



## Genetic Engineering Technique in Virus-Like Particle Vaccine Construction

Debie Rizqoh<sup>1,2</sup>✉

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Bengkulu

<sup>2</sup>Center for Tropical and Coastal Medicine Research, Universitas Bengkulu

### Info Artikel

Diterima 15 Januari 2021

Disetujui 11 Juli 2021

Diterbitkan 31 Desember 2021

### Kata Kunci:

Vaksin, virus-like particle (VLP), teknologi rekombinan, sistem ekspresi

### e-ISSN:

2613-9219

### Akreditasi Nasional:

Sinta 4

### Keywords:

*Vaccine, virus-like particle (VLP), recombinant technology, expression system*

✉ **Corresponding author:**

[debierizqoh@unib.ac.id](mailto:debierizqoh@unib.ac.id)

### Abstrak

Vaksin menjadi terapi yang sangat efektif untuk menghadapi berbagai penyakit infeksi bahkan hingga terjadi eradikasi seperti pada virus *smalpox*. Saat ini sudah banyak vaksin konvensional seperti vaksin inaktif dan vaksin hidup yang dilemahkan. Namun, metode vaksin tersebut mempunyai efek samping terhadap populasi. Virus-like particle (VLP) merupakan salah satu alternatif vaksin berbasis teknologi DNA rekombinan yang aman dengan imunogenisitas yang sama dengan virus konvensional. Vaksin ini terbukti dapat menginduksi respon imun humoral yang dimediasi oleh antibodi dan respon imun selular yang dimediasi oleh sel T sitotoksik. Dengan kelebihanannya tersebut, saat ini berbagai jenis vaksin baru dikembangkan dengan basis VLP. VLP dapat diproduksi dari berbagai sistem ekspresi gen rekombinan diantaranya sistem ekspresi sel bakteri, sel ragi, sel serangga, sel mamalia, sel tanaman, dan cell-free system.

### Abstract

Vaccine becomes a very effective strategy to deal with various infectious diseases even to the point of eradication as in the *smalpox* virus. At present many conventional vaccines such as inactivated and live-attenuated vaccines. However, these vaccine methods have side effects on the population. Viral-like particle (VLP) is an alternative vaccine based on recombinant DNA technology that is safe with the same immunogenicity as conventional viruses. This vaccine has been shown to induce humoral immune responses mediated by antibodies and cellular immune responses mediated by cytotoxic T cells. With these advantages, currently various types of vaccines have only been developed on a VLP basis. VLP can be produced from a variety of recombinant gene expression systems including bacterial cell expression systems, yeast cells, insect cells, mammalian cells, plant cells, and cell-free systems.

© 2021 Program Studi S-1 Kesehatan Masyarakat Universitas Muhammadiyah Semarang

## Pendahuluan

Vaksinasi adalah prosedur untuk meningkatkan derajat imunitas, memberikan imunitas protektif dengan menginduksi respon memori terhadap patogen tertentu/toksin dengan menggunakan substansi antigen nonvirulen/nontoksik [1]. Entitas atau substansi antigen apatogenik/nonvirulen yang dapat merangsang sistem imun itu sendiri disebut dengan vaksin. Pengembangan

vaksin saat ini telah memasuki abad keempat. Imunisasi aktif dimulai di Cina atau di India dengan praktek variolasi, dimana virus cacar (*smalpox*) sendiri diberikan secara artifisial untuk pencegahan penyakit yang disebabkan oleh virus ini [2]. Edward Jenner (1796) menemukan kemungkinan untuk memberikan vaksinasi melawan *smalpox* menggunakan materi dari *cowpox*, merupakan orang yang mengawali

perkembangan imunologi terutama dalam pengembangan vaksin [1-3]. Penemuan tersebut merupakan vaksin hidup yang dilemahkan (*live, attenuated*) pertama yang diciptakan.

Vaksin dijadikan terapi untuk banyak penyakit karena kemampuannya untuk mempercepat induksi respon imun spesifik karena vaksin dapat membentuk memori imun [5-7]. Memori imun ini dibentuk oleh sel limfosit, baik sel B maupun sel T, pada saat awal terjadinya infeksi antigen. Sel memori bisa bertahan selama bertahun-tahun sehingga saat terjadi paparan kembali oleh antigen yang sama, sel-sel memori ini akan merespon lebih cepat dan lebih efektif melawan antigen [5,6]. Karena efektifitasnya tersebut, vaksin banyak digunakan dalam berbagai program eradikasi penyakit dan pencegahan pandemi. Contohnya pada program eradikasi *smalpox* yang telah berhasil dicapai dan program persiapan pandemi influenza (*Pandemic Influenza Preparedness Framework*) dengan tujuan untuk meningkatkan persiapan dan respon terhadap pandemi influenza [5,8].

Vaksin dapat diproduksi dengan berbagai cara. Vaksin yang banyak beredar saat ini umumnya vaksin yang diproduksi dengan metode konvensional, yaitu vaksin inaktif dan vaksin hidup yang dilemahkan (*live-attenuated vaccine*). Meskipun vaksin ini sangat efektif dalam menginduksi respon inang, contohnya pada penyakit cacar yang disebabkan oleh virus *smalpox* dapat dieradikasi dan penyakit polio saat ini menuju eradikasi, namun vaksin ini mempunyai efek samping terhadap populasi [9,10]. Pembuatan kedua jenis vaksin konvensional mungkin relatif lebih mudah dan tidak perlu mengidentifikasi antigen protektif namun hal ini bisa menimbulkan kelainan respon imun protektif [10] dan bahkan dapat menyebabkan penyakit pada individu yang diimunisasi [11]. Sehingga, ketika setiap antigen telah diketahui fungsi dan efek sampingnya, akan lebih aman dan efisien jika vaksin yang dibuat fokus pada antigen yang dapat menimbulkan respon imun [10]. Dengan berkembangnya teknologi, maka dibuatlah vaksin subunit yang dibuat berdasarkan komponen spesifik yang bersifat imunogenik dari suatu patogen. Vaksin jenis ini memang lebih aman dibandingkan vaksin inaktif dan vaksin hidup yang dilemahkan, namun jenis vaksin ini kurang protektif dan imunogenik serta membutuhkan dosis yang tinggi dengan beberapa kali dilakukan *booster* yang seringkali juga harus ditambahkan adjuvan [9].

