

# Uso de plantas para la producción de vacunas y otros productos inmunobiológicos

Rodolfo E Bégué, MD

Profesor Asociado de Pediatría, Jefe de Infectología Pediátrica. E-mail: rbegue@lsuhsc.edu

Louisiana State University Health Sciences Center New Orleans, Louisiana, USA

Children's Hospital, Infectious Diseases

200 Henry Clay Avenue, New Orleans, LA 70118. PHO: (504) 896-9583

## ABREVIATURAS:

Ac-m = anticuerpo monoclonal

ADN= ácido desoxi-nucleico

AgsHB = antígeno de superficie del virus de la hepatitis B

AP = Antígeno Protectorio (de ántrax)

ARN= ácido desoxi-ribo-nucleico

ADNc = ADN complementario

CaHu = calicivirus humano

CMV = citomegalovirus

CSA = células secretoras de anticuerpos

ECEP = *E. coli* enteropatógena

ECET = *E. coli* enterotoxigénica

ECEH = *E. coli* enterohemorrágica

i.d. = vía intradérmica

i.g. = vía intragástrica

i.n. = vía intranasal

i.m. = vía intramuscular

i.p. = vía intraperitoneal

OMS = Organización Mundial de la Salud

PC – proteína de la cápsida

PCVN = PC del virus Norwalk

PVAs = partículas virales artificiales

PVH = papilomavirus humano

RE = retículo endoplásmico

RV = rotavirus

s.c. = vía subcutánea

TC = toxina colérica

TC-B = subunidad B de TC

TL = toxina lábil de *E. coli*

TL-B = subunidad B de TL

TMV = tobacco mosaic virus

VHA = virus de la hepatitis A

VHB = virus de la hepatitis B

VHE = virus de la hepatitis E

VHS = virus herpes simplex

VIH = virus de la inmunodeficiencia humana

VMA = virus mosaico de alfalfa

VMAl = virus mosaico de alfalfa

VMCo = virus mosaico de la coliflor

VMT = virus mosaico del tabaco

VN = virus Norwalk

VSR = virus del sincicio respiratorio

## INTRODUCCION

El desarrollo de vacunas y la implementación de programas de vacunación en el siglo XX han revolucionado la salud de nuestra sociedad moderna. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que vacunación de la población previene 3.2 millones de muertes al año, haciendo de ésta una de las acciones de salud más costo-efectivas.<sup>1</sup> Probablemente debido a que la vacuna inicial contra la viruela fue administrada por vía intradérmica, la ruta parenteral ha sido la norma para la aplicación de vacunas. Sin embargo, a pesar de ser altamente efectiva, esta ruta ha generado problemas. El uso de inyecciones requiere de materiales y entrenamiento que encarece los costos, un problema que tiene mayor repercusión en países de escasos recursos

Como los seres humanos se exponen a agentes patógenos (bacterias, virus, hongos, etc) principalmente a través de mucosas (respiratoria, gastrointestinal y genital) recientemente ha crecido el interés en el uso de mucosas para administrar vacunas. Por diferentes razones, la mucosa intestinal, vía administración oral de la vacuna, es la más conveniente. La inmunización oral estimula el tejido linfoides intestinal. Las células M son células especializadas del epitelio intestinal con capacidad de reconocer partículas extrañas - bacterias o virus – procesarlas y transportarlas a las linfocitos T y B subyacentes, iniciando la respuesta inmune. La principal molécula efectora de la respuesta inmune intestinal es la inmunoglobulina A secretoria (sIgA) que actúa inactivando el patógeno o sus productos. Lamentablemente es más difícil inducir una respuesta inmune usando la vía enteral que la vía parenteral. Una razón es la presencia de barreras naturales en el intestino (acidez gástrica, proteasas, etc) que inactivan y degradan a los patógenos, incluso antes de que lleguen a estar en contacto con la mucosa. Y segundo, el sistema inmune de las mucosas normalmente no responde a los antígenos a menos que éstos sean considerados de peligro, lo cual depende de características tales como tipo, cantidad, tamaño, y otros. Aún así, ha sido posible preparar vacunas orales contra polio, rotavirus y *Salmonella typhi*, así como una vacuna intranasal contra influenza. Todas estas vacunas usan cepas vivas atenuadas.

En 1992, la OMS anunció la "Iniciativa para la Inmunización de los Niños",<sup>2</sup> un llamado a desarrollar vacunas de bajo

costo, que no necesiten refrigeración, que puedan administrarse oralmente y que incluyan varios antígenos en simultáneo. Esta lista de prioridades ha renovado el interés en vacunas enterales, pero como los inmunógenos orales son naturalmente ineficaces debe explorarse formas novedosas de producir y presentar el antígeno, tales como el uso de sistemas de plantas. Tradicionalmente los antígenos a usarse como vacunas son extraídos directamente de los patógenos cultivados en el laboratorio o son sintetizados por bacterias u hongos recombinantes. Estos sistemas requieren de métodos laboriosos y costosos de producción, fermentación y purificación que acrecientan los costos del producto final. Como las células vegetales comparten procesos biosintéticos básicos con células humanas, teóricamente es posible alterar genéticamente plantas para que sintetizen proteínas humanas o proteínas de patógenos que normalmente infectan humanos. Y, si estas proteínas pudieran usarse luego de un procesamiento simple, aún cuando el costo inicial de manipulación genética sea alto, la producción a larga escala sería barata. Aún más, la célula vegetal puede actuar como un sistema natural de bio-encapsulamiento: las capas de pared celular, membrana celular y membrana interna encapsulan y protegen al antígeno de la barrera gástrica y favorecen la activación del sistema inmune intestinal.

## CONCEPTOS BASICOS DE INGENIERIA GENÉTICA Y EXPERIMENTACION EN VACUNAS

Transformación es el proceso de inserción artificial de ADN foráneo en una célula, de modo que esta célula adquiera la capacidad de producir (o expresar) la proteína foránea. La célula receptora se denomina “transformada” (porque ha adquirido una característica que no tenía antes) o transgénica (porque tiene ADN foráneo). Una forma de transformación es con el uso de virus específicos para la célula receptora. Primero se modifica genéticamente el virus de modo que el gen correspondiente a la proteína de interés, o mejor aún una secuencia de ADN correspondiente a un segmento de la proteína (o polipéptido) que incluye el epítipo inmunogénico, se inserta en el ADN viral creando un virus mixto o “quimera”. El siguiente paso es infectar la célula con el virus modificado, el que se replica generando miles de copias. Estos virus híbridos o quimeras pueden entonces ser purificados y usados para inmunizar sujetos lo que usualmente resulta en una respuesta mixta a la proteína viral y al epítipo inmunogénico añadido. Como los virus normalmente infectan células, este sistema es bastante eficiente y resulta en la producción de altas cantidades de inmunógeno. La desventaja es que el virus puede dañar la célula receptora (aún cuando se trate de usar mutantes de baja virulencia).

También puede usarse plásmidos u otras formas de ADN transferible; colectivamente se les llama “vectores”. Plásmidos naturales han sido modificados en el laboratorio quitándoles pedazos de ADN inútiles y añadiéndoles pedazos que confieren características útiles. Estos plásmidos comerciales tienen un “promotor” que es el segmento reconocido por la célula receptora para iniciar transcripción del ADN; vectores que transportan ADN entre diferentes líneas celulares usualmente tienen más de un

promotor (por ejemplo para células bacterianas y mamíferas); algunos promotores son más activos que otros y expresan mayores cantidades de proteína. Inmediatamente después del promotor viene la “zona de inserción” donde se introduce el ADN de la proteína de interés (“inserto”). Esta zona está formada por una serie de sitios de inserción, que son secuencias de 6-8 nucleótidos reconocibles por endonucleasas de alta especificidad (eg, BamHI, HindIII, XhoI, etc). Las endonucleasas cortan el ADN circular del vector en estos sitios específicos abriéndolo para poder colocar el inserto y luego cerrarlo nuevamente con una enzima denominada ligasa. El plásmido también tiene un gen de resistencia antibiótica. Esto permite identificar las células transformadas ya que estas crecen en un medio con antibióticos, mientras que las células originales no transformadas son destruidas por el antibiótico. Y además fuerza a la célula transformada a conservar el vector ya que favorece su supervivencia. A veces el promotor es inducible de modo que se activa – y la proteína se sintetiza - sólo bajo ciertas circunstancias (eg, cambios físicos o químicos). Esto permite controlar la cantidad y el momento en que se expresa la proteína, lo cual puede ser importante especialmente si la proteína es tóxica.

Una forma especial de transformación, peculiar en plantas, es el uso de *Agrobacterium tumefaciens*. *Agrobacterium* son bacterias de plantas que contienen el plásmido Ti. Una sección de éste plásmido es denominada T-ADN que tiene la habilidad de introducirse en el genoma de la planta. T-ADN ha sido manipulado para poderse usar como un vector. ADN foráneo puede insertarse en T-ADN, el vector construido introducirse en *Agrobacterium* y la bacteria usarse para infectar células vegetales (hojas, callo, etc). El resultado final es que el ADN foráneo termina insertado en el cromosoma de la planta (no extra-cromosomal como un plásmido) y la célula transgénica puede usarse para reconstituir una planta completa. Esta transformación es estable y puede transmitirse a la progenie pero desafortunadamente resulta en cantidades limitadas de proteína. Una forma de aumentar la cantidad de proteína expresada es insertando el ADN foráneo en genoma de cloroplastos (en vez del genoma nuclear) que al tener copias múltiples resulta en mayor síntesis de proteínas. Por conveniencia la mayoría de investigadores empiezan transformando plantas modelos tales como *Arabidopsis thaliana* o tabaco (*Nicotiana spp*); y luego proceden con plantas mayores tales como papa, arroz, trigo, tomate, etc. La expresión de la proteína recombinante en la planta transformada puede confirmarse preparando extractos de los tejidos y haciendo un inmunoblot (eg, Western blot), en el que con el uso de antisuero específico se visualiza la banda de proteína del tamaño esperado. Luego puede purificarse el antígeno por medios físicos o por inmunoafinidad, o puede usarse el extracto proteico crudo directamente para inmunizar animales por vía oral, otras mucosas, o vía parenteral. Para mejorar la respuesta inmune al antígeno puede usarse un “adyuvante”; el adyuvante oral más eficiente es toxina colérica, pero como es tóxico a veces se prefiere otro (subunidad B de toxina colérica o toxina lábil de *E. coli*, u oligonucleótidos CpG); vía parenteral puede usarse adyuvante de Freund o hidróxido de aluminio. Sangre o secreciones intestinales puede obtenerse de los animales inmunizados para detectar

la presencia de anticuerpos (IgG o IgA) contra la proteína usando el método de ELISA. Puede hacerse estudios de neutralización in vitro para confirmar que los anticuerpos producidos son capaces de neutralizar la citotoxicidad del patógeno o interferir con la habilidad de infectar células. Finalmente, los sujetos inmunizados pueden ser inoculados con el patógeno para determinar si están protegidos por la vacuna. Estos estudios se hacen en animales primero (ratones, conejos, primates, etc) y luego en humanos.

## PRODUCCION DE INMUNOLOGICOS EN PLANTAS

### I. Inmunoglobulinas (Ig)

Los primeros esfuerzos en el uso de plantas se dedicaron a la producción de proteínas humanas de probable aplicación médica. Entre ellas, las más complejas y útiles son los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig). Anticuerpos para uso médico pueden purificarse del plasma de personas inmunizadas o naturalmente infectadas. Esta fuente es limitada, sin embargo, dada la escasez crónica de donantes, la preocupación de transmisión de infecciones por el uso de productos sanguíneos y el hecho de que el proceso de purificación del anticuerpo es costoso. Algunos de estos problemas pueden solucionarse con el uso de sistemas recombinantes en bacterias o levaduras. El uso de plantas ha sido evaluado como un sistema alternativo.

