

Sinteza aktivnih komponent za zdravila z gensko spremenjenimi rastlinami

Synthesis of active ingredients for medicines by genetically modified plants

Zlata Luthar

Oddelek za agronomijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana
E-mail: zlata.luthar@bf.uni-lj.si

Povzetek: V zadnjih letih so izsledki na področju kliničnih testiranj rekombinantnih zdravil pridobljenih z gensko spremenjenimi (GS) rastlinami doživeli velik razcvet. V ta namen so bili uspešno opravljene številni poskusi povečanja izražanja antigenov za zdravljenje nalezljivih virusnih in bakterijskih bolezni. Najnovejše raziskave so osredotočene v optimizacijo sinteze in pridobivanja antigenov za zdravljenje avtoimunih in genetskih bolezni. Razmišlja pa se tudi v smer sinteze antigenov za zdravljenje tropskih bolezni. Vedno več je izsledkov o uporabi zdravil z zaužitjem svežega rastlinskega materiala (predvsem v veterini). Komponentna cepiva pridobljena z GS rastlinami so sposobna vzbuditi močnejši imunski odziv in izzvati imunski spomin za daljše časovno obdobje. Njihovo pridobivanje je povezano z manjšimi proizvodnimi stroški. Kljub vsem raziskavam in dosežkom pa nobeno od zdravil pridobljeno z GS rastlinami ni prisotno na trgu. Za doseg tega bo potrebno odpraviti težave povezane s proizvodnjo, uporabo, predvsem pa z biološko varnostjo in splošnim mnenjem javnosti do GS rastlin.

Ključne besede: gensko spremenjene rastline; sinteza; rekombinantni proteini; antigeni; zdravljenje; imunski odziv; imunski spomin.

Abstract: In recent years, the findings in clinical trials of recombinant medicines derived from genetically modified (GM) plants boomed. For these purposes, some numerous attempts to increase expression of antigens for the treatment of infectious viral and bacterial diseases have been successfully carried out. In recent times, research has focused on optimizing the synthesis and extraction of antigens for the treatment of autoimmune and genetic diseases. It is also considered in the direction of the synthesis of the antigens for the treatment of tropical diseases. The development is focused on the use of medicines with the consumption of fresh plant material (especially in veterinary medicine). Component vaccines derived from GM plants can arouse a stronger immune response and immunological memory for a longer period. Their acquisition is related to lower production costs. Despite all the research and achievements, none of the medicines obtained by GM plants is present on the market. To achieve that it will be necessary to eliminate the problems associated with the production, use and particularly problems related to biosafety and the general public's perception of GM plants.

Keywords: genetically modified plants; synthesis, recombinant proteins; antigens; healing; immune response; immunological memory.

1. Uvod

Gensko spremenjene (GS) rastline so, poleg ostalih gospodarsko zanimivih lastnosti, sposobne sinteze farmacevtsko in medicinsko pomembnih molekul, kot so hormoni, encimi, monoklonska protitelesa in antigeni za proizvodnjo zdravil (Ma in Wang, 2012). Prvi v rastlinah (tobaku) izražen antigen za namene pridobivanja zdravil je bil površinski protein A (SpaA) bakterije *Streptococcus mutans* (Curtis in Cardineray, 1990). Sledili pa so mu površinski antigen hepatitisa B (HBsAg), temperaturno nestabilna B podenota enterotoksina bakterije *Escherichia coli*, antigen stekline, B podenota kolere toksina in številni drugi (Awale in sod., 2012). Te raziskave so osredotočene v sintezo antigenov s pomočjo GS rastlin za preprečevanje in zdravljenje večine nalezljivih virusnih in bakterijskih bolezni, tako živalskih kot človeških, ki občasno preidejo v epidemije. Vedno več pa je tudi poskusov izražanja antigenov avtoimunih, genetskih, presnovnih in degenerativnih bolezni. Razvoj je usmerjen na uporabo rastlin kot alternativnih sistemov sinteze antigenov za pridobivanje komponentnih zdravil, uporabnih za intravenozno, intramuskularno in podkožno injiciranje, uživanje v obliki tablet in svežega rastlinskega materiala predvsem v veterini (Sala in sod., 2003).

Komponentna cepiva so sestavljena iz očiščenih delov mikroorganizmov, običajno so to površinski mikrobnih antigeni, kompleksne molekule najpogosteje glikoproteini ali polisaharidi. Po vdoru v organizem jih specifično prepoznajo protitelesa ali receptorji na limfocitih. Protitelesa so topne glikoproteinske molekule iz skupine imunoglobulinov, ki so se sposobne vezati na tujke - antigene, ki so na površini bakterij in jim s tem preprečiti, da bi škodovali organizmu, povzročili bolezensko stanje. Antigeni, ki jih prepoznajo protitelesa lahko v organizmu povzročijo imunski odziv. Tudi organizmu lastne molekule lahko imunski sistem prepozna kot antigene, kar povzroči avtoimune reakcije, ki lahko privedejo do avtoimunih bolezni. Majhne molekule kot so enostavni ogljikovi hidrati, aminokisliline in maščobne kisline, ne morejo izzvati imunske reakcije. Tudi tuje človeške celice vnešene v drugega človeka, lahko v slednjem povzročijo imunski odziv. Zgradba beljakovin na celični površini se med posamezniki razlikuje, kar lahko privede do komplikacij pri transfuziji krvi in presaditvi organov. Tkivna nekompatibilnost pri presaditvi lahko povzroči zavrnitev presadka (Ihan, 2011).

Komercialno pridobivanje komponentnih zdravil poteka z GS bakterijami (*Escherichia coli*), kvasovkami (*Saccharomyces cerevisiae*) in živalskimi celičnimi

kulturami (celicami jajčnikov kitajskega hrčka). Kot alternativni sistem za pridobivanje komponentnih zdravil se vedno bolj uveljavljajo rastline, v katere je bil s pomočjo postopkov genskega inženiringa vnešen genski zapis za sintezo proteina (antigena). Začetni razvoj pridobivanja komponentnih zdravil z GS rastlinami se je osredotočal na uporabo liofiliziranega GS rastlinskega tkiva za pripravo zdravil, katerih aplikacija je potekala preko vnosa s cepljenjem. Od leta 1990 pa je razvoj usmerjen na tako imenovana oralna zdravila z zaužitjem tkiva GS rastline, ki vsebuje antigen patogena, proti kateremu želimo vzbuditi imunski odziv (Ma in Wang, 2012; Jain in sod., 2013). Trenutno je ta vrsta zdravil primerna za uporabo v veterini (Sala in sod., 2003).