Teknologi rekayasa genetika terutama rekombinan DNA yang semakin berkembang sejalan dengan berbagai pengembangan vaksin berbasis teknologi. Beberapa jenis vaksin teknologi ini antara

lain *reverse genetic* [12], vaksin DNA [13], vaksin universal (protein konservatif) [14], vaksin *virus-like particle* (VLP) [9,11], dan vaksin vektor virus [15]. Teknologi DNA rekombinan memungkinkan protein antigen yang diinginkan dalam pembuatan vaksin dapat di kloning di organisme yang tidak berbahaya seperti di sel bakteri, sel ragi, sel serangga, dan sel mamalia. Kelebihan yang lain yaitu vaksin tersebut lebih aman baik dalam proses produksi karena tidak perlu melakukan kultur patogen yang berbahaya maupun untuk imunisasi karena terhindar dari kontaminasi dari virus aslinya [9] sifat reaktogenik berkurang [10], dan juga memungkinkan pengembangan vaksin yang reaksi silang terhadap lebih dari satu jenis patogen [10,14].

*Virus-like particle* (VLP) merupakan salah satu hasil dari teknologi DNA rekombinan yang sangat potensial digunakan untuk pengembangan berbagai jenis vaksin. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, vaksin subunit mempunyai kelemahan seperti kurang imunogenik dan membutuhkan dosis yang besar. Hal tersebut kemungkinan karena vaksin subunit mengalami folding yang kurang tepat pada protein subunit sehingga sistem imun kurang bisa mengenali struktur antigen tersebut [11]. VLP sebenarnya termasuk jenis vaksin subunit yang mengandung satu atau lebih jenis antigen spesifik, namun VLP mempunyai struktur dan mimik yang sama seperti virus aslinya tanpa mengandung materi genetik yang infeksius [9,11]. Vaksin VLP lebih imunogenik dibandingkan vaksin subunit biasa bahkan menyamai kemampuan virus asli yang dapat menginduksi respon imun humoral dan selular [9,11,17]. Makalah ini akan mencoba menjelaskan tentang beberapa manfaat VLP, jenis-jenisnya beserta beberapa teknik yang digunakan untuk membuatnya.

### **Virus-Like Particle (VLP)**

*Virus-like particle* adalah multisubunit protein yang memiliki kemampuan untuk *self assembly* dengan struktur yang secara keseluruhan identik dengan virus asal protein tersebut namun tidak memiliki materi genom di dalamnya [16-19]. Kata "VLP" digunakan untuk mendeskripsikan berbagai objek biologi, seperti struktur tak berkarakter dengan morfologi seperti virus yang terdapat di sampel biologi, struktur virus yang tidak berisi asam nukleat, virus infeksius yang secara kimia ataupun genetik mengalami modifikasi struktur sehingga tidak infeksius, produk rekayasa genetik yang mampu merakit dirinya sendiri (*self assembly*) hasil dari kloning dan ekspresi gen struktural virus di berbagai sistem *host* [16]. Meskipun struktur di dalamnya nya kosong, VLP masih dapat masuk ke dalam sel target dan kemudian dirilis oleh sel yang diinfeksi untuk dapat

dipresentasikan kepada sel limfosit T agar menghasilkan respon imun terhadap antigen virus tersebut [17].

Crisci *et al.* [18], mendeskripsikan beberapa keuntungan VLP yang merupakan kombinasi antara kelebihan vaksin utuh dan vaksin subunit rekombinan dalam hal imunogenisitas, keamanan, dan sifat protektif antara lain: (1) bentuk geometri yang diketahui dengan baik dan keseragaman yang luar biasa pada struktur permukaan yang berulang dan sesuai dengan yang diinginkan, (2) partikulat dan multivalen, (3) menjaga bentuk antigen asalnya, (4) aman, VLP merupakan kandidat vaksin yang non-infeksius dan non-replikatif, (5) stabilitas yang lebih tinggi dibandingkan antigen terlarut pada kondisi lingkungan ekstrim, (6) dapat diaplikasikan sebagai vektor untuk mempresentasikan antigen asing, dan (7) memenuhi persyaratan untuk menjadi vaksin DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*).

Ludwig dan Wagner [17], menyebutkan bahwa VLP merupakan alat molekular universal. Dengan bentuk yang teratur dan kemampuannya untuk membentuk dirinya sendiri, VLP merupakan partikel subviral yang stabil dan serbaguna, memiliki kemampuan sebagai adjuvant yang dapat menginduksi respon imun alami dan adaptif. Vaksin VLP komersial telah sukses melindungi manusia dari virus hepatitis B (HBV) dan human papillomavirus (HPV) dan saat ini dieksplorasi kemampuannya untuk mengatasi penyakit infeksius lain dan kanker. Beberapa vaksin VLP yang beredar di pasar antara lain Engerix<sup>®</sup> (HBV) dan Cervarix<sup>®</sup> (HPV) dari GlaxoSmithKline (GSK), Recombivax HB<sup>®</sup> (HBV) dan Gardasil<sup>®</sup> (HPV) dari Merck and Co., Inc [9]. Baru-baru ini FDA juga melisensi vaksin influenza musiman FluBlok<sup>®</sup> (Protein Sciences, Co.) yang dikembangkan dengan teknologi VLP [19]. Selain itu, dari beberapa penelitian pengembangan vaksin HIV dengan metode ini dapat menstimulasi respon imun yang baik, sehingga menjadi kandidat kuat untuk dijadikan vaksin untuk menanggulangi penyakit AIDS. Bentuk yang unik pada VLP dan virosome, bentuk salinan VLP yang disintesis *in-vitro*, saat ini banyak dipelajari pada bidang nanobioteknologi sebagai template organik untuk pengembangan biomaterial baru [17].

