

流感病毒样颗粒疫苗研究进展

吴蒙, 张定梅 综述; 陆家海* 审校

(中山大学公共卫生学院医学统计与流行病学系, 广东 广州 510080)

摘要: 疫苗接种是预防各种类型流行性感动的理想方式,但流感病毒血清亚型多,变异性强,给流感疫苗的研发带来一定的挑战。病毒样颗粒(VLP)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。VLP不含有病毒核酸,不能自主复制,因此无致病性,在疫苗研发中具有广泛的应用前景。现已有H1N1、H3N2、H5N1、H7N1、H5N3及H9N2型流感VLP合成的报道,动物实验证明这些VLP可诱导产生保护性免疫应答。数种二价(多价)混合流感VLP也被合成并证实不同亚型流感病毒间具有交叉保护作用。佐剂的使用能够增强流感VLP疫苗的免疫原性。目前的研究表明流感VLP疫苗具有高免疫效价、能有效诱导交叉免疫应答和安全性高等特点,但现有研究大多是动物实验和临床前实验。流感VLP疫苗的安全性、效价及免疫途径等方面还有待进一步的研究及临床实验的验证。本文就近年来流感病毒样颗粒疫苗的研究进展,从流感VLP的合成和释放、免疫机制、已合成的流感VLP、佐剂的使用等方面进行综述。

关键词: 流感; 病毒样颗粒; 疫苗

中图分类号: R186 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)05-0486-06

Progress in Influenza Virus-Like Particles Vaccine Studies

WU Meng, ZHANG Ding-mei, LU Jia-hai*

(Department of Medical statistics and Epidemiology, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: Vaccination is an ideal way to prevent all types of influenza, but numerous serotypes and high variability of influenza virus challenge research and development of influenza vaccines. Virus-like particles (VLP) are hollow particles that contain one or more structural proteins of a complete virus, they share similar structure and immunogenicity. By activating antigen-presenting cells, VLP inducing immune responses. VLP do not contain viral nucleic acid, which means that VLP has no pathogenicity and suggested as a promising platform for vaccines. Now H1N1, H3N2, H5N1, H7N1, H5N3 and H9N2 influenza VLP have been produced, and animal experiments have proved these VLP can induce protective immune. Several divalent (multivalent) mixed influenza VLP have also been produced and have a cross-protection activity. Adjuvants can enhance the immunogenicity of influenza VLP vaccine. Although current study showed that influenza VLP vaccine have high titers, can effectively induce cross-infection immune responses and has no pathogenicity, they are all animal or pre-clinical experiments. Safety, efficacy and immune routes of influenza VLP vaccine still need for further studies and verification of clinical trials. In this article, we briefly describe the produce of influenza VLP, immune mechanisms, species of influenza VLP have been produced as well as the adjuvants.

Key words: influenza; virus-like particles; vaccine

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(5):486-491]

病毒样颗粒(virus-like particles, VLP)是含有某种病毒一个或多个结构蛋白的空心颗粒,因为VLP不含有病毒核酸物质,不能自主复制,因此也

不具有感染性^[1]。而且VLP表面能够重复高密度的表达抗原表位,从而引发强有力的免疫应答,因此它对多种疾病来说都是一种理想的疫苗形

收稿日期: 2009-07-05

作者简介: 吴蒙, 硕士研究生, 研究方向为分子流行病学与疫苗学, E-mail: wumeng.xp@hotmail.com; * 通信作者: 陆家海, 教授, 博士生导师, E-mail: jiahailu@yahoo.com.cn

式^[2]。VLP疫苗是近年来流感疫苗研究的热点,本文将从以下几方面对流感病毒样颗粒疫苗的研究现状进行综述。

1 流感 VLP 的合成和释放

流行性感冒病毒(influenza virus)是有包膜的负链 RNA 病毒,在分类学上属于正黏病毒科^[3]。流感病毒的结构蛋白主要包括:基质蛋白(M1)、核糖核蛋白复合体和包膜上的3种跨膜蛋白(HA, NA, M2),流感病毒在受感染细胞的细胞膜上以出芽生殖的方式释放出新的病毒颗粒^[4-5]。一种主流的流感病毒颗粒组装的模型是基质蛋白(M1)与细胞膜上的“脂筏”区域连接,并与 HA 与 NA 胞内区相互作用,从而启动了病毒组装和出芽的过程^[4-6]。