2. Lastnosti komponentnih zdravil, pridobljenih z GS rastlinami

Komponentna zdravila pridobljena z GS rastlinami imajo v primerjavi s tradicionalnimi nekaj prednosti. Najpomembnejše prednosti so odsotnost za ljudi in živali nevarnih patogenih mikrobov ali virusov in s tem povezanih okužb (Ma in Wang, 2012; Zhou in sod., 2014), odsotnost toksinov, potencialnih alergenov in zmanjšana možnost vsebnosti oslavljenih mikrobnih sevov z možnostjo ponovne pridobitve patogenosti (Gunn in sod., 2012; Pelosi in sod., 2013; Kumar in sod., 2013). V primerih, kjer se antigen izraža v obstojnih tkivih (semena, gomolji), ni potrebno takojšnje shranjevanje na hladnem, kar omogoča lažji transport ter večjo dostopnost državam v razvoju, predvsem v veterini (Sala in sod., 2003). Dodatno pa k večji uporabnosti pripomoreta tudi dolgotrajna stabilnost (Pirkoohi in Zibae, 2013) in možnost izražanja velikega števila različnih epitopov, mest na protitelesu, ki prepoznajo antigen in se nanj specifično vežejo (Guan in sod., 2013). Zaužitje bioenkapsuliranega zdravila, ki vsebuje antigen v rastlinskih celicah s celično steno, vzbudi učinkovitejši imunski odziv kot odziv proti izoliranemu antigenu, apliciranemu preko podkožnega ali intramuskularnega injiciranja (Gunn in sod., 2012). Največjo vlogo pri tem ima vzbuditev imunskega odziva, ki nato stimulira celično imunost (Gunn in sod., 2012). Zaužitje z GS rastlinami pridobljenih zdravil, kot so na primer površinski antigen hepatitisa B (HBsAg), temperaturno nestabilna B podenota enterotoksina *E. coli*, plaščni protein Norwalk virusa in glikoprotein virusa stekline, je privedlo do nastanka protiteles (IgA, IgG) specifičnih za apliciran antigen in ponekod do imunskega spomina, tako v miših kot ljudeh (Sala in sod., 2003). Tradicionalna komponentna zdravila so sposobna

vzbuditi le sistemski imunski odziv (Vimolmangkang in sod., 2012). Bioenkapsulacija s celično steno poleg tega omogoča tudi zakasnjeno sproščanje antigena v prebavilih in prehod v krvni obtok (Guan in sod., 2013). Aplikacija z zaužitjem je veliko manj invazivna za pacienta (Jain in sod., 2013), poleg tega pa zanjo nista potrebna ekstrakcija in čiščenje proteina (antigena), kar pomembno vpliva na pocenitev stroškov proizvodnje ter ceno končnega proizvoda (Ma in Wang, 2012). Čiščenje proteina iz rastlinskega tkiva, je veliko enostavnejše kot pri ostalih proizvodnih sistemih, prav tako je lažja ekstrakcija proteina iz tkiva (posebno iz semen), končna čistost pridobljenega proteina pa je večja. Rastline kot evkariontski organizmi sintetizirajo proteine na način zelo podoben sesalskemu, z določenimi razlikami (npr. glikozilacijski vzorec) in so zmožne sintetizirati tudi kompleksne proteine (Alvarez in sod., 2014), ki vsebujejo pravilne post-translacijske modifikacije, kot je na primer vsebnost disulfidnih mostičkov ali glikozilacijskih značk. Ker so post-translacijske modifikacije ključne za biološko aktivnost proteinov, je biološka aktivnost z GS rastlinami pridobljenih proteinov dobro ohranjena (Ma in Wang, 2012).

Pomembna prednost je tudi stabilnost rastlinskih sistemov, možnost gojenja na prostem in pridobivanje velike količine biomase z relativno nizkimi vložki (Tiwari in sod., 2009; Gunn in sod., 2012; Guan in sod., 2013; Pirkoohi in Zimbaee, 2013). V primerjavi z bakterijskimi in živalskimi kulturami *in vitro* gojenje rastlin zahteva bistveno manj specifična gojišča, rastne razmere in opremo (Zhou in sod., 2014). Ko je transgen stabilno vključen v rastlinski genom, je željeni protein mogoče pridobivati v velikih količinah. Prav tako je enostavna širitev pridelovanja (Gunn in sod., 2012), ki se lahko opravi s povečanjem števila rastlin oziroma površine ali v primeru celičnih ali kalusnih kultur s povečanjem količine gojišč.

S križanjem dveh rastlinskih linij, ki sintetizirata različne sestavine za zdravilo, je možno pridobiti multi-komponentna cepiva. Ta omogočajo hkratno prepoznavanje več kot le enega antigena naenkrat na površini mikrofoid celic imunskega sistema, ki jih najdemo v limfnem tkivu (Gunn in sod., 2012). Možno pa je tudi pridobivanje multi-valentnih cepiv, ki ščitijo pred večimi različnimi patogeni ali pred več različnimi sevi istega patogena. Primer takega zdravila je virus humane imunske pomanjkljivosti (HIV), virus hepatitisa B in virusom podobni delci, pridobljeni v tobaku in repnjakovcu (Greco in sod., 2007).

3. Težave zdravil, pridobljenih z GS rastlinami

V ospredju so težave povezane z biološko varnostjo

GS rastlin, ki so sposobne sinteze aktivnih snovi (antigenov) za pridobivanje zdravil. Nadalje so zelo izpostavljene težave povezane s pridobivanjem aktivnih snovi, predvsem z njihovo količino, saj je trenutno večina raziskav namenjena optimizaciji sinteze in nalaganja učinkovin v celičnih organelih različnih tkiv. Veliko študij je posvečenih delovanju pridobljenih antigenov v ciljnih organizmih, predvsem zbuditve imunskega spomina za daljše časovno obdobje.