VLP memperlihatkan epitope antigenik pada konformasi yang tepat dan dengan keseragaman pengulangan yang tinggi, sehingga lebih mudah berikatan silang dengan reseptor imunoglobulin sel B dan mengaktifasi sel B. Sebagai antigen eksogen, VLP ternyata juga dapat menginduksi respon imun selular yang dimediasi sel T. Pengenalan antigen pada VLP oleh sel T sitotoksik kemungkinan disebabkan

karena komponen protein permukaan pada VLP masih mengandung domain pengikatan terhadap reseptor sel inang sehingga dapat masuk ke dalam sel melalui jalur masuk virus asalnya [20]. Selain itu, pada VLP yang dikembangkan dengan sistem ekspresi baculovirus, biasanya masih terkontaminasi dengan Baculovirus rekombinan pada saat pemanenan sel. Masuknya baculovirus rekombinan bersama dengan VLP memicu aktifnya respon imun yang bereaksi terhadap antigen-antigen tersebut [11].

VLP sebagian besar tidak membutuhkan adjuvan karena struktur VLP merupakan adjuvan itu sendiri [20]. Oleh karena itu, selain sebagai vaksin VLP juga dimanfaatkan untuk *drug delivery*, terapi gen, dan terapi imun. Beberapa pengobatan untuk penyakit genetik hereditas dan yang diakuisisi (*acquired*) dengan terapi gen merupakan salah satu perkembangan nanoteknologi [16]. Dibandingkan dengan kontainer nanopartikel lain, struktur ikosahedral, berfilamen, dan berenvelop pada VLP merupakan pembawa gen yang menjanjikan [21,16].

Sejak pertama kali dikembangkan tiga dekade yang lalu, lebih dari 100 jenis VLP [16] dari lebih dari 30 virus yang berbeda [11] telah dikonstruksi dari berbagai sistem ekspresi baik dari sel bakteri, sel ragi, sel serangga, sel mamalia, maupun diluar sel (*cell-free system*) [9,11,16,20]. Beberapa review menjelaskan secara lengkap jenis-jenis VLP, dari nama vaksin, struktur virus asal, sistem ekspresi yang digunakan pada setiap jenis vaksin, platform VLP, dan informasi lain [9,16]. Secara umum, bentuk struktur VLP dibedakan seperti pada virus asalnya, yaitu ada VLP yang non-envelop dan VLP berenvelop [9]. Bentuk VLP nonenvelop ada yang memiliki struktur sederhana yang hanya terdiri dari satu macam protein kapsid, ada juga yang multilayer yang tersusun dari lebih dari satu macam protein kapsid [11].

Pada kasus lain, VLP juga dapat dimanfaatkan sebagai platform untuk mempresentasikan epitope asing dan molekul target pada struktur VLP chimeric. VLP chimeric dapat dibuat dengan cara modifikasi sekuens gen VLP, seperti fusi protein pada protein pembentuk VLP dan protein asing dapat ikut terbentuk selama sintesis *de novo*. Fusi sekuens peptida dengan gen inti (HbcAg) dari virus hepatitis B merupakan contoh pertama dari metode tersebut. VLP chimeric menyediakan tempat untuk penggabungan antigen heterolog pada VLP, termasuk antigen yang tidak dapat *self-assembly* dalam bentuk partikel (contohnya epitope CTL dan fragmen protein envelop) dan antigen dari virus yang jika tidak disertakan VLP tidak bisa menginduksi imunogenisitas optimal (contoh pada HIV dan HCV) [20].

### Teknik-Teknik Produksi Virus-Like Particle

Teknologi DNA rekombinan merupakan dasar dari hampir semua aspek bioteknologi, termasuk dalam teknik produksi VLP ini. Menurut sejarahnya, VLP rekombinan pertama kali diperoleh pada sintesis dan kloning gen *coat protein* (CP) dari antigen *core* HBV (HbcAg), antigen permukaan HBV (HbsAg), dan Tobacco mosaic virus (TMV). Contoh VLP pertama ini membangun beberapa aturan dasar dalam konstruksi VLP. Pertama, konstruksi VLP rekombinan berdasarkan pada penelitian dasar tentang virus yang bersangkutan. Kedua, kebutuhan asam nukleat untuk protein carrier virus dan untuk peptida asing dapat diperoleh secara sintetik dari proses *alignment* oligonukleotida. Ketiga, peptida asing dapat diinsert atau ditambahkan pada molekul carrier virus tanpa mempengaruhi kemampuan *self-assembly*. Keempat, VLP dapat diperoleh dari bermacam-macam host. Kelima, VLP rekombinan yang baru dikonstruksi mempunyai kelebihan yang signifikan dibandingkan virus aslinya, seperti keberadaannya yang hampir tak terbatas dan properti fungsional yang memiliki kemampuan sama bahkan lebih baik [16].

VLP rekombinan dapat dibuat di berbagai macam sel inang. Beberapa sistem ekspresi yang sampai saat ini digunakan untuk membuat VLP antara lain sel bakteri [22], sel ragi [23], sel serangga [24], sel mamalia [25], sel tumbuhan [26], dan sistem di luar sel (*cell-free system*) [27]. Setiap sistem mempunyai kelebihan dan kelemahan masing-masing, sehingga pemilihan sistem ekspresi yang akan digunakan untuk mengkonstruksi VLP perlu menjadi pertimbangan peneliti. Berikut ini akan dijelaskan satu persatu teknik VLP dengan menggunakan berbagai sistem ekspresi tersebut.

