8 virus-like particles protect sheep against virulent virus infection as a single or multi-serotype cocktail immunogen. *Vaccine*, 31(3), 553-558.
- Tan M, Zhong W, Song D, Thornton S, Jiang X. (2004). *E. coli*-expressed recombinant norovirus capsid proteins maintain authentic antigenicity and receptor binding capability. *Journal of Medical Virology*, 74(4), 641-649.
- Thompson CM, Petiot E, Mullick A, Aucoin MG, Henry O, Kamen AA. (2015). Critical assessment of influenza VLP production in Sf9 and HEK293 expression systems. *BMC Biotechnology*, 15(1), 1-12.
- Van Oers MM. (2011). Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107, 3-15.
- Warzecha H, Mason H, Lane C, Tryggvesson A, Rybicki E, Williamson A, Clements JD, Rose R.

- (2003). Oral immunogenicity of human papilloma virus-like particles expressed in potato. *Journal of Virology*, 77(16), 8702-8711.
- Wi GR, Hwang JY, Kwon MG, Kim HJ, Kang HA, Kim HJ. (2015). Protective immunity against nervous necrosis virus in convict grouper *Epinephelus septemfasciatus* following vaccination with virus-like particles produced in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Veterinary Microbiology*, 177(1-2), 214-218.
- Xu R, Shi M, Li J, Song P, Li N. (2020) Construction of SARS-CoV-2 virus-like particles by mammalian expression system. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, doi:10.3389/fbioe.2020.00862
- Yan F, Li E, Li L, Schiffman Z, Huang P, Zhang S. (2020). Virus-Like Particles Derived from a Virulent Strain of Pest des Petits Ruminants Virus Elicit a More Vigorous Immune Response in Mice and Small Ruminants Than Those From a Vaccine Strain. *Frontiers in Microbiology*, doi:10.3389/fmicb.2020.00609.