3.1. Biološka varnost

Biološka varnost GS rastlin tudi tistih, ki se uporabljajo za sintezo aktivnih snovi za zdravila, je povezana z načelom previdnosti. Pri tem je izpostavljen strah pred vplivom GS rastlin na okolje in posledicami. V ospredju je možno prehajanje transgena s pelodom GS rastlin iz nadzorovanega v širše okolje in strah pred vključitvijo transgena oziroma njegovih produktov v prehransko verigo. Prehajanje transgena v okolje s pelodom bi lahko povzročilo križanje s sorodnimi prosto živečimi in gojenimi vrstami ter nastanek križancev, kar bi vplivalo na okoljsko ravnovesje in biodiverzitetu. GS rastline v namene pridobivanja aktivnih učinkovin za zdravila se zaenkrat goji le v strogo nadzorovanih, zaprtih okoljih (fitotroni, rastlinjaki), večina pa jih je tudi sterilna (citoplazmatska moška sterilnost). Uživanje GS rastlinskega tkiva bi lahko privedlo do toksikoloških ali alergičnih reakcij. V izogib temu je potrebno pred kliničnimi testiranjmi zdravil opraviti vse potrebne raziskave povezane z analizo glikoproteinskega profila ter analizo alergenosti in toksičnosti (Zhou in sod., 2013).

3.2. Pridobivanje

Glavna problema povezana s pridobivanjem aktivnih sestavin za zdravila sta še vedno premajhna stopnja izražanja rekombinantnega proteina v celicah in nepravilna oziroma nezadostna glikozilacija. Za povečanje sinteze proteina so v uporabi močni konstitutivni promotorji kot je promotor virusa cvetačnega mozaika (CaMV 35S), optimizacija 5' in 3' neprevedenih regij (UTR), uporaba endogenih promotorjev za gostiteljsko rastlinsko vrsto ali tkivo (npr. koruzni UBQ1 promotor, rižev GluB-4), uporaba kodonov prilagojenih gostiteljski rastlinski vrsti, izražanje proteina v obliki fuzijskega proteina z dodanim adjuvantom, ki poveča izražanje (npr. CTB - B podenota kolere toksina, LTB- temperaturno občutljiva B podenota enterotoksina *E. coli*) in uporaba nukleotidnih zaporedij za usmerjanje proteina v določen celični organel, za katerega je znano, da se v njem željeni protein najbolje izraža oziroma v organel z nizko

proteazno aktivnostjo, kot so npr. endoplazmatski retikulum (ER) ali kloroplasti. Poleg tega imajo določeni ciljni proizvodni sistemi (semena, celične suspenzije in kulture koreninskih laskov) večje sposobnosti povečanja sinteze eksogenih proteinov kot drugi, zato je pričakovati, da se bo razvoj v nadaljnjih letih v večji meri preusmeril z do sedaj tradicionalnih proizvodnih sistemov na sisteme pridobivanja zdravil z GS rastlinami. Obstajajo pa tudi možnosti povečanja izražanja proteina preko optimizacije okolja, v katerem poteka sinteza, npr. z dodajanjem proteaznih inhibitorjev ali stabilizatorjev v gojišča ter optimizacija procesa ekstrakcije in čiščenja pridobljenega proteina (Alvarez in sod., 2014; Zhou in sod., 2014).

Rastline so zmožne opravljati glikozilacijo na podoben način kot sesalske celice, z določenimi odstopanji, ki pa lahko resno vplivajo na končno aktivnost proteina. Prvi korak N-glikozilacije je enak pri rastlinah in sesalcih. V ER se oligosaharidni prekursor nastajajočega proteina prenese na specifičen asparaginski ostanek. Sledi procesiranje v ER in Golgijevem aparatu (GA), pri čemer se procesa v rastlinah in živalih razlikujeta v tem, kdaj se protein prenese z ER na GA. V rastlinah se β -1,2-ksiloza veže na manozni ostanek in α -(1,3)-fukoza na N-acetilglukozamin, vendar pa pri njih ne obstajata β -(1,4)-galaktozni ostanek in sialična kislina. Ta problem se poskuša rešiti preko izbijanja encimov v rastlinah, odgovornih za dodajanje specifičnih ostankov, izražanja humane glikoziltransferaze in sialične kisline (Alvarez in sod., 2014) ter *in vitro* modifikacij N-glikozilacijskega vzorca preko dodajanja β -(1,4)-glikoziltransferaze iz kravjega mleka (Bardor in sod., 2003).

3.3. Uporaba

Največji problem uporabe rekombinantnih zdravil, pridobljenih z GS rastlinami, je nezadostna imunogenost pridobljenih antigenov in problem degradacije antigena v prebavnem traktu pred prihodom na tarčno mesto, kar vpliva na stopnjo imunološke zaščite. Znano je, da prenizka molekulska masa zdravila zniža imunogenost antigena, prav tako pa lahko k manjši imunogenosti prispevajo določeni dejavniki v sami rastlini. Preprečevanje prehitre degradacije antigena v prebavnem traktu je v veliki meri povezano z bioenkapsulacijo znotraj rastlinskih celic, dodatno pa z izražanjem antigenov v obliki virusom podobnih delcev (VLP). Aplikacija antigena z uživanjem vzbudi močnejši imunski odziv, tako systemskega kot humoralnega v primerjavi z aplikacijo preko injiciranja. Dodatno pa k večji imunogenosti pripomore vezava

antigena z adjuvanti, kot sta B podenota temperaturno odvisnega enterotoksina *E. coli* in B podenota kolere toksina. Še eden od ključnih problemov je standardizacija odmerka pri zdravilih, ki bi jih vnesli v organizem preko zaužitja, saj se ne da z gotovostjo napovedati, koliko od antigena, vsebovanega v svežem tkivu, bo dejansko vstopilo v krvni obtok. Vse to trenutno omejuje oz. otežkoča pridobivanje zdravil z GS rastlinami na komercialni ravni (Zhou in sod., 2010; 2014).