#### 1. Inmunoglobulina G (IgG)

Las Ig son glicoproteínas complejas con 2 cadenas pesadas idénticas ( $\pm$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$  ó  $\kappa$  para IgA, IgD, IgE e IgG, respectivamente) y 2 cadenas ligeras idénticas ( $\rho$  ó  $\lambda$ ). En 1989 Hiatt y col<sup>3</sup> en los Estados Unidos de Norte-América (EE.UU.) purificaron ARN mensajero de un hibridoma y sintetizaron ADNc de las cadenas  $\kappa$  y  $\rho$  del anticuerpo monoclonal (Ac-m) presente; estas cadenas fueron entonces insertadas en el vector de plantas pMON, usadas para infectar *Agrobacterium* y luego transformar células de la planta del tabaco; las células eventualmente regeneraron plantas maduras que expresaban cadenas  $\kappa$  o  $\rho$ . Al cruzar estas plantas los investigadores obtuvieron una progenie capaz de expresar ambas cadenas simultáneamente y que al expresar simultáneamente se agregaban espontáneamente en complejos  $\kappa$  -  $\rho$  indistinguibles de la IgG original. Los autores demostraron in vitro que el anticuerpo derivado de la planta fijaba el antígeno correspondiente con la misma avidéz que el anticuerpo derivado del hibridoma original. Düring y col<sup>4</sup> en Alemania tomaron un camino diferente: los autores construyeron genes mixtos conteniendo la cadena ligera y pesada derivados de ADNc s del anticuerpo B 1-8 y transformaron tabaco. Tejidos de la planta transgénica sintetizaban ambas cadenas simultáneamente y éstas se agregaban para formar un anticuerpo funcionalmente activo con interacción específica al antígeno original. Por microscopía electrónica el anticuerpo podía detectarse en el retículo endoplásmico y los cloroplastos.

Ma y col<sup>5</sup> en el Reino Unido (R.U.) usó *Agrobacterium* para transformar *Nicotiana tabacum* para que exprese Guy's13, un Ac-m IgG1 de ratones que reconoce la proteína SA I/II de la superficie de *Streptococcus mutans*. Para crear un

simulacro de IgA, los autores reemplazaron la región constante de la cadena pesada<sup>3</sup> con la contraparte de la cadena  $\pm$  produciendo una quimera IgA/G. El anticuerpo producido por la planta era capaz de reconocer el antígeno original en la superficie de la bacteria aglutinando *S. mutans* en cultivo. Zeitlin y col<sup>6</sup> en los EE.UU. sintetizó un anticuerpo IgG contra el virus herpes simplex 2 (VHS-2) en planta de soya. El anticuerpo producido en planta era idéntico al producido en células mamíferas, tanto en sus propiedades físicas y químicas como en su capacidad de neutralizar la actividad citopática de VHS-2 en células humanas. Más aún, cuando se evaluaron en un modelo experimental de infección de ratones con VHS-2, ambos anticuerpos (el producido en plantas o en células mamíferas) protegieron a 50-100% de los animales.

Fragmentos de anticuerpos que no tienen el segmento efector Fc no pueden proteger contra infecciones, pero son más fáciles de manipular en el laboratorio que el anticuerpo completo y conservan alta afinidad por su antígeno. Por lo tanto pueden ser útiles como inmuno-reactivos para terapia o diagnóstico. Benvenuto y col<sup>7</sup> en Italia transformaron *N. benthamiana* con *Agrobacterium* para que exprese el segmento variable de la cadena pesada ( $V_H$ ), y Owen y col<sup>8</sup> en Inglaterra transformaron *N. tabacum* para que exprese una cadena única del fragmento variable scFv (cadena pesada + cadena ligera:  $V_H + V_L$ ) de una Ig. Finalmente, De Neve y col<sup>9</sup> en Bélgica transformaron *N. tabacum* y *A. thaliana* usando vectores T-ADN y obtuvieron expresión y ensamblaje del anticuerpo IgG1 MAK33 y su fragmento fijador de antígeno F(ac).

#### 2. Inmunoglobulin A (IgA)

IgG es el principal anticuerpo en sangre pero IgA es el encargado de protección a nivel de mucosas. Esta Ig está formada por 2 cadenas  $\pm$  pesadas y 2 cadenas ligeras ( $\rho$  ó  $\lambda$ ). La forma activa de IgA en mucosas es sIgA que está formada por 2 moléculas de IgA unidas por un pequeño polipéptido (cadena J) más un polipéptido denominado componente secretorio (CS). Como se describió previamente, en 1994 Ma y col<sup>5</sup> prepararon moléculas de IgA a partir de la modificación de IgG. Para sintetizar sIgA los investigadores<sup>10</sup> transformaron *N. tabacum* para expresar cada una de las 4 moléculas (quimera  $\pm$ / $\rho$ ,  $\rho$ , J y CS), cruzaron las plantas y obtuvieron una progenie que expresaba las 4 moléculas simultáneamente. La planta que expresaba las 4 cadenas era capaz de ensamblarlas correctamente y producir sIgA funcional (híbrido sIgA/G) demostrado por inmunoblot y ELISA; 57% de IgA estaba en la forma de sIgA. Los anticuerpos así producidos reconocían SA I/II y se unían a *S. mutans*, la causa de caries dental en humanos. Finalmente, los autores procedieron a evaluar la eficacia de su producto.<sup>11</sup> Voluntarios humanos colonizados con *S. mutans* recibieron clorexidina para erradicar la bacteria y luego 2 veces por semana por 3 semanas se les aplicó a los dientes sIgA/G derivado de plantas, el Ac-m original IgG Guy's 13 ó placebo (un Ac-m contra otro antígeno). Los sujetos que recibieron sIgA/G ó IgG Guy's 13 permanecieron libres de re-colonización con *S. mutans* por 4 meses mientras que los sujetos que recibieron placebo se re-colonizaron a partir del día 21.

Estos experimentos prueban que las células de humanos y plantas comparten vías biosintéticas básicas y que, dada la información genética pertinente, plantas pueden sintetizar proteínas humanas. El desarrollo de líneas de plantas capaces de producir inmunoglobulinas funcionales puede tener aplicaciones importantes en inmunoterapia pasiva.

## II. Vacunas

Otra aplicación importante de la tecnología de plantas es en el desarrollo de vacunas que puedan utilizarse para proteger a la población general contra una enfermedad común. En este caso el objetivo es expresar no el anticuerpo sino el antígeno y dejar al sistema inmune de la persona que genere los Ac correspondientes. Esto resultaría en protección activa de larga duración. La comunidad científica ha hecho progresos en la expresión de diferentes antígenos.

### 1. Patógenos Virales

#### A. Virus Entéricos

##### a) Virus Norwalk (VN)

Los calicivirus son una extensa familia de virus que causan enfermedad intestinal en humanos y animales. Los calicivirus humanos (CaHu) son la causa principal de brotes de diarrea (a diferencia de diarrea endémica) en países desarrollados (y quizás también en países en desarrollo). Los CaHu se agrupan en 2 géneros: los similares al virus Norwalk (VN) y los similares al virus Saporó. No hay vacunas contra estos virus, en parte porque no se entiende bien la inmunología contra estos virus y porque hay marcada variabilidad antigénica con poca reacción cruzada. Los esfuerzos por hacer una vacuna se han centrado en la proteína de la cápsida del virus Norwalk (PCVN) y han encontrado que PCVN sintetizado artificialmente en células de insecto se agregan en partículas virales artificiales (PVAs) que pueden usarse como vacunas.

Mason y col<sup>12</sup> en los EE.UU. transformaron hojas de tabaco y tubérculo de papa para que expresen PCVN. El producto extraído del tabaco (t-rPCVN) era idéntico en sus propiedades físicas y químicas al producto derivado de células de insecto (i-rPCVN) y ambos se agregaban en PVAs de 38 nm. A continuación, ratones CD1 recibieron extractos de hoja de tabaco (que contenían 50 mg t-rPCVN) vía intragástrica (i.g.) ó 4 g de papa transformada (~ 60 mg p-rPCVN) vía oral en días 1, 2, 11 y 28. Al día 40 casi todos los animales habían desarrollado en suero y heces anti-VN, determinado por ELISA. Los niveles de IgA anti-VN variaron entre 0.33-4.12 ng/mg cuando se administró toxina colérica (TC) 10 mg como adyuvante al régimen anterior, y 0.08-4.21 sin TC; la TC indujo mayores Ac al principio pero al final los niveles fueron similares con o sin TC. El mismo grupo entonces procedió con experimentación en humanos.

<sup>13</sup> Veinte voluntarios adultos recibieron 150 g de papa cruda, pelada (dosis estimada: 215-715 mg p-rPCVN) 2 dosis (días 0, 21) o 3 dosis (días 0, 7 y 21); 19 (95%) de los sujetos desarrolló un aumento en el número de células secretoras de anticuerpos (CSA) específicos para IgA; 4 (20%) desarrollaron IgG en suero y 6 (30%) IgA en heces. Las respuestas fueron estadísticamente significativas pero modestas. Los efectos adversos (náusea y retortijones) ocurrieron con igual frecuencia en sujetos que consumieron

papas naturales o transformadas. Ningún sujeto desarrolló anticuerpos contra potatina (la proteína de la papa). En este estudio no se evaluó la eficacia del producto para proteger contra infección por el VN.

##### b) Rotavirus (RV)

Rotavirus (RV) es la causa más frecuente de diarrea infantil en el mundo con 140 millones de casos y 1 millón de muertes anuales. Los RV humanos pertenecen al grupo A, determinado por la proteína viral 6 (VP6). Anti-VP6 aparece con frecuencia luego de infección por RV, pero estos anticuerpos no son neutralizantes y su rol en inmunidad es cuestionable. Los RV humanos pertenecen a varios serotipos, determinados por la proteínas de la cápsida VP7 y VP4. Anti-VP7 y anti-VP4 son anticuerpos neutralizantes y participan en protección. Una vacuna contra RV, basada en virus recombinantes humanos, representativos de los 4 serotipos más frecuentes, fue aprobada para uso universal pero se canceló cuando se evidenció que provocaba intususcepción. Recientemente han aparecido 2 nuevas vacunas contra RV que no parecen causar esa complicación.

En 2000, O'Brien y col<sup>14</sup> en Nueva Zelanda expresaron VP6 en *N. bethiana* y notaron que las moléculas se agregaban en PVAs. En forma similar, Yu y Langridge<sup>15</sup> en los EE.UU. insertaron VP6 de un RV de ratón en papa (*Solanum tuberosum*) por transformación con *A. tumefaciens*. La inmunización oral (día 0, 7, 17 y 24) de ratones CD-1 con papa transgénica (5 g conteniendo aproximadamente 15 µg de VP6) más TC resultó en la aparición de anti-VP6 IgG en suero (títulos: 1:80-1:1280) e IgA en intestino (títulos: 1:8-1:32). Wu y col<sup>16</sup> en China insertaron VP7 de RV humano (serotipo G1) en *S. tuberosum* y administraron el tubérculo transgénico (42 µg VP7) más TC (10 µg) oralmente a ratones (día 0, 7, 14 y 42). Los animales inmunizados desarrollaron IgG en suero e IgA (niveles más altos) en el intestino; los anticuerpos en suero no eran neutralizantes pero los anticuerpos en intestino sí lo eran. Dong y col<sup>17</sup> también en China transformaron alfalfa con VP6 de RV humano e inmunizaron ratones hembras BALB/c con 10 mg alfalfa transformada (24 µg VP6) más oligonucleótidos ricos en CpG (10 µg) como adyuvante. Los cachorros nacidos de las hembras inmunizadas estuvieron parcialmente protegidos contra diarrea al ser inoculados con el RV simio SA-11. Finalmente, Saldaña y col<sup>18</sup> en México transformaron plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) doblemente para que expresen VP2 y VP6. La co-expresión de las proteínas resultó en su ensamblaje en PVAs. Un extracto de proteína (100 µg, equivalente a 1 µg proteína de RV) más adyuvante de Freund se administró vía intraperitoneal (i.p.) 3 veces a ratones BALB/c y resultó en un aumento significativo 9-veces de anticuerpos anti-RV.