现已报道的流感 VLP 表达系统包括:重组牛痘病毒^[7];DNA 质粒-T7 RNA 聚合酶共转染-表达牛痘病毒^[5];重组 DNA 表达载体^[8-9];重组杆状病毒-昆虫细胞^[10]等。

因杆状病毒可在绿色蔬菜中发现且不能在哺

乳动物细胞内复制,重组杆状病毒/昆虫细胞表达系统相比哺乳动物细胞表达系统有更好的安全性。在昆虫细胞中已经合成的 VLP 有:表达 HA, NA, M1, M2 任一种蛋白的流感 VLP^[4];HA-NA-M1 VLP^[11-13];HA-M1 VLP^[14-15]。电镜显示,这些流感 VLP 直径约 80 ~ 120 nm,有着流感病毒典型的 HA 穗状花序^[16]。

但是,影响流感 VLP 形成的关键病毒成分仍然不清楚。M1 蛋白与膜内 HA, NA 和 M2 蛋白相互作用,可能在病毒 VLP 的装配及出芽中起重要作用。Zhang 等^[17]研究表明,当病毒糖蛋白胞内段突变时,病毒的出芽生殖被抑制。Chen 等^[8]研究表明,流感病毒的 HA 和 NA,而不是 M1,在流感 VLP 的合成、出芽和表达过程中是必须的。但当 HeLa 细胞(非 293T 细胞)被转染入只表达 M1 蛋白的 DNA 时,培养基的上清液中也发现了少量的 VLP^[8];而缺乏 HA 或 NA 的流感 VLP 都已被合成,但释放他们的细胞都表达基质蛋白 M1,也提示了 M1 在 VLP 合成中的重要作用^[4-5]。不同研究产生的差异可能由于采用了不同的表达系统。每一种蛋白在 VLP 释放过程中的具体作用还有待进一步研究。

表 1 现已报道的流感病毒样颗粒

Table 1 Influenza virus-like particles have been reported

Subtype	Components	Immune effect detect	Reference
H1N1(A/PR/8/34)	HA, M1	A/PR/8/34, A/WSN/33	Quan et al. (2007)
H1N1(Pandemic 1918 A virus)	HA, NA, M1, M2	A/swine/Iowa (H1N1)	Matassov et al. (2007)
H1N1(A/PR/8/34)	HA, M1	A/PR/8, A/Philippines	Wang et al. (2008)
H1 + H3 (A/PR/8/34 + A/Aichi/2/68 (X31))	HA (H1+H3), M1	A/PR/8/34, A/Aichi(X31), A/WSN, A/Philippines	Quan et al. (2008)
H3N2 (A/Udorn)	HA, M1	A/HK/68 (H3N2)	Galarza et al. (2005)
H3N2(A/Udorn/72)	HA, NA, M1, M2	—	Latham et al. (2001)
H3N2 (A/Fujian/411/2002)	HA, NA, M1	HAI titers	Bright et al. (2007)
H5N1 clade 1 (VN/04) + clade 2 (Indo/05)	HA, NA, M1	H5N1 clade 1 (VN/04), clade 2 (Indo/05)	Bright et al. (2008)
H5N1 clade 2.1 (Indo/05)	HA, NA, M1	H5N1 (Indo/05, VN 03/04)	Mahmood et al. (2008)
H5N1 (clades 1 + 2)	HA, NA, M1	H5N1 clade 1 (VN/04), clade 2 (Indo/05, WS/05, Anh/05)	Crevar and Ross (2008)
H5N1 clade 1 (VN/04)	HA, NA, M1	H5N1 (wild type, VN/04)	Kang et al. (2009)
H5N1 (Indo/05), H1N1 (A/New Caledonia)	HA, M1	H5N1 clade 1 (VN/04)	D'Aoust et al. (2008)
H5N1 clade 1(VN/04) + clade 2 (Indo/05)	Gag, HA, NA	A/Vietnam/1203/04	Haynes et al. (2009)
H5N1 + H7N1	Gag, HA, NA, M2	Neutralizing titers	Szecsics et al. (2006)
H5N3	HA, NA, M1	HAI (H5N3, A/duck/France)	Prel et al. (2008)
H9N2 (A/HK/1073/99)	HA, NA, M1	A/HK/1073/99	Pushko et al. (2005)
H9N2 (A/HK/1073/99)	HA, NA, M1	A/HK/1073/99	Pushko et al. (2007)