4. Izboljšave sinteze antigenov z GS rastlinami

V celicah GS rastlin so bili sintetizirani številni antigeni za zdravljenje virusnih, bakterijskih, avtoimunih in genetskih bolezni. Prvemu antigenu, površinskemu proteinu A (SpaA) iz bakterije *S. mutans* (Curtis in Cardineray, 1990), ki je bil mejnik na tem področju, so sledili antigeni številnih virusnih nalezljivih bolezni, predvsem živalskih z namenom preprečevanja in omejevanja epidemij, v manjšem obsegu pa tudi človeških. Od živalskih nalezljivih bolezni so bili tako v GS rastlinah uspešno izraženi antigeni virusa prašičjega respiratornega in reproduktivnega sindroma, slinavke in parkljevke, goveje virusne diareje, stekline, atipične kokoške kuge, Norwalk virusa, virusa ptičje gripe in mnogi drugi. Delovanje zdravil, pridobljenih iz teh antigenov, je bilo v večini primerov preverjeno na mišjih modelih ter naravnih gostiteljih. Uspešno izraženi so bili tudi antigeni številnih človeških nalezljivih bolezni, poudarek raziskav na tem področju je bil v zadnjih letih usmerjen predvsem v iskanje načinov za povečanje izražanja transgenov v rastlinah. Uporaba optimiziranih transformacijskih metod in ekspresijskih vektorjev v kombinaciji s primerno izbrano rastlinsko vrsto je v večini spodaj navedenih primerov vodila do opaznega izboljšanja sinteze antigenov za zdravljenje bolezni tudi z izzvanim imunskim spominom za daljše časovno obdobje. Za nekatere bolezni so navedeni mejniki pridobivanja rekombinantnih zdravil z GS rastlinami.

4.1. Virusne bolezni

Raziskave na področju pridobivanja rekombinantnih beljakovin – antigenov z GS rastlinami za zdravljenje virusnih nalezljivih bolezni segajo v obdobje pred letom 1990.

4.1.1. Virus hepatitis B (HBV)

Leta 1992 je bil površinski antigen hepatitis B prvič uspešno izražen v GS listih tobaka v koncentraciji 66 ng/mg skupno topnih proteinov (Mason in sod. 1992).

Nato je sledilo 14 dostopnih objav, ki navajajo večje koncentracije sintetiziranega antigena v različnih rastlinskih vrstah in tudi tkivih. Leta 2014 so Hayden in sod. uspeli povečati izražanje antigena hepatitisa B v kalčkih koruze na 1023 $\mu\text{g/g}$ suhih kalčkov, kar je največja koncentracija antigena hepatitisa B v GS rastlinah v dosegljivi literaturi. Leta 2015 so Hayden in sod. objavili raziskavo v kateri so eni skupini miši dali zaužiti oblate pridobljene iz semen GS koruze in druga skupina miši je bila intramuskularno imunizirana s komercialnim cepivom 'Recombivax'. V miših se je sprožili nastanek serumskih IgG, IgA in fekalnih IgA. Iz koncentracije celokupnih serumskih IgG, eno leto po zaužitju oblatov, je bila pri prvi skupini miši razvidna pridobitev imunskega spomina. Uporaba samo cepiva 'Recombivax' pa ni vzbudila imunskega spomina. V letu 2015 so Rukavtsova in sod. na miših testirali imunogenost antigena hepatitisa B pridobljenega v gomoljih GS krompirja. Miši so hranili z GS gomolji in prav tako vzbudili imunskega spomina s prisotnimi protitelesi še 320 dni po začetku poskusa.

4.1.2. Rotavirus

Kapsidni protein govejega rotavirusa imenovan VP6 je bil leta 2000 prvič izražen v celicah paradižnika (Chung in sod., 2000). Sledili sta sintezi proteina glodalskega rotavirusa VP6 v GS listih krompirja (Yu in Langridge, 2003) in VP7 v listih in gomoljih krompirja (Wu in sod., 2003) ter testiranje na miših z zaužitjem svežega GS tkiva. V naslednjih 9 objavah z različnimi dognanji je bilo ugotovljeno, da je izražanje kapsidnega proteina VP7 nezadostno in VP4 ni uspelo. V izogib temu so Pera in sod. (2015) v prvi fazi izdelali in testirali vpliv fuzijskega supresorskega proteina virusa paradižnikove uvelosti (NSs), katerega izražanje so usmerili v različne celične organele. V primeru, ko sta bila VP2 in VP6 združena z NSs, sta se uspešno izražala v citoplazmi, kloroplastih, apoplastu in ER. Vendar je bila povprečna stopnja izražanja VP2 povsod nižja kot stopnja izražanja VP6. V drugi fazi so izdelali fuzijske proteine VP6/8*N, VP6/8*C, VP2/6, VP2/8*/6, VP2/6/8*N in VP2/6/8*C. VP6/8* se je začel izražati že 3. dan po transformaciji, VP6/8*N pa šele 7. dan po njej, VP2 pa se je izražal v največji količini, ko je bil vezan z VP6. Fuzijski proteini so imeli večjo stopnjo izražanja in se niso združevali z virusom podobnimi delci, ampak so obdržali svojo imunogenost.

4.1.3. Virus humane imunske pomanjkljivosti (HIV)

Leta 2002 so Zhang in sod. poročali o uspešni sintezi kapsidnega proteina HIV-I p24 v koncentraciji 3,5

mg/g topnih proteinov v GS listih tobaka. Sledilo je 11 objav z izboljšavami in testiranjem na zajcih in miših. Leta 2014 so Lindh in sod. objavili rezultate sinteze HIV-I p24 v GS korenju (90 ng HIV-I p24 proteina na gram sveže teže) in repnjakovcu z visokim (366 ng/g) in nizkim izražanjem (34 ali 17 ng/g). Nadalje so opravili skupino poskusov, v katerih so miši hranili z vzorci svežega ali zamrznjenega tkiva in opazovali imunskega odziv, ki se je pojavil v miših dva dni po zaužitju proteina HIV-I p24. V 6/7 poskusov je bilo uporabljeno sveže tkivo in v enem zamrznjeno, miši v 4/7 poskusov so se hranile samovoljno, v 3/7 pa preko cevke. V primeru korenja so bile 2 tedna po zaužitju v miših opažene visoke koncentracije p24-specifičnih serumskih IgG. Podobno je bilo v primeru svežega tkiva repnjakovca, medtem ko uporaba zamrznjenega tkiva ni dala vidnih rezultatov. Imunski odziv je bil v miših z zaužito manjšo koncentracijo p24 (20 ng) višji kot v miših z višjo koncentracijo p24 (460 ng). To je prva študija odvisnosti imunskega odziva od količine apliciranega antigena HIV-I p24.