##### c) Poliovirus

En los 1980's poliovirus causaban por lo menos 350,000 casos de parálisis flácida aguda en el mundo. En contraste, gracias a la campaña de erradicación de polio, en 2004 se reporten sólo 1,252 casos. Hay 2 vacunas contra polio: la vacuna oral atenuada Sabin y la vacuna inyectable inactivada Salk.

Fujiyama y col <sup>19</sup> en Japón modificaron genéticamente el virus mosaico del tabaco (VMT) insertando fragmentos de ADN codificando una secuencia de 15 aa derivados de las proteínas VP3 y VP1 de la cápsida de poliovirus tipo 1 Sabin y transformaron plantas de *N. tabacum*. Cuando se inyectó a ratones, las partículas virales quiméricas indujeron anticuerpos contra ambos: proteínas de poliovirus y del VMT.

## **B. Virus Respiratorios**

### **a) Rinovirus**

Rinovirus son la causa principal del resfriado común, una enfermedad raramente severa pero de gran morbilidad. En 1994 Porta y col <sup>20</sup> en R.U. infectaron plantas de alberja con un virus mosaico de la alberja (VMA) genéticamente modificado para contener sitios antigénicos del rinovirus humano 14 (residuos 85-98 de VP1). La partícula quimérica resultante fue administrada intramuscularmente (i.m.) a conejos (100  $\frac{1}{4}$ g primero seguido de 50  $\frac{1}{4}$ g de refuerzo en días 21 y 24 más adyuvante de Freund) con la consecuente aparición de anticuerpos que reaccionaron con VP1 de rinovirus en Western blot.

### **b) Virus del Sincicio Respiratorio (VSR)**

VSR es uno de los patógenos respiratorios más importantes en niños y una causa frecuente de bronquiolitis y neumonía. Los esfuerzos iniciales para desarrollar una vacuna inactivada en formalina resultaron en una respuesta paradójica con exacerbación de los síntomas cuando el sujeto se exponía a VSR natural. Recientemente los esfuerzos se han centrado en el desarrollo de una vacuna utilizando subunidades del virus, principalmente la glicoproteína F de la cubierta viral que es responsable de la fusión del virus con la célula infectada, o la proteína G que interactúa con el receptor de membrana. Sandhu y col <sup>21</sup> en los EE.UU. transformaron plantas de tomate para expresar VSR-F y administraron oralmente 3-4 g de tomate a ratones BALB/c en días 0, 4, 14, 18 y 28. De los ratones inmunizados, 88% mostró un aumento significativo de anti-VSR-F IgG e IgA en suero. Una dosis subsecuente de refuerzo consistente en antígeno inactivado de VSR produjo un aumento en el nivel de anticuerpos de 1.6 -1.8 veces. Además, con la dosis de refuerzo 72% de los ratones desarrolló anticuerpos intestinales IgA contra RSV-F. Yusibov y col <sup>22</sup> prepararon un polipéptido de 21 aa correspondiente a VSR-G, lo insertaron en el virus mosaico de alfalfa (VMAI) y usaron la quimera para infectar plantas de *N. tabacum*. Los investigadores purificaron el virus recombinante de la planta transformada y usaron 500  $\mu$ g para inmunizar (día 0, 12 y 21) i.m. macaques resus y cinomolgus quienes desarrollaron un aumento significativo de anticuerpos en el día 28 del experimento. No se evaluó protección.

### **c) Virus del Sarampión**

Infección por el virus del sarampión conlleva alta morbilidad y mortalidad, especialmente en niños pequeños. La vacuna basada en una cepa atenuada ha sido utilizada desde los 1960s resultando en una reducción marcada de esta enfermedad a nivel mundial. El virus del sarampión es relativamente estable, a menos desde el punto de vista de inmunológico, de modo que la vacuna protege contra todas las cepas.

En 2001, Huang y col en Australia <sup>23</sup> transformaron plantas de tabaco para que expresen la hemaglutinina (H) del virus del sarampión, una glicoproteína expuesta en la superficie del virus. Ratones adultos BALB/c fueron inoculados i.p. con proteína H derivada de plantas o recibieron i.g. extractos de hojas transformadas en días 0, 4, 14, 21, 35, 49 y 63 (cada dosis de 0.3-0.4 g de extracto de hojas más TC-B) y desarrollaron IgG anti-sarampión en suero con actividad neutralizante in vitro. En un siguiente reporte, el mismo grupo mostró que la inmunogenicidad de la vacuna oral podía aumentarse con la administración previa de 1 dosis de vacuna a ADN. <sup>24</sup> Más recientemente, los investigadores replicaron los experimentos de transformación usando lechuga, una planta comestible. <sup>25</sup> Extractos de lechuga conteniendo proteína H indujeron anticuerpos neutralizantes luego de su administración i.p ó intranasal (i.n.). Nuevamente, animales pre-inmunizados con vacuna a ADN y que luego recibieron lechuga transformada oralmente mostraron un aumento de 10 veces en su título de anticuerpos anti-sarampión. El producto era altamente estable: extractos desecados de lechuga permanecieron estables a temperatura ambiente por lo menos por 13 meses y por 1 semana a temperaturas de 50 °C.

Otro grupo en Francia <sup>26</sup> siguió la misma estrategia y transformó plantas de zanahoria para expresar proteína H. La inmunización de ratones con extractos de hoja o raíz resultó en títulos elevados de IgG1 e IgG2a. Los investigadores luego cambiaron de estrategia: <sup>27</sup> en vez de transferir toda la proteína H, se concentraron en un epítipo conformacional de la proteína (H381-400). Como los péptidos de pequeño tamaño son poco inmunogénicos, introdujeron copias repetidas del epítipo y lo fusionaron a un epítipo de toxoide tetánico (tt830-840) para crear un poliepítipo de mayor inmunogenicidad (la secuencia total era de 1.1 kpb). El gen así creado se introdujo en T-ADN del vector binario pBIN19, bajo el control del promotor del virus mosaico de la coliflor (VMCo), luego en *A. tumefaciens* LBA4404 y se usó para transformar plantas de zanahoria (*Daucus carota* L.). Proteína purificada y extractos de proteína se usaron para inmunizar ratones BALB/c i.p. (500  $\mu$ g extracto más adyuvante de Freund en 4 dosis). Los animales inmunizados desarrollaron altos títulos de anticuerpos anti-sarampión capaces de neutralizar virus clínicos de diferentes regiones geográficas y genotipos.

### **d) Virus del Síndrome Respiratorio Severo Agudo (SARS)**

En 2003-2004 el mundo fue testigo de la diseminación global de un virus previamente desconocido, denominado SARS que causó por lo menos 8,400 casos y 800 muertes. El agente causante es un coronavirus (Co-SARS). La glicoproteína S de la superficie del virus induce anticuerpos neutralizantes que son protectivos contra la enfermedad. Estos anticuerpos se fijan al extremo amino (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) de la proteína (denominado S1), el cual es responsable de la fijación del virus a la célula infectada. Pogrebnyak y col <sup>28</sup> en los EE.UU. transformaron tomate y tabaco de baja nicotina para que expresen S1. Luego usaron extractos de plantas para inmunizar ratones BALB/c por vía oral (sin adyuvante) o vía subcutánea (s.c.) con adyuvante de Freund. Tomate administrado vía oral produjo anticuerpos anti-S1 IgA en el intestino. Tabaco administrado vía

parenteral no resultó en la aparición de anticuerpos pero el nivel aumentó marcadamente al dar 1 dosis de refuerzo de proteína S viral, sugiriendo que el sistema inmune había sido pre-estimulado. No se evaluó protección.

## C. Otros Virus

### a) Virus de la Hepatitis B (VHB)

En el mundo más de 300 millones de personas viven crónicamente infectadas por el VHB. Desde 1982 se ha tenido una vacuna basada en el antígeno de superficie del virus (AgsHB) y que induce los correspondientes anticuerpos (anti-AgsHB) los cuales protegen contra la infección. Inicialmente el AgsHB a ser usado en la vacuna se purificaba de la sangre de personas crónicamente infectadas. Posteriormente se desarrolló sistemas recombinantes en levaduras que sintetizan el AgsHB. Con el objeto de abaratar los costos de fermentación y purificación y producir vacunas de bajo costo, recientemente se ha explorado el uso de plantas para expresar el AgsHB.

En 1992 Mason y col<sup>29</sup> en EE.UU. usaron *Agrobacterium* para transformar plantas de tabaco que expresen AgsHB. El antígeno producido por las plantas era física, química y morfológicamente idéntico a AgsHB purificado de suero humano e igualmente se agregaba en partículas esféricas de 22 nm. En un siguiente estudio<sup>30</sup> los investigadores extrajeron AgsHB de las plantas de tabaco transgénicas, lo purificaron parcialmente y lo administraron i.p. a ratones BALB/c en dosis de 0.5 ¼g AgsHB en días 0, 7 y 14 con adyuvante de Freund. La inmunización estimuló linfocitos B y T, evidenciado en anticuerpos anti-AgsHB en suero y proliferación in vitro de células T de ganglio linfático. La respuesta inmune fue algo menor - pero todavía significativa – en comparación con inmunización con una vacuna comercial (también administrada 0.5 ¼g i.p., mismo régimen). El mismo grupo luego evaluó el efecto de inmunización oral.<sup>31</sup> Prepararon tubérculos de papa con AgsHB y administraron oralmente 5 g (5.5 ¼g AgsHB) más 10 ¼g TC como adyuvante a ratones BALB/c en días 0, 7 y 14. La respuesta inmune primaria (medida como anti-AgsHB totales en suero) fue máxima en la semana 3 (73 mUI/ml) pero desapareció en la semana 6. Una dosis subsecuente de refuerzo i.p. con vacuna comercial (0.5 ¼g rAgsHB) produjo niveles altos (1,680 mUI/ml) y sostenidos de anticuerpos. Como referencia, un nivel de AgsHB >10 mUI/ml es considerado protectorio en humanos.

Los investigadores luego<sup>32</sup> compararon la inmunogenicidad como vacuna oral de AgsHB presentado en plantas vs AgsHB preparado en levadura (vacuna comercial, rAgsHB). Transformaron papa e inmunizaron oralmente ratones BALB/c con 5 g de tubérculo (~42 ¼g AgsHB por dosis) más 10 ¼g TC en días 0, 7 y 14. Para determinar si se había generado células inmunes de memoria, administraron una dosis adicional de rAgsHB en la semana 6. Los ratones que recibieron rAgsHB derivado de levadura no mostraron una respuesta primaria, y tuvieron una respuesta secundaria débil (pico ~ 180 mUI/ml). Por otro lado, los ratones que recibieron papa con AgsHB tuvieron una buena respuesta primaria (pico 103 mUI/ml) y una respuesta secundaria fuerte (pico 3,300 mUI/ml) y sostenida (700 mUI/ml 5 meses después). El experimento inverso mostró que la planta transformada podía también servir de refuerzo en animales

inicialmente inmunizados con 1 dosis parenteral de vacuna comercial. Además los investigadores reportaron que inmunización con la planta conteniendo el antígeno pero sin TC como adyuvante resultó en falta de respuesta primaria y una respuesta mínima al refuerzo con vacuna comercial (pico 48 mUI/ml). Si los tubérculos se hervían por 10 minutos para cocinarlos, la inmunogenicidad disminuía significativamente: no respuesta primaria y mínima respuesta secundaria (135 mUI/ml). Microscopía electrónica mostró PVAs de 17 nm dentro de vesículas intracelulares. Los investigadores especularon que estas vesículas podrían proteger el antígeno de las barreras intestinales naturales y favorecer su interacción con el sistema inmune.