2 免疫机制

VLP在形态上与真正病毒粒子相同或相似,作为颗粒性抗原可激活树突状细胞等抗原提呈细胞,将其提呈给 T、B 淋巴细胞,从而有效地诱导机体产生免疫保护反应^[18-21]。

在免疫小鼠的脾细胞中,VLP 以 HA-特异性 MHC I 或 MHC II-限制性多肽结合物方式刺激 HA 特异性 CD4⁺和 CD8⁺细胞分泌 Th1 型(IFN- γ , IL-2)和 Th2 型(IL-4, IL-5)细胞因子^[10,22]。免疫过 VLP 的小鼠可观察到明显的 MHC I 或 MHC II 型抗原肽刺激产生的 IFN- γ 和 IL-2, 而 rHA 疫苗免疫则不会出现。CD4⁺ T 细胞比 CD8⁺ T 细胞分泌更多的 IL-4 和 IL-5^[10,22]。提示 VLP 可同时诱导产生 Th1 和 Th2 型细胞免疫反应。Zhang 等^[23]研究表明,HA VLP 免疫 C57BL/6 小鼠,可激活 B2 细胞活性,并产生以 IgG2a 为主的抗体。

3 已合成的流感 VLP(表 1)

3.1 H1N1 VLP

Quan 等^[14](2007)合成的流感 M1-HA H1N1 VLP(A/PR/8/34),具有抵抗同源和异源毒株(A/PR/8/34, A/WSN/33)的能力,而在肺组织中异源病毒滴度是同源病毒滴度的 100 倍,与发现较高的抗同源病毒中和抗体一致。用只含有 M1 不含 HA 的 VLP 免疫小鼠后,只有不到 20%的小鼠存活,且存活小鼠有严重的体质量下降且检测不到特异性抗体,提示 HA 在保护性免疫中有重要作用。当用热处理灭活 HA 活性之后的 VLP 免疫小鼠,也不能观察到保护性免疫。因此,可认为 HA 是 VLP 诱导产生保护性抗体的关键因素。

3.2 H3N2 VLP

Latham 等^[4](2001)首先合成了 HA-NA-M1-M2 的 H3N2 VLP(A/Udorn/72)。Galarza 等^[15](2005)报道了含 M1-HA 的 H3N2 VLP(A/Udorn/72)的免疫效果,两次肌注或鼻内免疫含 1 μ g HA 的这种 VLP,无论是否添加 IL-12 佐剂,都能使小鼠抵抗 5 倍于 LD50(半数致死剂量)的 A/Hong Kong/68(H3N2)病毒的感染,表明流感 VLP 在引发 HA 抗体结合反应能力与减毒活疫苗相似或更高。

Bright 等^[12](2007)合成了 HA-NA H3N2 VLP(A/Fujian/411/2002),肌注小鼠后血凝抑制实验(HAI)显示,比全病毒灭活疫苗产生更高水平的血清抗体且具有更广泛的交叉保护活性。VLP 可诱导产生 10 ~ 15 倍于等量 HA(可溶性 rHA)的血清抗体滴度,2 倍于全病毒灭活疫苗的 HAI 抗体滴度,在雪貂中 VLP 也比 rHA 诱导产生更高的抗体滴度^[12]。用 HA-NA H3N2 VLP(A/Fujian/411/2002)肌注 BALB/c 小鼠产生 IgG2a、IgG2b 和 IgG1 三种主要的抗体,而灭活病毒疫苗主要诱导产生 IgG2a 和 IgG1,很少出现 IgG2b,而 rHA 主要诱导产生 IgG1^[12]。