4.1.4. Ebola

Leta 2011 so Bhoo in sod. s pomočjo sistema geminiviralnega replikona pripravili imunskega kompleksa ebola (EIC) v GS tobaku (*N. benthamiana*). Glikoprotein GP1, spojen s C' koncem težke verige humaniziranega monoklonskega protitelesa IgG 6D8, se je s pomočjo virusnega vektorja zvil v funkcionalen imunoglobulin. V miših, ki so prejele podkožno injekcijo očiščenega proteina, so se pojavila protitelesa proti virusu ebola, njihova količina je bila primerljiva s količino, vzbujeno preko glikoproteina virusom podobnih delcev GP1 VLP. V letu 2014 je kalifornijskemu podjetju Mapp Biopharmaceuticals uspela sinteza kombinacije treh protiteles proti eboli v GS tobaku (ISIS ..., 2014). Eden od obeh ameriških zdravnikov, ki sta prejela ZMapp, sicer predhodno testiran le na opicah, je preživel okužbo v nedavni epidemiji, vendar ni znano, ali po zaslugi ZMapp-a ali transfuzije, ki jo je prejel pred cepivom. Do sedaj še ni uradnih poročil o pridobivanju ali delovanju ZMapp-a. Znano je le, da so geni za humanizirana anti-ebola protitelesa vključeni v tkivo tobaka s pomočjo rastlinskih virusnih vektorjev z metodo treh biološko-proizvodnih sistemov. Končni izkupiček monoklonskega protitelesa mAb pa je bil do 1 % celotnih citoplazmatskih listnih proteinov.

4.2. Bakterijske bolezni

Prav tako kot pri virusnih boleznih so se proučevanja na področju pridobivanja aktivnih sestavin

z GS rastlinami za zdravljenje bakterijskih bolezni začela malo pred letom 1990 in postopki optimizacije proizvodnih sistemov so še vedno v teku, kar dokazujejo objavljene raziskave.

4.2.1. Temperaturno nestabilna B podenota enterotoksina *Escherichia coli* (LT-B)

Haq in sod. so leta 1995 v GS tobaku in krompirju uspeli sintetizirati antigen za zdravljenje bakterijske diareje LT-B. Poskus so izvedli na miših in zbudili imunski odziv s prisotnostjo Ig, Sledilo je 11 raziskav v katerih so optimizirali sintezo antigena in njegov učinek testirali na miših in v enem primeru na 13 prostovoljnih posameznikih. Loc sod. so leta 2014 objavili raziskavo v kateri so v GS paradižniku sintetizirali LT-B v obliki pentamers. V dveh od petih GS paradižnikih so bile pentamerne oblike LT-B vezana z GM1 gangliozidi, kar potrjuje njihovo biološko aktivnost in primernost za novo zdravilo omenjene B podenote. V tem primeru raziskave kliničnega testiranja imunogenosti še niso bile opravljene.

4.2.2. B podenota kolere toksina (CTB)

Daniell in sod. so leta 2001 v genom tobaka vnesli transgen in v kloroplastih se je izrazil CT-B antigen. Sledilo je 10 objav in samo v dveh so z intramuskularnim injiciranjem miši in zajcev ter z zaužitjem pri miših testirali imunogenost. Pri 8 objavljenih raziskavah so samo optimizirali metodo transformacije na izbranih rastlinskih vrstah v namene izboljšati količino naloženega antigene. Leta 2012 so Karaman in sod. v semenih GS koroze uspeli sintetizirati CT-B antigen in oceniti njegovo imunogenost v miših, ki so zaužile GS semena. Potrdili so sistemski imunski odziv s prisotnostjo fekalnih IgA in serumskih IgG obeh, tako B podenote kolere toksina (CT-B) in temperaturno nestabilne B podenote enterotoksina *Escherichia coli* (LT-B). Pri čemer je bil učinek antigena CT-B na pojav serumskih IgG večji kot učinek LT-B. Soh in sod. so leta 2015 predlagali, da bi bila skupna uporaba CT-B in LT-B, zaradi podobnosti enterotoksinske strukture in mehanizma delovanja, učinkoviti način zaščite pred kolero in diarejo. V GS riževih semenih so uspeli z izražanjem obeh antigenov LT-B in CT-B. Dobljeni CT-B in LT-B so bili prisotni v pentamerni obliki in sposobni vzbuditi sistemskega imunskega odziva ustne sluznice imuniziranih miši. S sočasno uporabo obeh antigenov CT-B in LT-B se je povečal in okreplil sistemski imunski odziv ustne sluznice.

4.2.3. Antraks

Antraks je v zadnjem obdobju pridobil na pomenu zaradi uporabe v t.i. bio-vojskovanju. Poleg tega pa se pojavlja v pogostih naravnih izbruhih po vsem svetu, predvsem v Afriki, Srednji Aziji in Južni Ameriki. Prva raziskava, ki so jo objavili Aziz in sod. leta 2002, poroča o uspešni vgraditvi transgena v tobak in sintezi biološko aktivnega zaščitnega antigena (PA). Nato je bi fuzijski protein z adjuvantom CT-B-antraks v oligomerni obliki izražen v GS krompirju (Kim in sod., 2004.). Gorantala in sod. so leta 2014 uspeli s sintezo antigena PA v indijski gorčici in plastidih tobaka, v katerih je bila večja izražena količina. Tako z zaužitjem kot z intramuskularnim injiciranjem so povzročili zaščitni imunski odziv z visokimi vrednostmi serumskih PA in specifičnih IgG in IgA pri miših. Sočasna uporaba CT-B kot adjuvanta je povečala specifični sluznični imunski odziv pri miših, tudi če so bili zaužiti odmerki antigena PA zelo majhni samo 5 ali 10 µg.

4.3. Avtoimune in genetske bolezni

Pridobivanje rekombinantnih proteinov (antigenov) z GS rastlinami na področju zdravljenja avtoimunih in genetskih bolezni, ki vodijo do presnovnih in degenerativnih motenj oziroma poškodb, se je pričelo po letu 2010.