Experimentos pre-clínicos con hallazgos similares a los descritos han sido reportados por otros grupos en China<sup>33</sup> transformando tomatillo para expresar AgsHB, Corea del Sur<sup>34</sup> transformando papa para expresar AgsHB y el antígeno pre S2, y en Rusia transformando papa para expresar AgsHB<sup>35</sup> ó AgcHB.<sup>36</sup>

Dos grupos han procedido con experimentos clínicos de pequeña escala. Thanavala y col<sup>37</sup> en los EE.UU. administró 100 g de papa transformada (aproximadamente 850 µg AgsHB) oralmente a 16 voluntarios (día 0, 14 y 28) y 10 (62%) desarrolló anti-AgsHB (aumento de 1.9-30.4 veces con respecto al basal). En busca de una preparación “comestible” de la vacuna, Kapusta y col<sup>38</sup> en Polonia transformaron lechuga para que exprese AgsHB. Ratones que recibieron este producto mostraron una buena respuesta inmune. Luego, los investigadores dieron de comer a 3 voluntarios humanos 200 g de lechuga transformada, seguido de 150 g dos meses después. Dos semanas luego de la segunda dosis tres voluntarios tuvieron una respuesta adecuada (>10 mUI/ml) pero que decayó posteriormente. En un siguiente reporte<sup>39</sup> el mismo grupo inmunizó 7 voluntarios más 3 veces en semana 0, 1 y 5 (AgsHB 0.5, 0.8 y 0.9 ¼g, respectivamente). Todos los sujetos desarrollaron anti-HBsAg pero el nivel más alto fue de sólo 6.3 mUI/ml. De modo que hubo respuestas inmunes pero pobres. En estos experimentos humanos no se usó adyuvantes.

Ramirez y col en Cuba<sup>40</sup> usaron una estrategia diferente: en vez de AgsHB prepararon anti-AgsHB. Empezaron con un Ac-m IgG1 de ratón utilizado para la purificación comercial de AgsHB, amplificaron las cadenas pesada y ligera del gen y los insertaron en tandem en el vector, precedido de una secuencia (KDEL) que dirige la proteína al retículo endoplásmico, y transformaron células de tabaco (*N. tabacum*). El anticuerpo se expresó a niveles 0.5% de la proteína total de la planta y fue tan efectivo como el Ac-m original para la purificación de AgsHB.<sup>41</sup>

### b) Otros Virus de la Hepatitis

En cuanto al virus de la hepatitis A (VHA), Hu y col<sup>42</sup> en China construyeron el vector pBI121-A que contiene el gen de la proteína de la cápsida del VHA fusionado a los flancos de inserción del plásmido Ti, bajo el control del promotor VMCo35S. Introdujeron el vector en *A. tumefaciens* LBA4404 y transformaron exitosamente plantas de Citrus. El reporte no incluyó experimentos adicionales con el producto de la planta.

En cuanto al virus de la hepatitis E (VHE), Maloney y col<sup>43</sup> en los EE.UU. transformaron plantas de papa para que expresen proteína de la cápsida de VHE a niveles de 5-30 µg/g tubérculo fresco. Sin embargo, la proteína expresada en planta no se agregaba en PVAs (como normalmente ocurre cuando la proteína se expresa en células de insecto) y ratones inmunizados con el producto vía oral no desarrollaron anticuerpos. Por otro lado Ma y col<sup>44</sup> en China, usando suero de un paciente infectado, amplificaron una porción de ADN de 810 pb (denominada E2) correspondiente a la región 394-604 aa del ORF2 del VHE, lo insertaron en el vector pCAMBIA1301, luego en *A. tumefaciens* y transformaron plantas de tomate. Los niveles de expresión de la proteína recombinante fueron 61.22 ng/g tejido fresco en la fruta y 6.37-47.9 ng/g en las hojas. No se hizo experimentos con animales. Similarmente, otro grupo en China<sup>45</sup> insertó el fragmento E2 en el vector pRB94, específico para plástidos, y transformaron plantas del tabaco (*N. tabacum*). La proteína se expresó a niveles tan altos como 13.27 µg/g de hojas frescas y fue capaz de inducir la aparición de anticuerpos cuando se utilizó para inmunizar ratones

### c) Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

Desde el inicio de la pandemia de VIH en los 1980s, más de 50 millones de personas han sido infectadas y 16 millones han fallecido, la mayoría en países en desarrollo. Cada día 15,000 personas se infectan y 7,000 personas mueren en el mundo debido al VIH. El tratamiento con anti-retrovirales no cura la infección y no está al alcance de muchos de los infectados. Hasta el momento no se conoce que haya inmunidad contra el VIH.

En 1994 Porta y col<sup>20</sup> en el R.U. infectaron alverjas con una quimera del VMA que contenía residuos antigénicos de la cepa IIB de VIH-1 (correspondiente a los residuos 731-752 de gp41). La quimera extraída de la planta en Western blot reaccionaba con antisuero específico para VIH-1. Más aún, ratones C57BL/6 fueron inmunizados s.c. con la quimera más adyuvante de hidróxido de aluminio y desarrollaron anticuerpos capaces de neutralizar cepas de VIH-1.<sup>46</sup> Los anticuerpos desaparecieron luego de 7 semanas pero reaparecieron luego de una dosis de refuerzo. Los investigadores entonces evaluaron la inmunogenicidad del producto administrado i.n. u oralmente.<sup>47</sup> Todos los ratones inmunizados i.n. (10 ¼g VMA-VIH equivalente a ~0.17 ¼g VIH-1 gp41 más 1 ¼g TC) en días 0 y 28 desarrollaron anti-VIH IgA en intestino e IgG en suero. Inmunización oral (a dosis hasta de 500 ¼g VMA-VIH) en días 0, 7, 14, 21 y 35 fue menos inmunogénico induciendo un nivel bajo de anticuerpos IgG en sólo 40% de los animales y no IgA. Yusibov y col<sup>48</sup> en los EE.UU. fusionaron la proteína de cubierta del VMAI con péptidos del espiral V3 de VIH-1. Los antígenos sintetizados en la planta estimularon anticuerpos neutralizantes de VIH en ratones inmunizados i.p. (7 dosis a intervalo de 2 semanas, 10 ¼g por inyección, con adyuvante de Freund). No se hizo estudios de protección pero estos resultados muestran que es posible expresar proteínas de VIH en plantas. El mismo grupo<sup>49</sup> insertó el gen correspondiente a la proteína Tat de VIH (con codones optimizados para expresión en plantas) en el VMT y usó el vector para infectar plantas de espinaca. Ratones que comieron espinaca infectada con VMT-Tat en días 0, 7 y 14

no desarrollaron anticuerpos; sin embargo una dosis adicional de vacuna ADN Tat indujo la aparición de anticuerpos, lo que sugiere un fenómeno de pre-estimulación inmune por el Tat de la planta.

### d) Citomegalovirus (CMV)

CMV es una causa frecuente de infecciones en la población general. Estas infecciones son usualmente benignas y asintomáticas, excepto en el neonato o el paciente inmuno comprometido en los que la infección puede ser sistémica y potencialmente letal. No existe una vacuna y los antivirales tienen poca eficacia clínica. Anticuerpos neutralizantes contra CMV son estimulados principalmente por la glicoproteína B (gB) de la cubierta viral. Tackaberry y col<sup>50</sup> en Canada expresaron gB de CMV humano en plantas de tabaco y mostraron que el antígeno derivado de plantas neutralizaba la infección de fibroblastos por CMV. El estudio no reportó inmunogenicidad o protección del producto.

### e) Papilomavirus Humano (PVH)

Setenta por ciento de mujeres sexualmente activas se infectan con PVH en algún momento. Hay más de 100 tipos de PVH; de ellos PVH tipos 16 y 18 son la causa de 70% de casos de cáncer cervical y PVH 6 y 11 causan 90% de casos de verrugas genitales. Los tipos se determinan por la proteína viral L1. Cuando se expresa en altas cantidades L1 se agrega para formar PVAs, lo cual aumenta su inmunogenicidad. Recientemente, en EE.UU. se ha aprobado el uso de una vacuna contra PVH, de administración i.m. en 3 dosis, la vacuna es producida en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y contiene L1 de los PVH tipos 6, 11, 16 y 18.

Versani y col<sup>51</sup> en Sud-Africa transformaron *N. tabacum* para expresar L1 de VPH-16. La proteína se concentraba en extractos de hojas (2-4 µg/g tejido fresco) y agregaba en VPAs. Cuando se inmunizó conejos con las partículas producidas en planta se obtuvo una respuesta inmune leve. Biemelt y col<sup>52</sup> en Alemania reportaron hallazgos similares al transformar plantas de tabaco y papa. La administración oral de tubérculos de papas transformadas indujo anti-L1 en sólo 3 de 24 ratones; pero aún así, 11 de los 21 restantes tuvieron una respuesta anamnésica luego de una dosis adicional subinmunogénica de L1. Warzecha y col<sup>53</sup> en los EE.UU. prepararon L1 de PVH-11 (con codones optimizados para expresión en plantas) y transformaron tabaco y papa. La expresión de L1 mejoró cuando removieron el extremo carboxilo (COO<sup>-</sup>) de la proteína (que media localización en el núcleo); la proteína se agregaba en PVAs. Nuevamente, la administración oral de L1 derivado de papa no resultó en anticuerpos pero hubo una respuesta anamnésica luego de una dosis adicional de PVH-PVAs preparado en células de insecto.

### f) Virus de la Rabia

Rabia es una enfermedad áltamente mortal que afecta mamíferos principalmente salvajes pero también animales domésticos (perros) en países en desarrollo. Cada año, por lo menos 55,000 casos de rabia humana ocurren en el mundo. El control de la enfermedad se basa en inmunización regular de animales, con inmunización de humanos cuando ocurren casos de exposición de riesgo.

McGarvey y col <sup>54</sup> en los EE.UU. transformaron plantas de tomate, vía infección con *A. tumefaciens* para expresar la proteína G de la superficie del virus de la rabia. Microscopía electrónica mostró que las partículas antigénicas se acumulaban en el aparato de Golgi, vesículas intracelulares y la pared celular. Yusibov y col <sup>48</sup> en los EE.UU. fusionaron la proteína de cubierta del VMAI con péptidos del virus de la rabia (Drg24) e infectaron plantas de tabaco. La quimera producida en la planta (VMAI-Drg24) indujo anticuerpos neutralizantes contra virus de la rabia en ratones Swiss-Webster inmunizados i.p. Luego los investigadores <sup>55</sup> usaron el mismo sistema para infectar hojas de espinaca e inocularon ratones i.p. con 50  $\frac{1}{4}$ g de VMAI-Drg24 derivado de la planta en 3 dosis en intervalos de 2 semanas. Los animales inmunizados mostraron protección parcial (40% supervivencia) luego de una dosis letal de virus de rabia. La administración oral del antígeno purificado (250  $\frac{1}{4}$ g por dosis, 4 dosis en intervalos de 2 semanas) estimuló la aparición de anticuerpos IgG e IgA específicos en suero. Animales alimentados con hojas de espinaca (7 dosis diarias de 25  $\frac{1}{4}$ g seguido de 7 días de dieta normal, por 4 ciclos) desarrollaron IgA en heces a niveles mayor que los que recibieron antígeno purificado. La administración i.n. de una cepa atenuada de virus de la rabia (que enferma pero no mata a los animales) resultó en síntomas más leves en los animales inmunizados comparado a los controles, lo que sugería un protección parcial. En estos experimentos no se usó un adyuvante. Ashraf y col <sup>56</sup> en India transformaron *N. tabacum* para expresar proteína G del virus de la rabia (a 0.38% del total de proteína soluble de la hoja). La administración i.p. de proteína G purificada de la planta a ratones resultó en la aparición de anticuerpos anti-rabia que protegió a los animales contra una dosis letal intracerebral de virus de la rabia vivo.