3.3 H5N1 VLP

因为 H5N1 型高致病性禽流感病毒能杀死鸡胚,虽然通过修饰 HA 的多个氨基酸位点^[24],或者利用反向遗传工程技术将 H1N1(A/PR/8/34)或其他减毒株的结构蛋白编码基因转入,可以在鸡胚中生产^[24-26],但相关研究及生产须要在生物安全 3 级(BSL-3)及以上条件下进行。而 VLP 疫苗克服了上述缺点,成为近年来高致病性流感病毒疫苗的研究热点。

自从 1997 年香港报道第一例人感染高致病性禽流感以来,高致病性禽流感病毒(HPAI)已经被分为 10 个分化枝(clade 0-9),具有型别间交叉保护作用的疫苗也备受关注^[22]。Bright 等^[22](2008)检测了 HA-NA clade 2 H5N1 VLP(A/Indonesia/05/2005)的交叉保护免疫作用:两组含有不同剂量 HA(3 μ g、600 ng)的 VLP 在感染 A/Indonesia/05/2005 或 clade 1 A/Vietnam/1203/2004 的小鼠均引起更广泛的细胞和体液免疫,而所有注射 rHA 疫苗的小鼠均发生死亡或严重的体质量降低^[27]。

Mahmood 等^[28](2008)研究表明,两次接种低剂量(0.6 μ g HA)的 H5N1(Indo_05) VLP 疫苗能引起雪貂抗同种或异种 clade 1 Viet_04 病毒的免疫反应。有趣的是,免疫的雪貂在 10FLD50 的病毒感染下,HAI 反应阴性但存活了下来。提示 HPAI 的 HAI 抗体滴度与保护性免疫的关系没有季节性流感明显。

MLV Gag 蛋白和 M1 蛋白都是 VLP 出芽生殖的必须蛋白。Haynes 等^[16](2009)用杆状病毒-昆虫细胞表达系统合成的 Gag H5N1 VLP(A/Vietnam/1203/04 或 A/Indonesia/5/05)可诱导预先感染高

致病性 A/Vietnam/1203/04 的小鼠及雪貂产生保护性免疫。表明包含 HA 的 Gag VLP 与 M1 VLP 具有类似的免疫原性。

植物表达系统因其安全性好且产量高,成为另外一种大量生产 VLP 的方法。D'Aoust 等^[29](2008)用本生烟类植物生产了 H5 VLP(Indo/05)。用这种 VLP 与铝制佐剂混合肌注小鼠,可对感染低剂量(LD50)的 A/Vietnam/1194/04 (H5N1)产生保护性免疫反应。但这种 H5 VLP 在植物细胞中是否增强了生物学活性未被报道。

3.4 H5N3 VLP

Prel 等^[30](2008)用重组杆状病毒-昆虫细胞表达系统合成的 HA-NA H5N3 VLP (A/Duck/France/02166/2002)已经作为一种动物疫苗在鸭身上测试。HAI 实验阳性也证明了研制这种 VLP 亚单位疫苗具有现实的可行性。

3.5 H7N1 VLP

H7 亚型禽流感已有一例直接传染人类的报道^[31]。Judit^[9](2006)用质粒转染哺乳动物细胞 293T,生成了 HA-NA-M2(A/Chicken/FPV/Rostock/1934 (H7N1) 或 A/Thailand/KAN-1/04 (H5N1))的逆转录 Gag VLP。两次免疫后小鼠产生了型特异性抗体,但没有发现产生交叉保护抗体。

3.6 H9N2 VLP

Pushko 等^[11,13](2005,2007)合成了用 HA-NA H9N2 VLP (A/HongKong/1073/99)。用 10 μ g H9N2 VLP 在 0 和 28 d 时分别皮下和肌注免疫小鼠,在 100 倍 MID50 (50%感染剂量)病毒感染下,实验组小鼠体质量下降少于对照组(对照组小鼠体质量下降 17%)。