4.3.1. Alzheimerjeva bolezen

Kohli in sod. (2014) so uspeli sintetizirati fuzijski protein B podenote kolere toksina in osnovni mielinski protein (CTB-MBP) v kloroplastih transplastomskih linij korenja. V svežih listih se je naložilo do 2 % CTB-MBP od skupnih topnih proteinov. V liofiliziranih listih se je koncentracija antigena CTB-MBP povečala za 17-krat in pri sobni temperaturi se je ohranila stabilnost antigena do 7 mesecev. V hipokampusih miši, ki so prejemale CTB-MBP preko cevke, so bile vidne usedline MBP proteina, po 3 zaporednih imunizacijah, pa je prišlo tudi do znižanja števila plakov v možganih. V istem letu so Maruyama in sod. (2014) določili nukleotidno zaporedje epitopa cepiva proti Alzheimerjevi bolezni, ki so ga razvili McLaurin in sod. (2002), vsebovani znotraj glicininske podenote A1aB1b v semenih soje. Z mutirano glicinsko regijo, ki je vsebovala nukleotidno zaporedje epitopa in preusmeritvijo izražanja v ER se je koncentracija rekombinantnega proteina pri treh mutantnih linijah v povprečju povečala na 11,3 % od skupno topnih proteinov (Maruyama in sod., 2014).

4.3.2. Revmatoidni artritis

Hanson in sod. (2016) so uspeli sintetizirati in izrazili fuzijski protein v GS repnjakovcu in preverili njegovo delovanje na miših. Transgen je bil stabilno vključen v genom repnjakovca in se uspešno sintetiziral v potomcih šeste generacije. Čeprav se je izražal v vseh rastlinskih organih, se je v največji meri naložil v listih. V miših, ki so prejemale izražen protein preko krme, je prišlo do opaznega znižanja artritisa, povezanega s kolagenom v primerjavi s kontrolno skupino. Prav tako so te miši imele nižje vrednosti serumskih protiteles, manjše poškodbe sklepov in manjše vrednosti vnetnih serumskih faktorjev. Vse to potrjuje na primernost proteina, izraženega v repnjakovcu, za preprečevanje in zdravljenje artritisa povezanega s kolagenom.

4.3.3. Diabetes

Kwon in sod. (2013) so pridobili analog glukagona, eksendin 4 (EX4) v obliki fuzijskega proteina CTB-EX4 v kloroplastih tobaka. V miših, ki so prejele odmerek GS liofiliziranega listnega tkiva in intraperitonealno injekcijo EX4, je CTB-EX4 deloval na enak način kot komercialno pridobljen eksendin EX4 in sicer je znižal nivo glukoze v krvi. Choi in sod. (2014) so poleg tega sintetizirali fuzijski protein eksendin-4-humani transferin (EX4-Tf) v listih tobaka z zmanjšano vsebnostjo alkaloidov. V prvi generaciji stabilno GS rastlin se je protein akumuliral do 37 µg/g sveže listne mase. Uporaba prehodne transformacije pa je izražanje povečalo na 137 µg/g. Apliciran fuzijski EX-4-Tf v miši, preko intraperitonealne injekcije, je deloval na enak način kot komercialni eksendin.

4.3.4. Arterioskleroza

Razvoj zdravil proti arteriosklerozi se je v zadnjih letih osredotočal na poskuse vzbuditve imunskega odziva, ki bi lahko uravnaval z arteriosklerozo povezane vnetne reakcije in ostale fiziološke mehanizme, ki vodijo v pojav te bolezni. Avtorji Salazar-Gonzales in sod. so v letu 2014 objavili izsledke kliničnih testiranj zdravil na miših, kuncih in ljudeh proti arteriosklerozi, katerih antigeni so bili pridobljeni z GS tobakom. V vseh primerih je prišlo do določene mere arteroprotekcije, večinoma vidne v obliki IgG in IgA. To je prvi primer pridobivanja z arteriosklerozo povezanih epitopov v GS rastlinah, pri katerem so epitopi ohranili svojo imunogenost.

4.3.5. Gaucherjeva bolezen

Z željo vzpostaviti učinkovitejši sistem kot je trenutno za pridobivanje humane β-glukozidaze, ki se

uporablja za nadomestno zdravljenje Gaucherjeve bolezni, so Patti in sod. (2012) izrazili humano β-glukozidazo v endospermu riževih semen. V letu 2015 so Shaaltiel in sod. uporabili rekombinantno humano glukocerebrozidazo, izraženo v korenju, za poskuse na podganah in prašičih. Z namenom preveriti možnosti zaščite glukocerebrozidaze, zaužite z rastlinskim tkivom, pred kislim okoljem v želodcu. Nadalje so spremljali sproščanje iz rastlinskih celic in možnosti prehoda v krvni obtok. Ugotovili so, da je glukocerebrozidaza pri pH vrednosti 3 stabilna pol ure, pri nižjem pH pa razpade po eni do 10 minutah. Količina aktivne glukocerebrozidaze je bila v jetrih podgan, ki so jo prejele preko krme, veliko manjša kot njena količina v jetrih podgan, ki so jo prejele preko intravenoznega injiciranja.

5. Zaključek

GS rastline postajajo zelo zanesljiv alternativni sistem pridobivanja antigenov za zdravila. Večina od njih je bila testirana na živalskih modelnih vrstah, obstajajo pa tudi uspešni primeri kliničnih raziskav na človeku. Pred komercialno proizvodnjo teh zdravil je potrebno odpraviti določene pomanjkljivosti v izražanju nekaterih transgenov, ki so odgovorni za sintezo antigenov ter s postopki *in vitro* in *in vivo* gojenja. V primerih gojenja na prostem je potrebno vzpostaviti primerne mehanizme biološke varnosti za vsako rastlinsko vrsto oziroma sorto, odvisno od njenih lastnosti, predvsem od načina razmnoževanja. Trenutno nobeno od cepiv, pridobljeno z GS rastlinami, ni prisotno na trgu. Leta 2006 je podjetje Dow Agro Sciences LLC dobilo dovoljenje in licenco za zdravilo proti atipični kokošji kugi, osnovano na hemaglutininu, pridobljenem s suspenzijsko celično linijo GS tobaka (USDA ..., 2006), a podjetje nima interesa za komercializacijo cepiva. Prav tako ni na trgu β-glukuronidaza iz celičnih kultur GS korenja, ki jo je Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) odobrila leta 2012 (Morrow, 2012).