## 2. Patógenos Bacterianos

### A. Bacterias Entéricas

#### a) *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ECET)

ECET es un agente causal importante de diarrea a nivel mundial. Entre otros, la bacteria produce una toxina lábil (TL) compuesta de 1 subunidad A y 5 subunidades B. Diferentes fuentes de evidencia sugieren que los anticuerpos contra la subunidad B de TL (TL-B) pueden ser protectivos. Haq y col <sup>57</sup> en los EE.UU. transformaron plantas de tabaco y papa para expresar TL-B. Luego procedieron a inmunizar ratones BALB/c oralmente en días 0, 4, 14 y 18; un grupo recibió 5 g de tubérculo transformado (15-20 mg TL-B) y un segundo grupo recibió 20 mg de TL-B recombinante (rTL-B) expresado en *E. coli*. Ambos grupos desarrollaron niveles similares de IgG en suero e IgA en intestino. Un siguiente estudio por el mismo grupo <sup>58</sup> nuevamente mostró que ratones alimentados con tubérculos transformados en 3 dosis semanales de 5 g cada una (20-50 mg TL-B) desarrollaron anti-TL-B IgG en suero e IgA en heces a niveles comparables a los de ratones que recibieron rTL-B (3 dosis semanales de 5 mg TL-B cada una). Más aún, cuando se les administró dosis tóxicas de TL (25  $\frac{1}{4}$ g) ambos grupos mostraron una protección parcial contra diarrea (reducción de 15% y 22% en fluido intestinal para los que recibieron TL-B de tubérculo o rTL-B, respectivamente, en

comparación a controles). Luego los investigadores procedieron a usar tubérculos de papa transformados bajo el mismo protocolo <sup>59</sup> para expresar TL-B y los dieron a 14 voluntarios adultos sanos quienes ingirieron 50g ó 100 g (3.7-15.7 mg TL-B por g de papa); los sujetos control recibieron 50 g de papa sin transformar. Los sujetos vacunados desarrollaron en suero CSA anti-TL IgG e IgA 14-28 días luego de la inmunización. Niveles séricos de anti-TL IgG e IgA se detectó en 91% y 55% de voluntarios, respectivamente, así como IgA intestinal en 50%. Ninguno de los sujetos desarrolló anticuerpos contra potatina.

Otro grupo reportó una experiencia similar. Streatfield y col <sup>60</sup> en EE.UU. transformó maíz para expresar TL-B. Ratones BALB/c que fueron alimentados con maíz transgénico (con 5 ó 50  $\frac{1}{4}$ g TL-B) en días 0, 7 y 21 tuvieron una buena respuesta de IgG en suero e IgA en intestino. En este experimento, la respuesta de IgA intestinal fue mejor en los ratones inmunizados con TL-B expresado en maíz que con TL-B purificado. Más aún, los ratones inmunizados estaban protegidos contra TL. Luego, los investigadores dieron de comer maíz transgénico a voluntarios adultos (1 mg TL-B, 3 dosis). <sup>61</sup> Siete de los 9 voluntarios desarrollaron anti-TL IgG y CSA en suero y 4 de 9 IgA en heces.

Laustergar y col <sup>62</sup> en Holanda transformaron tubérculos de papa para expresar TL-B (17  $\frac{1}{4}$ g TL-B por g de tejido). TL-B expresada en papa se agregaba en pentámeros y fijaba gangliósidos GM1, que son los receptores naturales de TL-B. Inyección s.c. de TL-B purificada de plantas indujo anticuerpos séricos a nivel similar a los inducidos por rTL-B derivado de *E. coli*. La administración oral de 5 g de tubérculo de papa (~ 65 mg de TL-B) en 3 dosis interdiarias resultó en anti-TL-B IgG en suero e IgA intestinal. Sin embargo, la repuesta inmune era evidente sólo en los animales previamente vacunados parenteralmente con TL-B y no en los que recibieron sólo la dosis oral derivada de la planta. Chikwamba y col <sup>63</sup> en EE.UU. expresaron TL-B en maíz y encontraron que la inmunización oral de ratones BALB/c indujo anticuerpos anti-TL-B; la respuesta fue mejor en animales que recibieron maíz transformado con TL-B que los que recibieron maíz natural con TL-B añadido. Los animales inmunizados tuvieron menos acumulación de fluido en asa intestinal cuando se les administró TL ó TC. Finalmente otros grupos han explorado otras estrategias. Kang y col <sup>64</sup> en Corea del Sur usó TLK63 (un mutante no-tóxico de TL) y transformó cloroplastos de planta de tabaco usando una técnica de bombardeo por partículas lo cual aumentó la cantidad de proteína recombinante producida a 3.7% del total de proteína soluble; la inmunogenicidad o eficacia protectora del producto no fueron investigados. Y Piller y col <sup>65</sup> en EE.UU. transformaron planta de soya con la subunidad C de la fimbria de *E. coli* K99 (FanC). Los ratones inmunizados i.p. con extracto de proteínas de las hojas de plantas transgénicas desarrollaron anticuerpos anti-FanC y linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos para el antígeno.

#### b) Otras cepas de *E. coli*

*E. coli* enteropatogénica (ECEP) son causa importante de diarrea. Protección contra ECEP depende de anticuerpos contra factores de virulencia secretorios tales como BfpA y otros. Da Silva y col <sup>66</sup> en Brasil amplificaron el gen correspondiente a BfpA, lo insertaron en el vector pIBT11, transformaron *A. tumefaciens* y luego *N. tabacum*. La



proteína recombinante se expresó a niveles de 7.7% de la cantidad total de proteína soluble. Ratones BALB/c fueron inmunizados oralmente 3 veces (día 0, 15 y 30) con 20  $\frac{1}{4}$ g de extracto de proteína. Usando análisis por inmunoblot los investigadores demostraron la presencia cualitativa de anticuerpos anti-BfpA en suero y heces; los títulos no fueron precisados y no se hizo estudios de protección.

*E. coli* enterohemorrágica (ECEH) causa colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico; la enfermedad es mediada por la secreción de toxinas Shigélicas (Stx). El serotipo más representativo es *E. coli* O157:H7, que primariamente infecta al ganado pero que puede afectar a humanos que consumen carne poco cocida u otros productos. El control de la infección incluye principalmente vacunación de los animales. Judge y col <sup>67</sup> en EE.UU. prepararon plantas transgénicas de tabaco que expresan el extremo carboxilo (COO<sup>-</sup>) de la proteína intimina de *E. coli* O157:H7 que sirve para unirse a la célula receptora. Luego inmunizaron ratones (oralmente, i.p. o ambos) con intimina derivada de plantas y encontraron que sólo los animales que recibieron inmunización primaria parenteral seguida de refuerzo oral desarrollaron anticuerpos específicos en mucosa; además encontraron que los animales inmunizados con este régimen tuvieron excreción reducida de *E. coli* O157:H7 cuando se les inoculó con la bacteria. En un siguiente estudio, <sup>68</sup> el mismo grupo transformó tabaco para expresar una forma detoxificada (toxoides) de Stx2. La inmunización i.p. de ratones con Stx2 detoxificado derivado de plantas resultó en niveles séricos elevados de anticuerpos y todos los ratones sobrevivieron a una dosis letal de toxina Stx2 natural (a una dosis 10 veces la dosis letal 50%). Ratones alimentados con células de la planta conteniendo toxoide Stx2 (5 g en días 0, 7, 14, 21 y 28) desarrollaron anticuerpos IgG en suero e IgA intestinal capaces de neutralizar la actividad tóxica de Stx2 natural en células Vero.

### c) *Shigella flexneri*

*Shigella flexneri* causa disentería bacteriana. El antígeno del plásmido de invasión (IpaC) cumple una función esencial en la entrada de la bacteria a las células epiteliales. MacRae y col <sup>69</sup> en EE.UU. insertó el gen *ipaC* en el vector pBI121, lo introdujo en *A. tumefaciens* y transformó plantas de *A. thaliana*. La proteína recombinante IpaC se expresó a niveles de 1.9-2.3  $\mu$ g/mg proteína total. El estudio no reportó la inmunogenicidad o valor protectorio del producto.

### d) *Vibrio cholerae*

Cepas de *Vibrio cholerae* O1 que producen toxina colérica (TC) pueden causar cólera en humanos. Aún cuando la mayoría de individuos experimentan infección asintomática o con síntomas leves, algunos pueden presentar deshidratación severa. El potencial epidémico del cólera – aún no bien explicado – ha causado gran morbilidad y mortalidad a través de la historia. Actualmente existe una vacuna parenteral contra cólera pero es de valor limitado. Vacunas orales están en desarrollo y por lo menos una ellas se usa en Europa (cepa atenuada *Vibrio cholerae* CVD103-HgR). Similar a lo que ocurre con la toxina lábil de *E. coli* (TL), TC también tiene 1 subunidad A toxigénica y 5 subunidades B (TC-B) no-toxigénicas. Los datos sugieren que anticuerpos contra TC-B pueden ser protectivos contra cólera.

En 1997 Arakawa y col <sup>70</sup> en EE.UU. expresaron TC-B en plantas de papa y mostraron que la toxina resultante era mayormente oligomérica (algunas posiblemente pentaméricas), que en inmunoblot reaccionaba igual que TC-B bacteriana y fijaba a GM1, los receptores naturales de TC. La cocción de los tubérculos redujo la cantidad de TC-B pentamérica a la mitad. Los investigadores <sup>71</sup> procedieron a inmunizar ratones CD-1 alimentándolos con 3 g de papa transgénica (~90 mg TC-B cada vez) en días 0, 6, 17 y 24 y un refuerzo el día 65. Los ratones desarrollaron anti-TC-B IgG, IgM e IgA en suero así como IgA e IgG en heces; los títulos declinaron luego de la última dosis pero reaparecieron con la administración de la dosis de refuerzo. El suero de los animales inmunizados neutralizaba la toxicidad de TC en células Vero; y al recibir TC los ratones inmunizados presentaron 62% menos acumulación de fluido en el asa intestinal. La acción protectoria de sIgA era mediada por inhibición de la unión de TC a GM1. A modo de comparación, ratones que recibieron una dosis menor de papas transgénicas (1 g conteniendo 30 mg TC-B) desarrollaron anticuerpos pero menor capacidad de neutralización y menor reducción (42%) de fluido en el asa intestinal; y ratones que recibieron TC-B de origen bacteriano (30 mg cada vez) desarrollaron niveles de anticuerpos 2 veces más altos, capacidad de neutralización 4 veces mayor y una reducción similar (55%) de fluido en el asa intestinal. Estos resultados sugirieron que TC-B bacteriana (sea el producto en sí o la manera de administración) era más inmunogénica que el producto transgénico obtenido de plantas; pero también ilustran la discrepancia entre niveles de anticuerpos y protección. Jani y col <sup>72</sup> en India transformaron *N. tabacum* con el gen de TC-B añadiendo una secuencia de retención para el retículo endoplásmico (SEKDEL) y bajo el control del promotor VCo 35S. Prepararon extractos de plantas (5  $\mu$ g TC-B) y al inyectar vía intradérmica (i.d.) a ratones BALB/c, éstos desarrollaron anticuerpos en suero y activación de células T del bazo.