3.7 二价(多价)混合 VLP

Quan 等^[10](2008)测试了 H1-H3 混合二价 HA VLP 的免疫原性,发现其保护谱符合现阶段流感接种疫苗型特异性的要求。

Crevar and Ross^[27](2008)研制了一种 H5N1 二价疫苗,用含有 clade 1 和 clade 2 H5 (Viet_04 和 Indo_05)的 HA 混合物免疫小鼠两次,可诱导抗 clade 1,2 和 clade 2.3(A/Anhui/1/2005)的血凝抑制试验(HAI)活性,但不能诱导抗 clade 2.2 (A/Bar headed goose/Qinghai/1A/2005)的 HAI 活性。只注射 clade 2 VLP (Indo_05)可表现出一定的交叉保护作用,而只注射 clade 1 VLP (Viet_04)在对抗 clade 2 型病毒感染方面作用不显

著(实验小鼠体质量明显降低)。表明二价 H5N1 VLP 疫苗是有效的,且 clade 2 VLP 比 clade 1 VLP 具有更广泛的交叉保护作用^[32](2009)的研究也表明:流感 H5N1 VLP (A/Viet Nam/1203/04)在小鼠中可引起长效保护性免疫和记忆性 B 和 T 细胞反应。

Matassov 等^[33](2007)用昆虫细胞表达系统合成的由 HA、NA(1918 influenza A virus),以及 M2、M1(A/Udorn,H3N2)组成的 VLP,两次鼻内黏膜免疫,均能使感染 A/Swine/Iowa/15/30 (H1N1)的小鼠产生保护性抗体。添加 CpG 寡脱氧核苷酸佐剂可以使小鼠上呼吸道的病毒滴度降低。

4 佐剂的使用

一些研究表明,结合强力黏膜佐剂比如霍乱毒素^[10]或大肠杆菌不耐热肠毒素^[34],可明显增强灭活疫苗的异种免疫活性,但由于这些佐剂可能对人体有潜在损害而限制了他们的使用。用 Novasome(非磷脂脂质体微粒)佐剂能明显增强 rHA 可溶性蛋白的免疫原性,但对流感 VLP 没有作用,可能与 VLP 高度特异免疫原性有关^[11]。也有人尝试在 VLP 表面连接免疫刺激分子,如把 DC-CSF(粒细胞集落刺激因子)通过遗传工程与 VLP 连接,可以增加 VLP 的免疫原性^[35-36]。Toll 样受体也能通过膜结合形式与 VLP 连接^[37]。HA H1N1 VLP (A/PR/8)表面结合鞭毛蛋白也能明显增强 VLP 的免疫原性,同时也能提高其抗不同亚型的病毒的能力^[14]。

5 展望

VLP 疫苗以其安全性和抗病毒的有效性,成为近年研究的热点,已经有乙型肝炎病毒(HBV)^[38]和人类乳头瘤病毒(HPV)^[39]VLP 疫苗上市。由于 VLP 不含核酸不能自主复制,不具有传染性,并且能够诱导交叉免疫中关键的细胞免疫应答,可能具有更广泛的抗感染谱,更适合老年人等高危人群^[40]。但目前的研究虽然证实了流感 VLP 可以作为有效预防流感的疫苗,但都是临床前实验,流感 VLP 疫苗的安全性和效能还有待人类临床实验的进一步验证。

抗原漂移发生在流感流行的整个过程,研制

有交叉免疫活性的疫苗是应对流感病毒抗原变异的关键。无佐剂的 VLP 疫苗已经在动物实验中显示出抗同源和近源 H5N1 病毒的能力^[16,22],在雪貂中的实验也证实了流感 VLP 疫苗可诱导抗 H5 和 H3 的交叉保护反应^[16,22,28],但具体的免疫机制还不清楚。与季节性流感不同,HPAI 的中和抗体浓度(或 HAI 滴度)与保护型免疫的强弱的关系不强^[28],具体机制还有待进一步研究。通过基因工程技术修饰和抗原靶向技术可能会提高 VLP 疫苗的保护效率。