Literatura

1. Alvarez M.A. 2014. Molecular Farming in Plants. V: Plant biotechnology for health – from secondary metabolites to molecular farming. 1st edition. Springer International Publishing: 81-109.
2. Awale M.M., Mody S.K., Dudhatra G.B., Abinash K., Patel H.B., Modi C.M., Kamani D.R., Chauhan B.N. 2012. Transgenic plant vaccine: a breakthrough in immunopharmacotherapeutics. Journal of Vaccines and Vaccination, 3, 5: 1-7.

3. Aziz M.A., Singh S., Kumar A., Bhatnagar R. 2002. Expression of protective antigen in transgenic plants: a step towards edible vaccine against anthrax. *Biochem Biophys Res Commun*, 299, 345-351.
4. Bardor M., Loutelier-Bourhis C., Paccalet T., Cosette P., Fichette A.C., Vezina L.P., Trepanier S., Dargis M., Lemieux R., Lange C., Faye L., Lerouge P. 2003. Monoclonal C5-1 antibody produced in transgenic alfalfa plants exhibits a N-glycosylation that is homogenous and suitable for glyco-engineering into human-compatible structures. *Plant Biotechnology Journal*, 1: 451-462.
5. Bhoo S. H., Lai H., Ma J., Arntzen C. J., Chen Q., Mason H. S. 2011. Expression of an immunogenic ebola immune complex in *Nicotiana benthamiana*. *Plant biotechnology*, 9, 7: 807-816.
6. Choi J., Diao H., Feng Z.C., Lau A., Wang R., Jevnikar A.M., Ma S. 2014. A fusion protein derived from plants holds promising potential as a new oral therapy for type 2 diabetes. *Plant Biotechnology Journal*, 12: 425-435.
7. Chung I.S., Kim C.H., Kim I.K., Hong S.H., Park J.H., Kim J.K. Kim W.Y. 2000. Production of recombinant rotavirus VP6 from a suspension culture of transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cells. *Biotechnol lett*, 22, 251-255.
8. Curtis R.I., Cardineray C.A. 1990. World patent App WO 90/02484.
9. Daniell H., Lee S.B., Panchal T., Wiebe P.O. 2001. Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *Journal of Molecular Biology*, 311, 5: 1001-1009.
10. Gorantala J., Groverb S., Rahia A., Chaudharyc P., Rajwanshic R., Sarinc N. B., Bhatnagara R. 2014. Generation of protective immune response against anthrax by oralimmunization with protective antigen plant-based vaccine. *J Biotech*, 176: 1-10.
11. Greco R., Michel M., Guetard D., Cervantes-Gonzalez M., Pelucchi N., Wain-Hobson S., Sala F., Sala M. 2007. Production of recombinant HIV-1/HBV virus-like particles in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana*. *Vaccine*, 25: 8228-8240.
12. Guan Z.J., Guo B, Huo Y.L., Guan Z.P., Dai J.K., Wei Y.H. 2013. Recent advances and safety issues of transgenic plant-derived vaccines. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 2817-2840.
13. Gunn K.S., Singh N., Giambrone J., Wu H. 2012. Using transgenic plants as bioreactors to produce edible vaccines. *J Biotech Research*, 4: 92-99.
14. Hansson C., Schon K., Kalbina I., Strid A., Andersson S., Bokarewa M., Lycke N.Y. 2016. Feeding transgenic plants that express a tolerogenic fusion protein effectively protects against arthritis. *Plant Biotech J*, 14, 1106-1115.
15. Haq T.A., Mason H.S., Clements J.D., Arntzen C.J. 1995. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science*, 268, 5211, 714-716.
16. Hayden C.A., Fischer M.E., Andrews B.L., Chilton H.C., Turner D.D., Walker J.H., Tizard I.R., Howard J.A. 2015. Oral delivery of wafer made from HBsAg-expressing maize germ induces long-term immunological systemic and mucosal responses. *Vaccine*, 33: 2881-2886.
17. Hayden C.A., Smith E.M., Turner D.D., Keener T.K., Wong J.C., Walker J.H., Tizard I.R., Jimenez-Flores R., Howard J.A. 2014. Supercritical fluid extraction provides an enhancement to the immune response for orally-delivered hepatitis B surface antigen. *Vaccine*, 32, 1240-1246.
18. Ihan A. 2011. *Cepiva in imunost. V: Cegljenje in cepiva – dobre prakse varnega cegljenja*. Kraigher A., Ihan A., Avčin T. (ur.) Ljubljana, Sekcija za preventivno medicine SZD, Sekcija za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe SZD, Inštitut za varovanje zdravja: 131-173.
19. ISIS. 2014. Virus vaccine made in tobacco plants to control ebola, report 26/08/14 http://www.isis.org.uk/Virus_Vaccine_Made_In_Tobacco_Plants_to_Control_Ebola.php.
20. Jain A., Saini V., Kohli D.V. 2013. Edible transgenic plant vaccines for different diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 14, 5: 1-21.
21. Karaman S., Cunnick J., Wang K. 2012. Expression of the cholera toxin B subunit (CT-B) in maize seeds and a combined mucosal treatment against cholera and traveler's diarrhea. *Plant Cell*