### Sistem Ekspresi Sel Bakteri

Bakteri merupakan sistem ekspresi yang paling banyak digunakan untuk membuat protein karena selain merupakan sistem ekspresi pertama yang digunakan pada rekayasa protein, sistem ini relatif paling mudah, cepat dan ekonomis dibandingkan sistem ekspresi yang lain. Namun, sistem ekspresi bakteri bukanlah platform yang baik untuk produksi VLP karena sel bakteri tidak memiliki beberapa faktor termasuk absennya sistem modifikasi pasca-translasi seperti yang ada pada sel eukariot [9]. Selain itu, sel bakteri tidak mampu dalam membentuk ikatan disulfida yang benar, bermasalah pada kelarutan protein yang dihasilkan, dan juga kemungkinan kontaminasi dari endotoksin bakteri [16]. Meskipun begitu, bakteri tetap bisa digunakan untuk memproduksi VLP non-envelop pada komponen patogen yang dapat melakukan *self-assembly* di sel

bakteri atau sebagai protein fusi dimana antigen target vaksin difusikan pada protein permukaan bakteriofaga [9]. Sistem bakteri *Escherichia coli* merupakan teknologi yang paling sering digunakan pada banyak riset dan keperluan industri, serta telah digunakan juga untuk produksi VLP. Selain *E. coli*, platform bakteri lain yang digunakan untuk produksi VLP adalah *Lactobacillus casei* dan *Pseudomonas fluorescens*.

Meskipun sistem ekspresi VLP pada sel eukariot menghasilkan VLP rekombinan yang lebih mirip dengan aslinya, namun sistem ekspresi prokariot masih menjadi pilihan untuk beberapa produksi VLP karena masih dapat menghasilkan VLP yang imunogenik, lebih mudah dalam produksi dan purifikasi serta ekonomis [22,28]. Penelitian yang dilakukan oleh Zang *et al.* [22] merupakan contoh konstruksi VLP dengan sistem ekspresi *Escherichia coli*. Penelitian ini berhasil membuat VLP HPV 16 dari protein L1 virus dengan teknik denaturasi, renaturasi dan *self-assembly* VLP secara *in vitro*. VLP ini dikonstruksi dengan menggunakan vektor plasmid pET (pGEM-T). Untuk memaksimalkan ekspresi protein beberapa daerah sekuen gen dimodifikasi dengan metode amplifikasi *overlap extension*. Gen protein yang telah dimutasi tersebut kemudian diinsersi ke dalam vektor. Sekuen pengkode L1 tidak mengandung kodon start dan stop, sehingga ekspresi protein diinisiasi dari kodon start yang dikode oleh leader sekuen pada vektor dan diterminasi setelah 3' His-tag. Kloning tersebut lalu dikonfirmasi dengan sekuensing. Setelah itu, transformasi dilakukan di *E. coli* dengan diinduksi oleh penambahan isopropil- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosida (IPTG). Dua hari kemudian sel dipanen. Protein L1 yang diekspresi akan terakumulasi hingga membentuk *inclusion body* pada *E. coli*. Protein dipanen dengan terlebih dahulu dilakukan lisis sel lalu disentrifugasi untuk memisahkan protein dengan debris sel. Protein L1 dipurifikasi dengan menggunakan kromatografi kolom sepharose. Protein pada setiap fraksi dianalisis dengan SDS-PAGE dan pewarnaan commassie blue. Untuk renaturasi protein L1, konsentrasi denaturasi (urea) dan agen pereduksi (DDT) dihilangkan dengan metode dialisis pada suhu 4<sup>0</sup>C. Purifikasi lebih lanjut dilakukan dengan sentrifugasi pada gradien sukrosa 10-55% dalam bufer A. Identifikasi dan kuantifikasi VLP di dalam fraksi sukrosa menggunakan ELISA dengan antibodi monoklonal yang hanya mengenali VLP yang tidak terdenaturasi.

Teknik yang telah dijelaskan di atas adalah metode untuk membuat VLP dari protein virus tunggal. Penelitian lain menjelaskan tentang konstruksi VLP protein chimeric dimana protein VP1 dari Murine

polyomavirus difusi dengan peptida M2e dari influenza H1N1 dan protein Group A streptococcus (GAS) [28].

### Sistem Ekspresi Sel Ragi

Sel ragi merupakan platform yang telah dikenal baik untuk ekspresi protein rekombinan dan digunakan untuk produksi VLP. Dua vaksin komersial berbasis VLP telah dihasilkan dengan menggunakan sistem ekspresi ini, yaitu Recombifax HB® dan Gardasil®. Meskipun telah sukses dipasarkan, sistem ini masih memiliki beberapa keterbatasan. Walaupun telah memiliki sistem modifikasi pasca translasi, prosesnya ada yang berbeda dengan sel mamalia, khususnya pada saat glikosilasi protein. Karena keterbatasan ini, umumnya digunakan untuk virus nonenvelop [9]. Namun ada juga VLP envelop yang dihasilkan dari sistem ini, seperti produksi VLP HIV dari sekuen Gag telah dapat terbentuk dengan menggunakan speroplas *Saccharomyces cerevisiae* [22].

Sistem ekspresi sel ragi, terutama pada strain *Pichia* dan *Hansenula* lebih rumit dibandingkan ekspresi *E. coli*. Pada konstruksinya, *shuttle vector* ragi harus disiapkan terlebih dahulu di bakteri, baru kemudian diintroduksi ke sel ragi sebagai vektor plasmid atau harus diseleksi untuk memperoleh rekombinan ragi yang stabil dengan transgen yang terintegrasi pada genom.

Gardasil® (Merk) [29] merupakan vaksin kuadriolen rekombinan non-infeksius yang dikembangkan dari VLP yang berasal dari protein kapsid utama dari HPV tipe 6, 11, 16, dan 18. Gardasil® merupakan vaksin pertama yang dilisensi untuk digunakan oleh wanita berusia 9-26 tahun untuk mencegah kanker serviks dan *genital wart*. VLP dari protein kapsid L1 HPV rekombinan tipe 6,11,16 dan 18 masing-masing diproduksi pada sistem ekspresi *Saccharomyces cerevisiae*. Sel pengekspresi VLP kemudian dipanen dan dilisis, lalu VLP protein L1 dipurifikasi dengan kromatografi. VLP yang telah dipurifikasi kemudian ditreatmen dengan bufer yang mengandung dithiothetitol (DTT) untuk pemisahan (*disassemble*) partikel dan selanjutnya dilakukan penggabungan kembali (*reassemble*). Pada studi klinik, setiap tipe VLP HPV diadsorpsi pada adjuvan aluminium secara terpisah. Komponen vaksin monovalen diformulasi dengan 10 mM histidin, 0,01% polisorbitat 80, dan 0,33 M NaCl. Keempat vaksin monovalen dicampur pada konsentrasi protein 40, 80, 80, dan 40 µg/ml untuk HPV tipe 6, 11, 16, dan 18, untuk membentuk vaksin kuadriolen Gardasil®. Vaksin digunakan dengan tiga kali dosis 0,5 ml dengan jadwal 0, 2 dan 6 bulan.