流感疫苗的注射途径也是影响疫苗效果的重要因素。现有 VLP 流感疫苗注射途径基本是通过鼻内吸入或肌肉注射。由于流感经由呼吸道传播,鼻内吸入由于更容易引起黏膜免疫可能具有更广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Grgacic EV, Anderson DA. Virus-like particles: passport to immune recognition [J]. *Methods*, 2006, 40(1):60-65.
- [2] Keim B. Controversy over cervical cancer vaccine spurs safety surveillance [J]. *Nat Med*, 2007,13(4):392-393.
- [3] Scheiffele P, Rietveld A, Wilk T, et al. Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(4):2038-2044.
- [4] Latham T, Galarza JM. Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins [J]. *J Virol*, 2001,75(13):6154-6165.
- [5] Gomez-Puertas P, Albo C, Perez-Pastrana E, et al. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding [J]. *J Virol*, 2000,74(24):11538-11547.
- [6] Watanabe T, Watanabe S, Neumann G, et al. Immunogenicity and protective efficacy of replication-incompetent influenza virus-like particles [J]. *J Virol*, 2002,76(2):767-773.
- [7] Ali A, Avalos RT, Ponimaskin E, et al. Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein [J]. *J Virol*, 2000,74(18):8709-8719.
- [8] Chen BJ, Leser GP, Morita E, et al. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles [J]. *J Virol*, 2007, 81(13):7111-7123.
- [9] Szecsi J, Boson B, Johnsson P, et al. Induction of neutralising antibodies by virus-like particles harbouring surface proteins from highly pathogenic H5N1 and H7N1 influenza viruses [J]. *Viol J*, 2006, 3(1):70-75.
- [10] Quan FS, Steinhauer D, Huang C, et al. A bivalent influenza VLP vaccine confers complete inhibition of virus replication in lungs [J]. *Vaccine*, 2008,26(26):3352-3361.
- [11] Pushko P, Tumpey TM, Van Hoven N, et al. Evaluation of influenza virus-like particles and Novasome adjuvant as candidate vaccine for avian influenza [J]. *Vaccine*, 2007,25(21):4283-4290.
- [12] Bright RA, Carter DM, Daniluk S, et al. Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin [J]. *Vaccine*, 2007,25(19):3871-3878.
- [13] Pushko P, Tumpey TM, Bu F, et al. Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice [J]. *Vaccine*, 2005,23(50):5751-5759.
- [14] Quan FS, Huang C, Compans RW, et al. Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus [J]. *J Virol*, 2007,81(7):3514-3524.
- [15] Galarza JM, Latham T, Cupo A. Virus-like particle (VLP) vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge [J]. *Viral Immunol*, 2005,18(1):244-251.
- [16] Haynes JR, Dokken L, Wiley JA, et al. Influenza-pseudotyped Gag virus-like particle vaccines provide broad protection against highly pathogenic avian influenza challenge [J]. *Vaccine*, 2009,27(4):530-541.
- [17] Zhang J, Leser GP, Pekosz A, et al. The cytoplasmic tails of the influenza virus spike glycoproteins are required for normal genome packaging [J]. *Virology*, 2000,269(2):325-334.
- [18] Fausch SC, Da Silva DM, Kast WM. Differential uptake and cross-presentation of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells and Langerhans cells [J]. *Cancer Res*,2003, 63(13):3478-3482.