- Reports, 31: 527-537.
22. Kim T.G., Langridge W.H.R. 2004. Synthesis and assembly of a cholera toxin B subunit SHIV 89.6p Tat fusion protein in transgenic potato. *Prot Expr Purif*, 35, 313-319.
 23. Kohli, N., Westerveld D.R., Ayache A.C., Verma A., Shil P., Prasad T., Zhu P., Chan S.L., Li Q., Daniell H. 2014. Oral delivery of bioencapsulated proteins across blood–brain and blood–retinal barriers. *Molecular Therapy*, 22, 3: 535-546.
 24. Kumar G.B., Ganapathi T.R., Revathi C.J., Srinivas L., Bapat V.A. 2005. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. *Planta* 222(3): 484–493.
 25. Kwon K., Nityanandam R., New J.S., Daniell H. 2013. Oral delivery of bioencapsulated exendin-4 expressed in chloroplasts lowers blood glucose levels in mice and stimulates insulin secretion in beta-TC6 cells. *Plant Biotech J*, 11, 77-86.
 26. Lindh I., Brave A., Hallengard D., Hadad R., Kalbina I., Strid A., Andersson S. 2014. Oral delivery of plant-derived HIV-1 p24 antigen in low doses shows a superior priming effect in mice compared to high doses. *Vaccine*, 32: 2288-2293.
 27. Loc N. H., Long D. T., Kim T.G., Yang M.S. 2014. Expression of Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Czech journal of genetics and plant breeding*, 50, 1: 26-31.
 28. Ma S., Wang A. 2012. *Molecular Farming in Plants: An Overview*. V: *Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects*. Ma S., Wang A. (eds.) 1st ed. Springer Netherlands, Springer Science+Business Media B.V.: 1-2.
 29. Maruyama N., Fujiwara K., Yokoyama K., Cabanos C., Hasegawa H., Takagi K., Nishizawa K., Uki Y., Kawarabayashi T., Shouji M., Ishimoto M., Terakawa T. 2014. Stable accumulation of seed storage proteins containing vaccine peptides in transgenic soybean seeds. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118, 4: 441-447.
 30. Mason H.S., Lam D.M.K., Arntzen C.J. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 11745-11749.
 31. McLaurin, J., Cecal, R., Kierstead, M. E., Tian, X., Phinney, A. L., Manea, M., French, J. E., Lambermon, M. H., Darabie, A. A., Brown, M. E. 2002. Therapeutically effective antibodies against amyloid-beta peptide target amyloid-beta residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis, *Nat. Med.*, 8: 1263-1269.
 32. Morrow T. 2012. Gaucher's disease treatment option rides on carrot cells' biologic power. *Manag Care* 21, 6: 45-46.
 33. Patti T., Bembi B., Cristin P., Mazzarol F., Secco E., Pappalardo C., Musetti R., Martinuzzi M., Versolato S., Cariati R., Dardis A., Marchetti S. 2012. Endosperm-specific expression of human acid beta-glucosidase in a waxy rice. *Rice* 5, 34: 1-15.
 34. Pelosi A., Shepherd R., Walmsley A.M. 2012. Delivery of plant - made vaccines and therapeutics. *Biotechnol. Adv.* 30, 2:440- 448.
 35. Pera F. F. P. G., Mutepfa D. L. R., Khan A. M., Els J. H., Mbewana S., Van Dijk A. A. A., Rybicki E. P., Hitzeroth I. I. 2015. Engineering and expression of a human rotavirus candidate vaccine in *Nicotiana benthamiana*. *Virology journal*, 12, 205: 1-11.
 36. Pirkoohi M.H. Zibae S. (2013) Plant-based recombinant vaccines. *Intl J Agri Crop Sci*, 6, 1: 27-30.
 37. Rukavtsova E. B., Rudenko N. V., Puchko E. N., Zakharchenko N. S., Buryanov Y. I. 2015. Study of the immunogenicity of hepatitis B surface antigen synthesized in transgenic potato plants with increased biosafety. *Journal of Biotechnology*, 203: 84-88.
 38. Sala F., Rigano M.M., Barbante A., Basso B., Walmsley A.M., Castiglione S. 2003. Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine*, 21: 803-808.
 39. Salazar-Gonzales J. A., Rosales-Mendoza S., Romero-Maldonado A., Monreal-Escalante E., Uresti-Rivera E. E., Banuelos-Hernandez B. 2014. Production of a plant-derived immunogenic protein targeting ApoB100 and CETP: toward a plant-based atherosclerosis vaccine. *Molecular biotechnology*, 56: 1133-1142.
 40. Shaaltiel Y., Gingis-Velitski S., Tzaban S., Fiks N., Tekoah Y., Aviezer D. 2015. Plant-based oral delivery of b-glucocerebrosidase as an enzyme replacement therapy for Gaucher's disease. *Plant*

Biotechnology Journal, 13: 1033-1040.

41. Soh H. S., Chung H. Y., Lee H. H., Ajjappala H., Jang K., Par J.H., Sim J.S., Lee G. Y., Lee H. J., Han Y. H., Lim J. W., Choi I., Chung I. S., Hahn B.S. 2015. Expression and functional validation of heat-labile enterotoxin B (LTB) and cholera toxin B (CTB) subunits in transgenic rice (*Oryza sativa*). Springerplus, 4, 148: 1-14.
42. Tiwari S., Mishra D.K., Roy S., Singh A., Singh P.K., Tuli R. 2009. High level expression of a functionally active cholera toxin B: rabies glycoprotein fusion protein in tobacco seeds. Plant Cell Reports, 28: 1827-1836.
43. USDA issues license for plant cell produced Newcastle disease vaccine for chickens. 2006. <http://www.thepoultrysite.com/poultrynews/8949/usda-issues-license-for-plant-cell-produced-newcastle-disease-vaccine-for-chickens>.
44. Vimolmangkang S., Gasic K., Soria-Guerra R., Rosales-Mendoza S., Moreno-Fierros L., Korban S.S. 2012. Expression of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in soybean seed yields an immunogenic antigenic protein. Planta, 235: 513-522.
45. Wu Y.Z., Li J.T., Mou Z.R., Fei L., Ni B., Geng M., Jia Z.C., Zhou W., Zou L.Y., Tang Y. 2003. Oral immunization with rotavirus VP7 expressed in transgenic potatoes induced high titers of mucosal neutralizing IgA. Virology, 31, 337- 342.
46. Yu J. Langridge W. 2003. Expression of rotavirus capsid protein VP6 in transgenic potato and its oral immunogenicity in mice. Transgenic research, 12, 163-169.
47. Zhang G.G., Rodrigues L., Rovinski B., White K.A. 2002. Production of HIV-1 p24 Protein in Transgenic Tobacco Plants. Mol Biotechnol, 20, 131-136.
48. Zhou B., Zhang Y., Wang X. Dong J., Wang B., Han C., Yu J., Li D. 2010. Oral administration of plant-based rotavirus VP6 induces antigen-specific IgAs, IgGs and passive protection in mice. Vaccine, 28: 6021-6027.
49. Zhou Y., Hao W., Zhao Q., Chen Y.D., Chen Y.H., Tao Y., Bai H.X. 2014. Recent advances in transgenic plant-derived vaccines. Medicinal Plant, 5, 3: 57-60.