### Sistem Ekspresi Sel Serangga

Sistem ekspresi pada sel serangga ini juga telah banyak digunakan untuk memproduksi VLP. Sistem yang digunakan merupakan sistem yang memanfaatkan Baculovirus, salah satu virus yang menginfeksi serangga Lepidoptera. Sehingga sistem ini juga sering disebut *Baculovirus expression system* (BES) [11].

BES telah menjadi salah satu platform serbaguna untuk produksi protein rekombinan karena sistem ini menyediakan berbagai modifikasi pasca translasi seperti folding, oligomerisasi, fosforilasi, glikosilasi, asilasi, formasi ikatan disulfida, dan pemotongan oleh enzim proteolitik (*proteolytic cleavage*). Kemajuan teknologi DNA rekombinan telah memfasilitasi aplikasi BES dan membuat sistem ini memungkinkan untuk mengekspresikan berbagai protein secara bersamaan dalam satu kali infeksi dan untuk memproduksi protein multimerik dengan kemiripan fungsional yang sama dengan alamnya. Oleh karena itu, BES telah digunakan untuk produksi protein rekombinan dan konstruksi VLP. BES berperan juga dalam perkembangan vaksin subunit, termasuk vaksin VLP. Ekspresi protein rekombinan dengan kualitas tinggi, modifikasi pasca translasi, dan kapasitas untuk memproduksi berbagai protein, membuat sistem ini ideal untuk produksi VLP [11].

Baculovirus yang umum digunakan dalam produksi protein rekombinan adalah *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) dan *Bombix mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV). Keduanya dapat mengekspresikan gen asing di bawah kontrol *very-late promoter*, termasuk promotor *polyhedrin* (polh) dan 10 kDa *fibrous polypeptide* (p10). Sel line serangga lepidoptera yang paling banyak digunakan merupakan sel line turunan dari *Spodoptera frugiperda* (Sf9 dan Sf21) dan *Trichoplusia ni* (Tn5 atau dikenal dengan merek komersial High Five™). Sel-sel tersebut tumbuh optimal pada suhu 27°C dan tidak membutuhkan CO<sub>2</sub> sehingga membuat produksi protein skala besar lebih mudah di banyak laboratorium.

Hingga saat ini BES telah digunakan untuk membuat beberapa materi biologi penting, seperti interferon, antigen dan vaksin. Beberapa produk vaksin komersial yang diproduksi dengan memanfaatkan sistem ini antara lain Cervarix™ yang digunakan sebagai vaksin HPV dan yang terbaru Flublok® yang merupakan vaksin influenza musiman. Di bidang veteriner, sistem ekspresi ini telah menghasilkan dua vaksin komersial Porcilis® Pesti (Intervet) dan Bayovax® CSF E2 (Bayer) yang merupakan vaksin subunit untuk *virus classical swine fever virus* (CSFV).

Beberapa kit komersial untuk memproduksi protein rekombinan dengan menggunakan BES telah dikembangkan, diantaranya BacVector® (Merk), Bac-to-Bac® (Invitrogen), BaculoGold™ (BD Bioscience), FlashBAC (Oxford Expression Technologies), dan BacPAK™ (Clontech) [30,31]. Setiap kit mempunyai protokolnya masing-masing untuk mengembangkan protein rekombinan dengan sistem BES. Contohnya pada perbandingan metode BacVector® dan Bac-to-Bac®. Meskipun pada akhirnya kedua protokol tersebut menghasilkan Baculovirus rekombinan yang sama, namun tahap co-transfeksi untuk menggabungkan gen interest dengan gen baculovirus pada kedua protokol tersebut berbeda. Sistem BacVector® menggunakan vektor khusus yang disebut transfer vektor yang membawa gen interest untuk ditransfer ke vektor Baculovirus sehingga terbentuk Baculovirus rekombinan saat dikotransfeksikan ke dalam sel serangga [30]. Sedangkan pada sistem Bac-to-bac®, gen interest diinsersikan ke plasmid donor, kemudian ditransformasi ke dalam sel *E. coli* DH10Bac™ yang kompeten untuk mentransfer gen interest ke dalam vektor Bacmid untuk membentuk Baculovirus rekombinan [31].

Kelebihan dari BES ini antara lain dapat mengekspresikan dengan baik VLP berenvelop maupun VLP non-envelop. Selain itu BES juga dapat mengekspresikan multiprotein dalam satu sistem ekspresi dalam sel serangga. Contohnya pada konstruksi VLP virus influenza yang mengandung protein virus HA, NA dan M1. Ketiga protein tersebut dapat diekspresi dengan mentransfeksi tiga vektor baculovirus rekombinan yang berbeda yang masing-masing berisi satu gen protein influenza atau dengan menggunakan satu vektor baculovirus rekombinan yang membawa tiga gen protein virus [19].

Produksi VLP dengan menggunakan BES sudah banyak dikembangkan. Pada awal tahun 2013 ini bahkan telah ada satu vaksin VLP influenza yang dikembangkan dengan sistem BES resmi dipasarkan. FluBlok® merupakan vaksin influenza trivalen yang diproduksi menggunakan BES yang mempunyai beberapa perbedaan dibandingkan sistem embrio telur ayam tradisional. FluBlok® merupakan vaksin rekombinan protein pertama yang diterima untuk pencegahan influenza seasonal dan telah dipasarkan di USA untuk orang dewasa berusia 18-49 tahun, termasuk yang alergi terhadap telur. Vaksin ini terbukti imunogenik dengan beberapa karakter sama dengan Fluzone®, vaksin trivalen inaktif yang diproduksi dengan menggunakan sistem embrio telur ayam [32].