- [19] Rudolf MP, Fausch SC, Da Silva DM, et al. Human dendritic cells are activated by chimeric human papillomavirus type-16 virus-like particles and induce epitope-specific human T cell responses in vitro [J]. *J Immunol*, 2001, 166(10):5917-5924.
- [20] Da Silva DM, Pastrana DV, Schiller JT, et al. Effect of preexisting neutralizing antibodies on the anti-tumor immune response induced by chimeric human papillomavirus virus-like particle vaccines [J]. *Virology*, 2001, 290(2):350-360.
- [21] Warrino DE, Olson WC, Scarrow MI, et al. Human papillomavirus L1L2-E7 virus-like particles partially mature human dendritic cells and elicit E7-specific T-helper responses from patients with cervical intraepithelial neoplasia or cervical cancer in vitro [J]. *Hum Immunol*, 2005, 66(7):762-772.
- [22] Bright RA, Carter DM, Crevar CJ, et al. Cross-clade protective immune responses to influenza viruses with H5N1 HA and NA elicited by an influenza virus-like particle [J]. *PLoS One*, 2008, 3(1):e1501.
- [23] Zhang S, Cubas R, Li M, et al. Virus-like particle vaccine activates conventional B2 cells and promotes B cell differentiation to IgG2a producing plasma cells [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(10):1988-2001.
- [24] Li S, Liu C, Klimov A, et al. Recombinant influenza A virus vaccines for the pathogenic human A/Hong Kong/97 (H5N1) viruses [J]. *J Infect Dis*, 1999, 179(5):1132-1138.
- [25] Romanova J, Krenn BM, Wolschek M, et al. Preclinical evaluation of a replication-deficient intranasal DeltaNS1 H5N1 influenza vaccine [J]. *PLoS One*, 2009, 4(6):e5984.
- [26] Karron RA, Talaat K, Luke C, et al. Evaluation of two live attenuated cold-adapted H5N1 influenza virus vaccines in healthy adults [J]. *Vaccine*, 2009, 27(36):4953-4960.
- [27] Crevar CJ, Ross TM. Elicitation of protective immune responses using a bivalent H5N1 VLP vaccine [J]. *Virol J*, 2008, 5(1):131-136.
- [28] Mahmood K, Bright RA, Mytle N, et al. H5N1 VLP vaccine induced protection in ferrets against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 influenza viruses [J]. *Vaccine*, 2008, 26(42):5393-5399.
- [29] D'Aoust MA, Lavoie PO, Couture MM, et al. Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice [J]. *Plant Biotechnol J*, 2008, 6(9):930-940.
- [30] Prel A, Le Gall-Recule G, Jestin V. Achievement of avian influenza virus-like particles that could be used as a subunit vaccine against low-pathogenic avian influenza strains in ducks [J]. *Avian Pathol*, 2008, 37(5):513-520.
- [31] Kurtz J, Manvell RJ, Banks J. Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis [J]. *Lancet*, 1996, 348(9031):901-902.
- [32] Kang SM, Yoo DG, Lipatov AS, et al. Induction of long-term protective immune responses by influenza H5N1 virus-like particles [J]. *PLoS One*, 2009, 4(3):e4667.
- [33] Matassov D, Cupo A, Galarza JM. A novel intranasal virus-like particle (VLP) vaccine designed to protect against the pandemic 1918 influenza A virus (H1N1) [J]. *Vir Immunol*, 2007, 20(3):441-452.
- [34] Tumpey TM, Renshaw M, Clements JD, et al. Mucosal delivery of inactivated influenza vaccine induces B-cell-dependent heterosubtypic cross-protection against lethal influenza A H5N1 virus infection [J]. *J Virol*, 2001, 75(11):5141-5150.
- [35] Skountzou I, Quan FS, Gangadhara S, et al. Incorporation of glycosylphosphatidylinositol-anchored granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or CD40 ligand enhances immunogenicity of chimeric simian immunodeficiency virus-like particles [J]. *J Virol*, 2007, 81(3):1083-1094.
- [36] Sailaja G, Skountzou I, Quan FS, et al. Human immunodeficiency virus-like particles activate multiple types of immune cells [J]. *Virology*, 2007, 362(2):331-341.
- [37] Wang BZ, Quan FS, Kang SM, et al. Incorporation of membrane-anchored flagellin into influenza virus-like particles enhances the breadth of immune responses [J]. *J Virol*, 2008, 82(23):11813-11823.
- [38] Ding FX, Wang F, Lu YM, et al. Multiepitope peptide-loaded virus-like particles as a vaccine against hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2009, 49(5):1492-1502.
- [39] Goon P, Sonnex C, Jani P, et al. Recurrent respiratory papillomatosis: an overview of current thinking and treatment [J]. *Eur Arch Oto-Rhino-L*, 2008, 265(2):147-151.
- [40] Haynes JR. Influenza virus-like particle vaccines [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2009, 8(4):435-445.