### e) *Helicobacter pylori*

*H. pylori* es la infección bacteriana crónica más frecuente y causa gastritis, enfermedad úlcero-péptica y cáncer gástrico. La infección no induce una inmunidad protectoria lo que ha dificultado el desarrollo de una vacuna. Entre los diferentes antígenos investigados como probables vacunas, el más prometedor es la subunidad B de la proteína ureasa (ureasa B). Usando transformación con *Agrobacterium*, Brodzik y col en Polonia <sup>73</sup> expresaron ureasa B en tabaco (*N. tabacum*) y zanahorias (*Daucus carota*), y Gu y col en China hicieron lo mismo en tabaco <sup>74</sup> y arroz. <sup>75</sup> Estos estudios no evaluaron la inmunogenicidad o eficacia protectoria del producto. Zhang y col, <sup>76</sup> por su lado transformaron tabaco con otra proteína (HspA) de *H. pylori*, y describieron que la inmunización de ratones vía mucosas con extractos de tabaco transgénico indujo anticuerpos específicos. La protección por estos anticuerpos no fue estudiada.

## B. Otras Bacterias

### a) *Bacillus anthracis*

La causa de ántrax, una enfermedad que normalmente afecta animales herbívoros pero que ocasionalmente puede infectar humanos, o incluso ser usado como agente de guerra biológica. La molécula más importante, en cuanto a inmunización contra ántrax, es el denominado Antígeno

Protectivo (AP). Aziz y col<sup>77</sup> en India transformaron plantas de tabaco con el gen del AP (*pag*) y demostraron expresión de AP en la planta por análisis de Western blot usando antisuero contra AP natural. El AP derivado de plantas (junto con otra proteína de *B. anthracis* denominada Factor Letal) mostraron citotoxicidad en líneas celulares de macrófagos. En busca de una alternativa “comestible”, el mismo grupo<sup>78</sup> luego transformó tomate con el gen *pagA* e inmunizaron ratones i.p. con 4 dosis semanales crecientes de hasta 300 ¼g de extracto proteico, y describieron que los animales desarrollaron anticuerpos anti-AP. Estudios in vitro mostraron que estos anticuerpos podían neutralizar la actividad citotóxica en macrófagos de AP y Factor Letal. Por último, Koya y col<sup>79</sup> en EE.UU. transformaron cloroplastos de la planta de tabaco con *pagA*. Las hojas de las plantas transformadas expresaban AP en cantidades de 14.2% del total de proteína soluble. Nuevamente, estudios de toxicidad mostraron que el AP derivado de la planta tenía la misma potencia que el AP derivado de *B. anthracis*. La inmunización de ratones s.c. con AP parcialmente purificado de los cloroplastos o AP derivado de *B. anthracis* indujo altos niveles de anticuerpos IgG en suero (1:320,000) y ambos grupos sobrevivieron a una dosis letal de toxina.

#### **b) *Yersinia pestis***

El agente causante de la plaga, una enfermedad de animales pero que puede ser transmitida a humanos por la picadura de pulgas infectadas o inhalación de material infectado. Los dos antígenos principales en inmunidad contra este agente son las proteínas F1 y V. Alvarez y col<sup>80</sup> en EE.UU. transformaron tomate para expresar F1 y V simultáneamente como una proteína fusionada. Luego inmunizaron ratones BALB/c s.c. con 2 dosis (10 ¼g en días 0 y 11) de F1-V purificada y mezclada con hidróxido de aluminio como adyuvante, seguido de 4 dosis orales (300 µg en días 21, 28 y 35, y 1200 µg en día 42) de F1-V con TC (10 ¼g). Todos los animales inmunizados desarrollaron anticuerpos IgG en suero e IgA en heces. En un experimento similar,<sup>81</sup> el mismo grupo transformó *N. benthamiana*, extrajo F1-V e inmunizó cuyes (25 µg en días 0, 30 y 60). Los animales desarrollaron niveles altos de anticuerpos (17,000-20,000) que los protegieron contra una dosis letal de *Y. pestis*.

#### **c) *Clostridium tetani***

TetC es un polipéptido (47 kDa), fragmento no-tóxico de la toxina tetánica, que puede usarse como una probable vacuna contra el tétano. Tregoning y col<sup>82</sup> en EE.UU. transformaron cloroplastos de tabaco con el gen *tetC*. La inmunización i.n. (día 0, 28 y 35) de ratones con TetC derivado de la planta indujo IgG en suero e IgA en secreciones nasales e intestinales. Los animales inmunizados mostraron protección y no desarrollaron parálisis luego de una dosis de toxina tetánica (50 veces la dosis paralizante 50%).

#### **d) *Mycobacterium tuberculosis***

Tuberculosis causa por lo menos 8.9 millones de infecciones y 1.7 millones de muertes en el mundo cada año. Existe una vacuna (BCG) ampliamente utilizada pero de eficacia modesta, por lo que diversos grupos están buscando

mejores alternativas. Rigano y col<sup>83</sup> en EE.UU. transformaron *Arabidopsis thaliana* para expresar el antígeno ESAT-6 de *M. tuberculosis* fusionado a TL-B de *E. coli*. La proteína fusionada ESAT-6-TLB derivada de la planta fue administrada oralmente a ratones e indujo activación de células específicas CD4<sup>+</sup> y un aumento en la producción de Interferón- $\gamma$ , lo cual indica una respuesta primordialmente tipo Th1; en las placas intestinales de Peyer los investigadores encontraron una respuesta tipo Th2.

#### **e) *Borrelia burgdorferi***

Infección por *B. burgdorferi* causa la enfermedad de Lyme. La inmunidad contra esta infección es mediada por la lipoproteína bacteriana OspA, la cual debe ser lipidada para tener inmunogenicidad; este requisito de lipidación limita los sistemas en los que puede expresarse este antígeno. Glenz y col<sup>84</sup> en EE.UU. transformaron cloroplastos de tabaco para expresar OspA. La proteína se expresó en cantidades de 1-10% de proteína total soluble y – más importante – estaba adecuadamente lipidada. Ratones BALB/c que se inmunizaron s.c. (días 0, 14 y 32) con OspA purificado de la planta desarrollaron anticuerpos, a niveles considerados protectivos.

### **3. Parásitos**

#### **a) Malaria**

Malaria causa aproximadamente 1.5-2.7 millones de muertes en el mundo cada año, la mayoría en países en desarrollo. De las cuatro especies de *Plasmodium* de importancia clínica, *P. falciparum* es el más severo. No hay una vacuna contra este parásito y el tratamiento se ha dificultado debido a la aparición de resistencia antibiótica. En 1995, Turpen y col<sup>85</sup> en EE.UU. modificaron genéticamente la superficie del VMT para expresar el epítipo AGDR de la proteína del circumsporozoito de *P. vivax* e infectaron plantas de tabaco. Las plantas infectadas contenían alta cantidad de virus recombinante que reaccionaba con Ac-m específicos en Western blot. Yasawardene y col<sup>86</sup> en Sri Lanka insertaron un epítipo (P109) del antígeno de superficie-1 del merozoito de *P. falciparum* (PfMSP1) en VMA e infectaron plantas de alberja. El epítipo P109 podía detectarse fácilmente en tejidos de la planta transformada, e inmunización de conejos con la proteína quimérica indujo anticuerpos dirigidos principalmente contra el virus (VMA) y en menor grado contra el epítipo P109.

### **4. Vacunas con Múltiples Componentes**

Los avances en tecnología moderna han permitido el desarrollo de varias vacunas. Sin embargo, como la mayoría de éstas son parenterales, el número de inyecciones que debe recibir un niño ha aumentado marcadamente; como solución a este problema, es importante desarrollar productos que contengan varias vacunas simultáneamente. Yu y col<sup>87</sup> en EE.UU. prepararon papas transgénicas que expresaban una proteína fusionada conteniendo TC-B de *Vibrio cholerae*, factor de colonización I (CFA/I) de *E. coli* enterotoxigénica y la proteína no-estructural 4 (NSP4) de rotavirus. Inmunización oral de ratones CD-1 (10 ¼g de proteína recombinante) en días 0, 5, 15, 23 y 56 indujo respuesta humoral e intestinal, células de memoria CD4<sup>+</sup> y protección contra diarrea por rotavirus. Shchelkunov y col<sup>88</sup> en Rusia prepararon un gen quimérico conteniendo

epítomos ENV y GAC de VIH-1 y AgsHB y transformaron plantas de tomate. Luego usaron las frutas de estos tomates transgénicos para alimentar ratones (día 0 y 7) quienes desarrollaron anticuerpos contra ambos VIH-1 y VHB. Finalmente, como teóricamente - y apoyado por evidencia experimental - la fusión de un antígeno con su anticuerpo debe ser más inmunogénico que el antígeno solo, Chargelegue y col.<sup>89</sup> en R.U. prepararon un complejo inmune recombinante consistente en el fragmento C de la toxina tetánica fusionado a su Ac-m correspondiente. El complejo inmune fijaba con avidéz C1q y el receptor Fc<sup>3</sup>RIIa, lo cual dirigía a la molécula específicamente a células presentadoras de antígeno. Como resultado, el complejo inmune era altamente inmunogénico cuando se administró s.c. a ratones (10,000 más inmunogénico que el antígeno solo) sin requerir el uso de adyuvantes, y los animales estuvieron completamente protegidos cuando se les administró una dosis letal de toxina tetánica. Estos reportes confirman la posibilidad de sintetizar proteínas de patógenos humanos en plantas y de expresar varios componentes simultáneamente.

### III. OTROS USOS

Similarmente a lo que hemos descrito para vacunas humanas, el sistema de plantas ha sido utilizado extensamente para la producción de vacunas de uso veterinario.<sup>90</sup> También se ha usado para producir reactivos de bajo costo con fines diagnósticos, tales como AgcHB,<sup>91</sup> VP6 de rotavirus<sup>92</sup> y p24 de VIH-1.<sup>93,94</sup> Ninguno de estos antígenos induce anticuerpos neutralizantes de modo que no tienen utilidad como vacunas. Otros usos importantes incluye la síntesis de antígenos para prevenir o modificar enfermedades mediadas por el sistema inmune tales como diabetes tipo 1,<sup>95,96</sup> alergias,<sup>97,98</sup> Alzheimer<sup>99</sup> y terapia contra cáncer.<sup>100,101</sup>

### CONCLUSION

Por siglos plantas han proveído a los seres humanos con productos de valor terapéutico; estos productos en su mayor parte han sido descubiertos en forma fortuita o por un largo proceso de prueba empírica. La era de manipulación genética intencional de plantas para producir productos médicos es reciente; los resultados son preliminares pero de gran esperanza y posibilidades.

En conjunto los estudios muestran - como prueba de concepto - que los genes de patógenos humanos, tales como virus o bacteria (y teóricamente otros), pueden insertarse al cromosoma de plantas y que estas plantas (dado el promotor y señales de tráfico intracelular adecuado) pueden sintetizar la proteína y ensamblarla con la configuración espacial correcta. Más aún, proteínas humanas (tales como inmunoglobulinas, albúmina, insulina) pueden sintetizarse en plantas. Se ha sintetizado proteínas de diferentes tamaños, desde pequeños péptidos hasta proteínas grandes. Se puede sintetizar moléculas que de acuerdo a sus características físicas y químicas pueden permanecer como partículas solubles, agregarse en oligómeros (como pentámeros de TC-B o TL-B), complejos moleculares (como sIgA), o incluso formar partículas virales artificiales (como AgsHB, virus Norwalk o PVH). Esta característica probablemente sea de gran importancia en el desarrollo de vacunas ya que partículas de gran tamaño

son más inmunogénicas que moléculas solubles. La mayoría de productos transgénicos retienen su identidad antigénica y son reconocidos por anticuerpos comerciales in vitro. Algunos antígenos han sido evaluados in vivo (especialmente en ratones) y han mostrado capacidad para inducir anticuerpos específicos, algunos con actividad neutralizante. Unos pocos estudios han evaluado y demostrado que, al ser usado como vacuna, el antígeno puede proteger (en diferentes grados) contra exposición al patógeno o toxina. Finalmente, sólo 3 productos han sido estudiados en humanos (fase I): AgsHB para hepatitis B, TL-B para ECET y PCNV para virus Norwalk, y mostraron repuestas inmunes leves o modestas; en ninguno de ellos se intentó medir protección a la exposición del patógeno. Finalmente, como es usualmente el caso con tecnologías nuevas, existe la posibilidad de usar estos sistemas para aplicaciones novedosas, tales como la producción económica de reactivos diagnósticos, y el uso de plantas para inducir tolerancia contra antígenos dañinos (como los que producen enfermedades autoinmunes o alergias) o para tratar neoplasias.