### Sistem Ekspresi Sel Mamalia

Beberapa klon hewan mungkin hanya dapat diekspresi di sel mamalia. Untuk memfasilitasinya, shuttle vector mamalia telah dikembangkan untuk memungkinkan klon gen dari bakteri dapat diekspresi pada sel mamalia. Seperti pada umumnya, vektor ini mengandung titik *origin of replikation* (Ori) dari bakteri dari bakteri dan gen resisten antibiotik untuk keperluan seleksi di sel bakteri. Vektor ini juga harus memiliki titik Ori yang bekerja di sel mamalia yang biasanya diambil dari virus yang menginfeksi sel hewan seperti SV40 (simian virus 40). Promotor virus sering digunakan karena sangat kuat, dapat menghasilkan banyak protein. Alternatif promotor lain yang juga bisa digunakan biasanya dari gen mamalia yang termasuk *high level expression* (contoh: gen untuk metallothionein, somatotropin, atau aktin) juga bisa digunakan. Karena gen hewan yang diklon umumnya berbentuk cDNA, vektor harus menyediakan sinyal poliadenilasi pada ujung 3' di gen yang diinsersi. Karena antibiotik tidak berbahaya terhadap sel mamalia, metode untuk marker seleksinya pun berbeda pada sel mamalia. Pada sel hewan, gen DHFR yang mengkode dihidrofolat reduktase seringkali digunakan atau gen glutamin sintetase [33].

Meskipun konstruksi dan aplikasi dari sistem sel mamalia kompleks, sistem ini sudah banyak digunakan juga untuk produksi VLP baik dalam eksperimen dasar dan industri dengan tujuan untuk membuat kandidat vaksin dan agen terapi gen. Sel mamalia yang berbeda-beda jenisnya merupakan sel inang yang efisien untuk konstruksi virus envelop kompleks, contohnya virus influenza. Sistem ini memungkinkan terbentuknya VLP yang komponen proteinnya telah mengalami glikosilasi dengan tepat yang ukuran dan bentuknya sama dengan virus aslinya, sehingga sifat imunogeniknya tinggi. Yang paling rumit dalam konstruksi VLP ini adalah ketika sel line harus diinfeksi oleh vektor virus vaccinia rekombinan yang mengekspresikan polimerase T7 dan ditransfeksi dengan plasmid bakteri yang berisi cDNA dari protein virus influenza untuk dapat memproduksi VLP [16].

Contoh produksi VLP dengan sel mamalia digunakan pada penelitian Lai *et al.* [25] yang mencari persyaratan minimal untuk membentuk VLP. Gen protein virus HA, NA, dan M1 masing-masing dikonstruksi dengan menggunakan plasmid pcDNA3.1. Setelah itu, ketiga vektor rekombinan ditransfeksi ke dalam sel HEK-293T. Sistem ekspresinya sama dengan sistem ekspresi BES yang dijelaskan pada Gambar 6. Teknik transfeksi plasmid rekombinan tersebut

mengikuti protokol kit CalPhos Mammalian Transfection (Clontech).

Selain menggunakan metode tersebut, ekspresi VLP dengan sistem mamalia juga dapat menggunakan vektor baculovirus atau sering juga disebut BacMam [35,36]. Pada penjelasan sebelumnya, telah dijelaskan bahwa vektor baculovirus digunakan pada sistem ekspresi VLP di sel serangga. Selanjutnya dikembangkan vektor baculovirus rekombinan yang mengandung elemen promotor aktif sel mamalia untuk dapat mentransfer gen di dalam berbagai macam sel mamalia. Baculovirus hibrid yang berisi genom dari berbagai virus telah sukses dihasilkan [36].

### Sistem Ekspresi Sel Tumbuhan

Selama dua dekade terakhir, tumbuhan telah menunjukkan potensi besar dalam produksi protein rekombinan untuk industri farmasi, termasuk pengembangan vaksin. Sebagai platform produksi, sistem ekspresi tumbuhan merupakan sistem yang cepat, berskala besar, ekonomis, dan bebas dari patogen mamalia. Selain itu, struktur protein, assembly, dan modifikasi pasca translasi di sel tumbuhan mirip dengan yang di sel mamalia [9].

Penggunaan tumbuhan yang *edible* (dapat dimakan) untuk produksi dan pengiriman protein vaksin merupakan alternatif yang ekonomis selain sistem fermentasi. Gen yang mengkode antigen bakteri dan virus diekspresikan dengan baik di jaringan tumbuhan untuk membentuk protein yang imunogenik. Studi pada hewan dan manusia telah menunjukkan bahwa dengan memakan tumbuhan transgenik yang berisi protein vaksin dapat menginduksi terbentuknya antibodi spesifik terhadap antigen di serum dan mukosa [37].

Perkembangan bioteknologi pada tumbuhan selama lebih dari dua dekade membuat tumbuhan transgenik memungkinkan digunakan sebagai penghasil vaksin rekombinan, termasuk vaksin VLP. Secara teori, vaksin yang dibuat di tumbuhan memiliki keuntungan antara lain: dapat diberikan secara oral, bisa dikonsumsi sebagai makanan mentah atau diproses menjadi bubuk kering di dalam kapsul, tidak memerlukan penyimpanan pada suhu dingin, menginduksi respon imun di serum dan mukosa, efisien dan ekonomis, sistem ekspresinya dapat dioptimasi, mudah dalam melakukan manipulasi genetik, mudah dalam produksi skala besar, lebih aman dibandingkan vaksin konvensional dan ideal untuk digunakan di bidang peternakan [38].

Sistem ekspresi tumbuhan dapat menggunakan beberapa spesies. Saat ini, beberapa tumbuhan yang digunakan untuk memproduksi protein rekombinan antara lain tumbuhan tembakau, kentang, tomat, pisang,

legum atau kacang-kacangan, sereal, dan alfafa. Setiap jenis tumbuhan tersebut masing-masing memiliki kelebihan dan kelemahan dalam aplikasi pembuatan rekombinan protein. Pemilihan spesies tumbuhan dan jaringan yang digunakan untuk akumulasi protein rekombinan sangat penting dipertimbangkan dan biasanya ditentukan berdasarkan tujuan dibuatnya vaksin dan bagaimana cara aplikasi vaksin untuk kedepannya. Contohnya tanaman yang bisa dimakan (*edible*) dan rasanya enak (*palatable*) dibutuhkan jika merencanakan vaksin untuk dapat dikonsumsi mentah. Kentang sudah sering digunakan sebagai sistem model ini karena keturunan transgeniknya dapat diproduksi secara efisien menggunakan *delivery* DNA yang dimediasi oleh *Agrobacterium tumefaciens*. Namun sistem tanaman palatable lain juga bisa menjadi pilihan lain, seperti ketika harus dikonsumsi tanpa dimasak karena untuk menghindari denaturasi protein rekombinan oleh panas. Untuk itu, tomat merupakan contoh pilihan yang tepat, serta telah digunakan untuk mengekspresikan protein fusi dari respiratory syncytial virus (RSV) di buahnya dan terbukti imunogenik saat diberikan secara oral. Untuk tanaman non-edible, keterbatasan tersebut diatasi dengan cara ekstraksi dan purifikasi antigen vaksin. Ekstraksi antigen sering dilakukan di tanaman tembakau transgenik, salah satu tanaman yang banyak digunakan untuk eksperimen karena beberapa keuntungan termasuk mudah untuk ditransformasi dan sekuen genomnya telah banyak diketahui. Untuk vaksin hewan, tanaman yang dipilih sebaiknya tanaman yang dapat dikonsumsi sebagai menu diet hewan tersebut [37,38].

Antigen vaksin dapat diproduksi di tanaman menggunakan dua sistem yang berbeda yaitu *stable genetic transformation* dan *transient transformation*. *Stable genetic transformation* saat ini dapat dilakukan dengan dua cara: insersi gen asing ke dalam genom nukleus atau ke genom kloroplas. Transformasi nukleus paling sering dicapai dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* yang dapat secara efisien mentransfer DNA ke dalam sel tanaman. *Transient transformation* juga digunakan tanaman untuk ekspresi antigen vaksin melalui integrasi dari gen interest ke dalam virus tanaman dan infeksi subsekuen ke tanaman yang susceptible [38]. Pembuatan VLP yang menggunakan metode *transient transformation* biasanya ditransformasi ke *Nicotiana benthamiana*, *N. Tabacum* atau *Arabidopsis thaliana* [9].

*Cell-free protein system* (CFPS) VLP juga dapat dibuat di luar sel secara *in vitro*. Sejauh ini, usaha pada bidang biology sitetik telah fokus pada konstruksi dan

implementasi sirkuit genetik, modulasi biologi, dan jalur sintetik hingga memprogram kembali organisme secara genetik. Namun, tantangan besar pada bidang ini masih ada karena pengetahuan yang belum lengkap tentang bagaimana kehidupan berjalan, begitu kompleksnya sistem sel, interferensi yang tidak diinginkan antara bagian yang asli dan bagian yang sintetik, dan fakta bahwa sel berevolusi, riuh dan memiliki agenda tersendiri seperti tumbuh dan beradaptasi [39]. Meski demikian, CPFS telah muncul sebagai platform teknologi yang kuat untuk memuaskan permintaan akan produksi protein yang sederhana dan efisien.

CPFS berasal dari ekstrak sel kasar (*crude cell extract*) yang telah digunakan selama beberapa dekade sebagai alat penelitian dalam biologi dasar dan aplikatif. Untuk memproduksi protein yang diinginkan, sistem CPFS memanfaatkan setelan komponen katalitik yang dibutuhkan untuk menghasilkan energi dan sintesis protein dari lysate kasar sel mikroba, tumbuhan atau hewan. Lysate kasar ini berisi elemen yang dibutuhkan untuk transkripsi, translasi, pelipatan protein, dan metabolisme energi (seperti ribosom, aminoasil-tRNA sitetase, inisiasi translasi dan faktor elongasi, faktor rilis ribosom, enzim *recycling* nukleotida, enzim metabolisme, chaperon, foldase, dsb). Katalis yang diaktivasi di dalam lysate sel berperan sebagai pabrik kimia untuk mensintesis dan melipat produk protein yang diinginkan terhadap substrat-substrat esensial termasuk asam amino, template nukleotida DNA dan RNA yang mengkode protein target, substrat penyedia energi, kofaktor, dan garam mineral. Setelah inisiasi sintesis protein di luar protein, produksi berlanjut hingga salah satu substrat habis terpakai atau akumulasi dari produk mencapai konsentrasi yang dapat menghambat reaksi katalitik [27].

## Kesimpulan

*Virus like-particle* yang diproduksi dengan basis teknologi rekombinan sangat potensial untuk dikembangkan. Saat ini sudah banyak sekali vaksin VLP yang dikembangkan di laboratorium maupun industri untuk mengatasi berbagai penyakit infeksi maupun penyakit degeneratif. Selain sebagai vaksin, VLP merupakan platform serbaguna yang juga dapat dijadikan sebagai *drug delivery*, terapi gen, terapi imun, dan mungkin akan lebih banyak lagi manfaat lain karena perkembangan teknologi semakin maju. Produksi VLP bisa dilakukan dengan berbagai cara dan metode yang memanfaatkan berbagai ekspresi dari berbagai sel ataupun di luar sel. Setiap platform VLP mempunyai kelebihan dan kelemahan masing-masing, sehingga beberapa pertimbangan perlu dilakukan pada saat akan

memproduksi VLP sesuai dengan tujuan yang ingin dicapai.