Pero todavía hay barreras importantes que vencer antes de que los antígenos derivados de plantas alcancen uso rutinario en medicina. Tenemos que entender mejor la naturaleza del antígeno que se puede usar (proteína vs otros), los mecanismos de procesamiento y síntesis, el tráfico intracelular (especialmente por el retículo endoplásmico y vesículas intracelulares), mejorar el nivel de antígeno producido, la mejor ruta de administración (oral vs otras mucosas), y qué tan seguro es el producto. Aún cuando la ingestión de plantas es por naturaleza seguro, existe la posibilidad teórica de que la presentación de un antígeno foráneo en la planta lleve a una respuesta no natural, sea a la planta o al antígeno foráneo. Teóricamente pudiera ocurrir tolerancia (en vez de respuesta inmune) al antígeno foráneo o alergia (en vez de tolerancia) al antígeno de la planta. Ninguna de estas dos circunstancias se han detectado hasta el momento (cierto que hay muy poca experimentación humana). Las plantas transformadas son organismos genéticamente modificados y como tales requieren de un control riguroso. Cuando llegue el momento - y si es que la tecnología prueba ser exitosa - los productos serán considerados medicamentos bajo las correspondientes regulaciones. Contrario a lo que algunos creen, estos productos no van a ser "vacunas comestibles"; no serán frutas o vegetales de distribución y consumo libre sino medicamentos que se deben administrar en dosis y esquemas fijos y regulados. Aún así, dada su versatilidad, bajo precio y conveniencia, la producción de inmunobiológicos en plantas es una tecnología que debe continuarse explorando.

### REFERENCIAS

1. Hausdorff WP. Prospects for the use of new vaccines in developing countries: cost is not the only impediment. *Vaccine* 1996;14:1179-1186.
2. Mitchell VS, Philipose NM, Sanford J (eds). *The Children's Vaccine Initiative: achieving the vision*. Institute of Medicine. Washington: National Academy Press, 1993.
3. Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K. Production of

- antibodies in transgenic plants. *Nature* 1989;342:76-78.
4. Düring K, Hippe S, Kreuzaler F, Schell J. Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology* 1990;15:281-293.
  5. Ma JK-C, Lehner T, Stabila P, Fux CI, Hiatt A. Assembly of monoclonal antibodies with IgG1 and IgA heavy chain domains in transgenic tobacco plants. *Eur J Immunol* 1994;24:131-138.
  6. Zeitlin L, Olmsted SS, Moench TR, Co MS, Martinell BJ, Paradkar VM, Russell DR, Queen C, Cone RA, Whaley KJ. A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nature Biotechnology* 1998;16:1361-1364.
  7. Benvenuto E, Ordás RJ, Tavazza R, Ancora G, Biocca S, Cattaneo A, Galeffi P. 'Phytoantibodies': a general vector for the expression of immunoglobulin domains in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 1991;17:865-874.
  8. Owen M, Gandecha A, Cockburn B, Whitelam G. Synthesis of a functional anti-phytochrome single-chain F<sub>v</sub> protein in transgenic tobacco. *Biotechnology* 1992;10:790-794.
  9. De Neve M, De Loose M, Jacobs A, Van Houdt H, Kaluza B, Weidle U, Van Montagu M, Depicker A. Assembly of an antibody and its derived antibody fragments in *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Transgenic Res* 1993;2:227-237.
  10. Ma JK-C, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, van Dolleweerd C, Mostov K, Lehner T. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 1995;268:716-719.
  11. Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K, Vine ND, Chargelegue D, Yu L, Hein MB, Lehner T. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nature Medicine* 1998;4:601-606.
  12. Mason HS, Ball JM, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1996;93:5335-5340.
  13. Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM, Arntzen CJ. Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J Infect Dis* 2000;182:302-305.
  14. O'Brien GJ, Bryant CJ, Voogd C, Greenberg HB, Gardner RC, Bellamy AR. Rotavirus VP6 expressed by PVX vectors in *Nicotiana benthamiana* coats PVX rods and also assembles into viruslike particles. *Virology* 200;270:444-453.
  15. Yu L, Langridge W. Expression of rotavirus capsid protein VP6 in transgenic potato and its oral immunogenicity in mice. *Transgenic Research* 2003;12:163-169.
  16. Wu YZ, Li JT, Mou ZR, Fei L, Ni B, Geng M, Jia ZC, Zhou W, Zou LY, Tang Y. Oral immunization with rotavirus VP7 expressed in transgenic potatoes induced high titers of mucosal neutralizing IgA. *Virology* 2003;313:337-342.
  17. Dong JL, Liang BG, Jin YS, Zhang WJ, Wang T. Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology* 2005;339:153-163.
  18. Saldaña S, Guadarrama FE, Flores T, Arias N, López S, Arias C, Ruiz-Medrano R, Mason H, Mor T, Richter L, Arntzen CJ, Lim M. Production of rotavirus-like particles in tomato (*Lycopersicon esculatum* L.) fruit by expression of capsid proteins VP2 and VP6 and immunological studies. *Viral Immunology* 2006;19:42-53.
  19. Fujiyama K, Saejung W, Yanagihara I, Nakado J, Misaki R, Honda T, Watanabe Y, Seki T. In planta production of immunogenic poliovirus peptide using tobacco mosaic virus-based vector system. *Journal of Bioscience & Bioengineering* 2006;101:398-402.
  20. Porta C, Spall VE, Loveland J, Johnson JE, Barker PJ, Lomonosoff GP. Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. *Virology* 1994;202:949-955.
  21. Sandhu JS, Frasnianski SF, Domier LL, Sorban SS, Osadjan MD, Buetow DE. Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Transgenic Research* 2000;9:127-135.
  22. Yusibov V, Mett V, Mett V, Davidson C, Musiychuk K, Gilliam S, Farese A, MacVittie T, Mann D. Peptide-based candidate vaccine against respiratory syncytial virus. *Vaccine* 2005;23:2261-2265.
  23. Huang Z, Dry I, Webster D, Strugnell R, Wesselingh S. Plant-derived measles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 2001;19:2163-2171.
  24. Webster DE, Cooney ML, Huang Z, Drew DR, Ramshaw IA, Dry IB, Strugnell RA, Martin JL, Wesselingh SL. Successful boosting of a DNA measles immunization with an oral plant-derived measles virus vaccine. *Journal of Virology* 2002;76:7910-7912.
  25. Webster DE, Smith SD, Pickering RJ, Strugnell RA, Dry IB, Wesselingh SL. Measles virus hemagglutinin protein expressed in transgenic lettuce induces neutralizing antibodies in mice following mucosal vaccination. *Vaccine* 2006;24:3538-3544.
  26. Marquet-Blouin E, Bouche FB, Steinmetz A, Muller CP. Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.)-derived measles virus hemagglutinin. *Plant Molecular Biology* 2003;51:459-469.
  27. Bouche FB, Marquet-Blouin E, Yanagi Y, Steinmetz A, Muller CP. Neutralising immunogenicity of a polyepitope antigen expressed in a transgenic food plant: a novel antigen to protect against measles. *Vaccine* 2003;21:2065-2072.
  28. Pogrebnyak N, Golovkin M, Andrianov V, Spitsin S, Smirnov Y, Egolf R, Koprowski H. Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine. *Proc Nat Acad Sc* 2005;102:9062-9067.
  29. Mason HS, Lam D, Arntzen CJ. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1992;89:11745-11749.
  30. Thanavala Y, Yang YF, Mason HS, Arntzen C. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1995;92:3358-3361.
  31. Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nature Biotechnology* 2000;18:1167-1171.

32. Kong Q, Richter L, Yang YF, Arntzen CJ, Mason HS, Thanavala Y. Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *Proc Nat Acad Sci, USA* 2001;98:11539-11544.
33. Gao Y, Ma Y, Li M, Cheng T, Li SW, Zhang J, Xia NS. Oral immunization of animals with transgenic cherry tomatillo expressing HBsAg. *World J Gastroenterol* 2003;9:996-1002.
34. Joung YH, Youm JW, Jeon JH, Lee BC, Ryu CJ, Hong HJ, Kim HC, Joung H, Kim HS. Expression of the hepatitis B surface S and preS2 in tubers of *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Reports* 2004;22:925-930.
35. Shulga NY, Rukavtsova EB, Krymsky MA, Borisova VN, Melnikov VA, Bykov VA, Buryanov YI. Expression and characterization of hepatitis B surface antigen in transgenic potato plants. *Biochemistry-Russia* 2004;69:1158-1164.
36. Mechtcheriakova IA, Eldarov MA, Nicholson L, Shankx M, Skryabin KG, Lomonosoff GP. The use of viral vectors to produce hepatitis B virus core particles in plants. *J Virol Methods* 2006;131:10-15.
37. Thanavala Y, Mahoney M, Pal S, Scott A, Richter L, Natarajan N, Goodwin P, Arntzen CJ, Mason HS. Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Proc Nat Acad Sc* 2005;102:3378-3382.
38. Kapusta J, Modelska A, Fliegerowicz M, Pniewski T, Letellier M, Lisowa O, Yusibov V, Koprowski H, Plucienniczak A, Legocki AB. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B. *FASEB Journal* 1999;13:1796-1799.
39. Kapusta J, Modelska A, Pniewski T, Figlerowicz M, Jankowski K, Lisowa O, Plucienniczak A, Koprowski H, Legocki AB. Oral immunization of human with transgenic lettuce expressing hepatitis B surface antigen. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 2001;495:299-303.
40. Ramirez N, Rodriguez M, Ayala M, Cremata J, Perez M, Martinez A, Linares M, Hevia Y, Paez R, Valdes R, Gavilondo JV, Shelman-Housein G. Expression and characterization of an anti-(hepatitis B surface antigen) glycosylated mouse antibody in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants and its use in the immunopurification of its target antigen. *Biotechnology & Applied Biochemistry* 2003;38 (Pt 3): 223-230.
41. Valdés R, Reyes B, Alvarez T, García J, Montero JA, Figueroa A, Gómez L, Padilla S, Geada D, Abrahantes MC, Dorta L, Fernández D, Mendoza O, Ramirez N, Rodriguez M, Pujol M, Borroto C, Brito J. Hepatitis B surface antigen immunopurification using a plant-derived specific antibody produced in large scale. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2003;310:742-747.
42. Hu R, Wei H, Chen SC, He YR. Construction of the plant expression vector with hepatitis A capsid protein fusion gene and genetic transformation of Citrus. *Sinensis Osbeck. Yi Chuan* 2004;26:425-431.
43. Maloney BJ, Takeda N, Suzuki Y, Ami Y, Li TC, Miyamura T, Arntzen CJ, Mason HS. Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. *Vaccine* 2004;23:1870-1874.
44. Ma Y, Lin SQ, Gao Y, Li M, Luo WX, Zhang J, Xia NS. Expression of ORF2 partial gene of hepatitis E virus in tomatoes and immunoactivity of expression products. *World J Gastroenterol* 2003;9:2211-2215.
45. Zhou YX, Lee M, Ng J, Chye ML, Yip WK, Zee SY, Lam E. A truncated hepatitis E virus ORF2 protein expressed in tobacco plastids is immunogenic in mice. *World J Gastroenterol* 2006;12:306-312.
46. McLain L, Porta C, Lomonosoff GP, Durrani Z, Dimmock NJ. Human immunodeficiency virus type 1-neutralizing antibodies raised to glycoprotein 41 peptide expressed on the surface of a plant virus. *AIDS Research & Human Retroviruses* 1995;11:327-334.
47. Durrani Z, McInerney TL, McLain L, Jones T, Bellaby T, Brennan FR, Dimmock NJ. Intranasal immunization with a plant virus expressing a peptide from HIV-1 gp41 stimulates better mucosal and systemic HIV-1-specific IgA and IgG than oral immunization. *J Immunol Methods* 1998;220:93-103.
48. Yusibov V, Modelska A, Steplewski K, Agadjanyan M, Weiner D, Hooper DC, Koprowski H. Antigen produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5784-5788.
49. Karasev AV, Foulke S, Wellens C, Rich A, Shon KJ, Zwierzynski I, Hone D, Koprowski H, Reitz M. Plant based HIV-1 vaccine candidate: Tat protein produced in spinach. *Vaccine* 2005;23:1875-1880.
50. Tackaberry ES, Dudani AK, Prior F, Tocchi M, Sardana R, Altosaar I, Ganz PR. Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B (UL55) in seeds of transgenic tobacco. *Vaccine* 1999;17:3020-3029.
51. Varsani A, Williamson AL, Rose RC, Jaffer M, Rybicki EP. Expression of human papillomavirus type 16 major capsid protein in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *Archives of Virology* 2003;148:1771-1786.
52. Biemelt S, Sonnewald U, Galmbacher P, Wilmitzer L, Muller M. Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J Virol* 2003;77:9211-9220.
53. Warzecha H, Mason HS, Lane C, Tryggvesson A, Rybicki E, Williamson AL, Clements JD, Rose RC. Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *J Virol* 2003;77:8702-8711.
54. McGarvey PB, Hammond J, Dienelt MM, Hooper DC, Fu ZF, Dietzschold B, Koprowski H, Michaels FH. Expression of rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology* 1995;13:1484-1487.
55. Modelska A, Dietzschold B, Sleysh N, Fu ZF, Steplewski K, Hooper DC, Koprowski H, Yusibov V. Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proc Nat Acad Sci, USA* 1998;95:2481-2485.
56. Ashraf S, Singh PK, Yadav DK, Shahnawaz M, Mishra S, Sawant S, Tuli R. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. *J Biotechnol* 2005;119:1-14.
57. Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ. Oral immunization with recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 1995;268:714-716.
58. Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* 1998;16:1336-1343.

59. Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Clements JD, Levine MM, Arntzen CJ. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nature Medicine* 1998;4:607-609.
60. Streatfield SJ, Jilka JM, Hood EE, Turner DD, Bailey MR, Mayor JM, Woodard SL, Beifuss KK, Horn ME, Delaney DE, Tizard IR, Howard JA. Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine* 2001;19:2742-2748.
61. Tacket CO, Pasetti MF, Edelman R, Howard JA, Streatfield S. Immunogenicity of recombinant LT-B delivered orally to humans in transgenic corn. *Vaccine* 2004;22:4385-4389.
62. Lauterslager TGM, Florack DEA, Van der Wal TJ, Molthoff JW, Langeveld JPM, Bosch D, Boersma WJA, Hilgers LAT. Oral immunisation of naïve primed animals with transgenic potato tubers expressing LT-B. *Vaccine* 2001;19:2749-2755.
63. Chikwamba R, Cunnick J, Hathaway D, McMurray J, Mason H, Wang K. A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Transgenic Research* 2002;11:479-493.
64. Kang TJ, Han SC, Kim MY, Kim YS, Yang MS. Expression of non-toxic mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in tobacco chloroplasts. *Protein Expression and Purification* 2004;38:123-128.
65. Pillar KJ, Clemente TE, Jun SM, Petty CC, Sato S, Pascual DW, Bost KL. Expression and immunogenicity of an *Escherichia coli* K99 fimbriae subunit antigen in soybean. *Planta* 2005;222:6-18.
66. Da Silva J, Garcia A, Flores V, de Macedo Z, Medina-Acosta E. Phytosecretion of enteropathogenic *Escherichia coli* pilin subunit A in transgenic tobacco and its suitability for early vaccinology. *Vaccine* 2004;22:2091-2101.
67. Judge NA, Mason HS, O'Brien AD. Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces time of *Escherichia coli* O157:H7 shedding in feces. *Infect Immun* 2004;72:168-175.
68. Wen SX, Teel LD, Judge NA, O'Brien AD. A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2. *Proc Nat Acad Sc* 2006;103:7082-7087.
69. MacRae AF, Preiszner J, Ng S, Bolla RI. Expression of His-tagged *Shigella* IpaC in *Arabidopsis*. *J Biotechnol* 2004;112:247-253.
70. Arakawa T, Chong DKX, Merritt JL, Langridge WHR. Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Research* 1997;6:403-413.
71. Arakawa T, Chong DKX, Langridge WHR. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nature Biotechnology* 1998;16:292-297.
72. Jani D, Singh NK, Bhattacharya S, Meena LS, Singh Y, Upadhyay SN, Sharma AK, Tyagi AK. Studies on the immunogenic potential of plant-expressed cholera toxin B subunit. *Plant Cell Reports* 2004;22:471-477.
73. Brodzik R, Gaganidze D, Hennig J, Muszynska G, Koprowski H, Sirko A. Transgenic plants as a potential source of an oral vaccine against *Helicobacter pylori*. *Food Biotechnology* 2000;17:35-42.
74. Gu Q, Han N, Liu J, Zhu M. Cloning of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene and its expression in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Cell Reports* 2005;24:532-539.
75. Gu Q, Han N, Liu J, Zhu M. Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in transgenic rice. *Biotechnol Lett* 2006;28:1661-1666.
76. Zhang H, Zhang X, Liu M, Zhang J, Li Y, Zheng CC. Expression and characterization of *Helicobacter pylori* heat-shock protein A (HspA) protein in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *Biotechnol Appl Biochem* 2006;43(Pt 1):33-38.
77. Aziz MA, Singh S, Kumar PA, Bhatnagar R. Expression of protective antigen in transgenic plants: a step towards edible vaccine against anthrax. *Biochem Biophys Res Comm* 2002;299:345-351.
78. Aziz MA, Sikriwal D, Singh S, Jarugula S, Kumar PA, Bhatnagar R. Transformation of an edible crop with *pagA* gene of *Bacillus anthracis*. *FASEB* 2005;19:1501-1503.
79. Koya V, Moayeri M, Leppla SH, Daniell H. Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. *Infect Imm* 2005;73:8266-8274.
80. Alvarez ML, Pinyerd HL, Crisantes JD, Rigano MM, Pinkhasov J, Walmsley AM, Mason HS, Cardineau GA. Plant-made subunit vaccine against pneumonic and bubonic plague is orally immunogenic in mice. *Vaccine* 2006;24:2477-2490.
81. Santi L, Giritch A, Roy CJ, Marillonet S, Klimyuk V, Gleba Y, Webb R, Arntzen CJ, Mason HS. Protection conferred by recombinant *Yersinia pestis* antigens produced by a rapid and highly scalable plant expression system. *Proc Nat Acad Sc* 2006;103:861-866.
82. Tregoning JS, Nixon P, Kuroda H, Svab Z, Clare S, Bowe F, Fairweather N, Ytterberg J, van Wijk KJ, Dougan G, Maliga P. Expression of tetanus toxin fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acid Research* 2003;31:1174-1179.
83. Rigano MM, Dreitz S, Kipnis AP, Izzo AA, Walmsley AM. Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine. *Vaccine* 2006;24:691-695.
84. Glenz K, Bouchon B, Stehle T, Wallich R, Simon MM, Warzecha H. Production of a recombinant bacterial lipoprotein in higher plant chloroplasts. *Nature Biotechnol* 2006;24:76-77.
85. Turpen TH, Reinl SJ, Charoenvit Y, Hoffman SL, Fallarme V, Grill LK. Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus. *Biotechnology* 1995;13:53-57.
86. Yasawardene SG, Lomonossoff GP, Ramasamy R. Expression and immunogenicity of malaria merozoite peptides displayed on the small coat protein of chimaeric cowpea mosaic virus. *Indian J Med Res* 2003;118:115-124.
87. Yu J, Langridge HR. A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nature Biotechnology* 2001;19:548-552.
88. Schelkunov SN, Saliaev RK, Ryzhova TS, Pozdniakov SG, Nesterov AE, Rekol'slavskaja NI, Sumtsova VM, Pakova NV, Mishutina UO, Kopytina TV, Hammond RV. Designing a candidate edible vaccine against hepatitis B and HIV on the basis of a transgenic tomato. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk* 2004;11:50-55.

89. Chargelegue D, Drake P, Obregon P, Prada A, Fairweather N, Ma J. Highly immunogenic and protective recombinant vaccine candidate expressed in transgenic plants. *Infect Immun* 2005;73:5915-5922.
90. Streatfield SJ. Plant-based vaccines for animal health. *Revue Scientifique et Technique* 2005;24:189-199.
91. Tsuda S, Yoshioka K, Tanaka T, Iwata A, Yoshikawa A, Watanabe Y, Okada Y. Application of the human hepatitis B virus core antigen from transgenic tobacco plants for serological diagnosis. *Vox Sanguinis* 1998;74:148-155.
92. Matsumara T, Itchoda N, Tsunemitsu H. Production of immunogenic VP6 protein of bovine group A rotavirus in transgenic potato plants. *Arch Virol* 2002;147:1263-1270.
93. Zhang G, Leung C, Murdin L, Rovinski B, White KA. In planta expression of HIV-1 p24 protein using an RNA plant virus-based expression vector. *Mol Biotechnol* 2000;14:99-107.
94. Zhang GG, Rodrigues L, Rovinski B, White KA. Production of HIV-1 p24 protein in transgenic tobacco plants. *Molecular Biotechnology* 2002;20:131-136.
95. Ma SW, Zhao DL, Yin ZQ, Mukherjee R, Singh B, Qin HY, Stiller CR, Jevnikar AM. Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral tolerance. *Nat Med* 1997;3:793-796.
96. Arakawa T, Yu J, Chong DKX, Hough J, Engen PC, Langridge WHR. A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. *Nature Biotechnology* 1998;16:934-938.
97. Smart V, Foster PS, Rothenberg ME, Higgins T, Hogan SP. A plant-based allergy vaccine suppresses experimental asthma via an IFN- $\gamma$  and CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> T-cell dependent mechanism. *J Immunol* 2003;171:2116-2126.
98. Takagi H, Hiroi T, Yang L, Tada Y, Yuki Y, Takamaru K, Ishimitsu R, Kawauchi H, Kiyono H, Takaiwa F. A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses. *Proc Nat Acad Sc* 2005;102:17525-17530.
99. Youm JW, Kim H, Han JH, Jang CH, Ha HJ, Mook-Jung I, Jeon JH, Choi CY, Kim YH, Kim HS, Joung H. Transgenic potato expressing A $\beta$  reduce A $\beta$  burden in Alzheimer's disease mouse model. *FEBS Letters* 2005;579:6737-6744.
100. McCormick AA, Kumagai MH, Hanley K, Turpen TH, Hakim I, Grill LK, Tuse D, Levy S, Levy R. Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single chain Fv epitopes in tobacco plants. *Proc Nat Acad Sci, USA* 1999;96:703-708.
101. Verch T, Hooper DC, Kiyatkin A, Steplewski Z, Koprowski H. Immunization with a plant-produced colorectal cancer antigen. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2004;53:92-99.