## Daftar Pustaka

- [1] Bratawidjaja KG, Rengganis I. *Imunologi Dasar*. Jakarta : Balai Penerbit FKUI; 2009.
- [2] Plotkin SA. [Editor]. *History of Vaccine Development*. Springer Science & Business Media, LLC; 2011.
- [3] Smith KA. Edward Jenner and the small pox vaccine. *Front Immunol*. 2011;2:1-6.
- [4] Artenstein AW. *Vaccinology in Context: The Historical Burden of Infectious Diseases*. In: Artenstein AW. *Vaccine: A Biography*. New York: Springer; 2010.
- [5] Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Rancaniello VR, Skalka AM. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*. 3<sup>rd</sup> Edition. Washington DC: ASM Press. 2009.
- [6] Sallusto F, Lanzavecchia A, Araki K, Ahmed R. From vaccine to memory and back. *Immunity*. 2010;33:451-61.
- [7] Amanna IJ, Slifka MK. Contribution of humoral and cellular immunity to vaccine-induced protection in human. *Virology*. 2011;411(2):206-15.
- [8] World Health Organization. *Pandemic influenza preparedness framework: for the sharing of influenza viruses and access to vaccines and other benefits*. 2011. Available from <http://www.who.int/influenza/resources/en/>
- [9] Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V. Virus like-particle as a highly efficient platform: diversity of target and production system and advance in clinical development. *Vaccine*. 2012;31:58-83.
- [10] Ulmer JB, Valley U, Rappuoli R. Vaccine manufacturing: challenges and solution. *Nat Biotechnol*. 2006;24(11):1377-83.
- [11] Noad R, Roy P. Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol*. 2003;11(9):438-44.
- [12] Lekcharoensuk P, Wiriyarat W, Petcharat N, Lekcharoensuk C, Auewarakul P, Richt JA. Cloned cDNA of A/swine/Iowa/15/1930 internal genes as a candidate backbone for reverse genetics vaccine against influenza A viruses. *Vaccine*. 2012. 30(8):1453-9.
- [13] Epstein SL, Tumpey TM, Mispelon JA, Lo C-Y, Cooper LA, Subbarao K, et al. DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8(8):796-801.

- [14] Gerhard W, Mozdhanowska K, Zharikova D. Prospects for universal influenza virus vaccine. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(4):569-74.
- [15] Weiner DB, Nabel GJ. The development of gene-based vectors for immunization. In: *Vaccines*. 6<sup>th</sup> edition. Elsevier, Inc. 2013, p.1232-42.
- [16] Zeltin A. Construction and characterization of virus-like Particles: a review. *Mol Biotechnol*. 2013;53:92-107.
- [17] Ludwig C, Wagner R. Virus-like particles-universal molecular toolbox. *Curr Opin Biotechnol*. 2007;18:537-45.
- [18] Crisci E, Barcena J, Montoya M. 2012. Virus-like particle: The new frontier of vaccines for animal viral infection. *Vet Immunol Immunopathol*. 2012.148:211-25.
- [19] Liu F, Wu X, Li L, Liu Z, Wang Z. Use baculovirus expression system for generating of virus-like particles: success and challenges. *Protein Expression Purif*. 2013;90:104-16.
- [20] Grgacic EVL, Anderson DA. Virus-like particle: passport to immune recognition. *Method*. 2006;40:60-5.
- [21] Lammare B, Ryadnov MG. Self-assembling viral mimetics: one long journey with short step. *Macromol Biosci*. 2011;8:503-13.
- [22] Zhang W, Carmichael J, Ferguson J, Inglis S, Ashrafian H, Stanley M. Expression of Human Papillomavirus Type 16 L protein in *Escherichia coli*: denaturation, renaturation, and self assembly of virus-like particle in vitro. *Virology*. 1998;243:423-31.
- [23] Sakuragi S, Goto T, Sano K, Morikawa Y. HIV type 1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of *Saccharomyces*. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99(12):7956-61.
- [24] Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin. *Vaccine*. 2007;25:3871-8.
- [25] Lai JCC, Chan WWL, Kien F, Nicholls JM, Peiris JSM, Garcia J-M. Formation of virus-like particles from human cell lines exclusively expressing influenza neuraminidase. *J Gen Virol*. 2010;91:2322-30.
- [26] Huang Z, Elkin G, Maloney BJ, Beuhner N, Arntzen CJ, Thanavala Y, et al. Virus-like particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. *Vaccine*. 2005;23:1851-8.
- [27] Carlson ED, Gan R, Hodgman CE, Jewett MC. Cell-free protein synthesis: application come of age. *Biotechnol Adv*. 2011; doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.016.
- [28] Middleberg APJ, Rivera-Hernandez T, Wibowo N, Lua LHL, Fan Y, Magor G. A microbial platform for rapid and low-cost virus-like particle and capsomere vaccine. *Vaccine*. 2011;29:7154-62.
- [29] Shi L, Singhs HL, Bryan JT, Wang B, Wang Y, Mach H, et al. Gardasil® : prophylactic Human Papillomavirus vaccine development – from bench top to bed-side. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;81(2):259-64.
- [29] Novagen® User Protocol. Bacvector Transfection Kit. EMD Biosciences, Inc. 2003.
- [30] Invitrogen™ User Manual. Bac-to-Bac® Baculovirus expression system: an efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins. Invitrogen, Co. 2010.
- [31] Yang LPH. Recombinant trivalent influenza vaccine (Flublok®): a review of its use in the prevention of seasonal influenza in adults. *Drugs*. 2013;73:1357-66.
- [32] Clark DP, Pazdernik NJ. *Biotechnology: Applying The Genetic Revolution*. Elsevier, Inc. 2009.
- [33] Clontech® Laboratories, Inc. CalPhos™ Mammalian Transfection Kit User Manual. Takara Bio Company. 2013.
- [34] Kost TA, Condreay JP, Jarvis DI. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 2005;23(5):567-75.
- [35] Kost TA, Condreay JP. Recombinant baculovirus as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends Biotechnol*. 2002;20(4):173-9.
- [36] Mason HS, Warzecha H, Mor T, Arntzen. Edible plant vaccines: application for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends Mol Med*. 2002;8(7):324-9.
- [37] Sala F, Rigano MM, Barbante A, Basso B, Walmsley AM, Castiglione. Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspective. *Vaccine*. 2003;21:803-8.
- [38] Hodgeman CE, Jewett MC. Cell-free synthetic biology: thinking outside the cell. *Metab Eng*. 2012;14:261-9.