

ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

# REVISTA FARMACÉUTICA

Rev. Farm. 164 — N° 2 — 2022



BUENOS AIRES – ARGENTINA

ISSN 0034-9496



---

# REVISTA FARMACÉUTICA

ISSN 0034-9496

Editada por la  
**Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica**  
Personería Jurídica Resol. N° 1762-30/8/1968

## CONSEJO DIRECTIVO 2021-2023

### **Presidente**

Acad. Marcelo C. Nacucchio

### **Vice-Presidente**

Acad. Marta M. Salseduc

### **Secretario General**

Acad. Nélide Mondelo

### **Prosecretario**

Acad. Nestor Caffini

### **Tesorero**

Acad. Osvaldo Cascone

### **Protesorero**

Acad. Virginia Martino

### **Vocales Titulares**

Acad. Juan Pablo F.C. Rossi

Acad. Francisco J. Stefano

### **Vocales Suplentes**

Acad. Gabriel Gutkind

Acad. Rolando Rossi

Revisores de Cuentas

Acad. Otmaro Roses

Acad. María Cristina Añon

Acad. Marco Pizzolato

---

**Volumen 164 Nº 1 Año 2022**

Fundada en 1858

**COMITÉ DE PUBLICACIÓN  
EDITORIAL BOARD**

**Coordinador**

Acad. Marcelo L. Wagner

**Coordinador Alterno**

Alberto Gurni

**Miembros**

Acad. Gabriel Gutkind

Acad. Silvia Hajos

Acad. Virginia Martino

Acad. Marcelo C. Nacucchio

Acad. Maria Luz Pita Martín de Portela

Acad. Juan Pablo F.C. Rossi

Acad. Rolando Rossi

Acad. Marta Salseduc

Editada por la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica  
Junín 956 P.P. C1113AAD, Buenos Aires, Argentina

Correo electrónico: [acad@ffyb.uba.ar](mailto:acad@ffyb.uba.ar)

Página web: <http://www.anfyb.com.ar>

La presente edición se terminó de imprimir en diciembre de 2022

Las ideas que se exponen en la Revista son de exclusiva responsabilidad de los autores  
y no reflejan necesariamente la opinión de la **Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica**.

---

# ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

## ACADEMICOS TITULARES

Acad. María Cristina Añón	Acad. Gabriel O. Gutkind	Acad. Pablo Quiroga
Acad. Nestor O. Caffini	Acad. Silvia Hajos	Acad. Victor Romanowski
Acad. Ricardo A. Caro	Acad. Manuel Limeres	Acad. Otmaro E. Roses
Acad. Osvaldo Cascone	Acad. Virginia Martino	Acad. Juan Pablo F.C. Rossi
Acad. Alberto Diaz	Acad. Horacio José G. Mato	Acad. Rolando Rossi
Acad. Jorge Errecalde	Acad. Nélide Mondelo	Acad. Alfredo Salibian
Acad. Nilda Fink	Acad. Marcelo C. Nacucchio	Acad. Marta M. Salseduc
Acad. Carlos A. Fossati	Acad. José Oyhamburu	Acad. Norma Sterin de Speziale
Acad. Carlos H. Gaozza	Acad. María Luz Pita Martín de Portela	Acad. Francisco J.E. Stefano
Acad. Jorge Geffner	Acad. Marco Pizzolato	Acad. Dora Tombari
Acad. Alberto Gurni	Acad. Edgardo Poskus	Acad. Marcelo Luis Wagner

## ACADEMICOS EMÉRITOS

Acad. Sem M. Albonico	Acad. Clyde N. Carducci	Acad. Carlos A. Gotelli
Acad. Arnaldo L. Bandoni	Acad. Miguel A. Caso	Acad. Ronaldo Meda
Acad. Carlos M. Baratti	Acad. Mateo Chekherdemian	Acad. Modesto C. Rubio
Acad. Mirta J. Biscoglio	Acad. Héctor I. Giuliani	Acad. Regina L. W. de Wikinski

## ACADEMICOS HONORARIOS

Acad. Juan Carlos Bagó	Acad. Mirtha Flawiá	Acad. Federico Mayor Zaragoza
Acad. Ramón A. de Torres	Acad. Benito del Castillo García	Acad. Giannina Pasquini

## ACADEMICOS CORRESPONDIENTES

Acad. Daniel Allemandi	Acad. María L. Martinez	Acad. Clelia M. Riera
Acad. Carlos Bregni	Acad. Rafael Mora	Acad. Daniel O. Sordelli
Acad. Marcelo O. Cabada	Acad. Aldo D. Mottino	Acad. Marcelo D. Squassini
Acad. Oscar H. Fay	Acad. Elsa M. Nadalin	Acad. Alejandro Vila
Acad. Raul C. Fazio	Acad. Santiago D. Palma	Acad. María Guillermina Volonté
Acad. Silvia Gold	Acad. Ana Maria Pechen D'Angelo	
Acad. Ruben H. Manzo	Acad. Gabriela del Valle Perdigón	

---

## ACADEMICOS CORRESPONDIENTES EN EL EXTRANJERO

### **Alemania**

Acad. Pablo Steinberg

### **Brasil**

Acad. Caio Romero Cavalcanti

### **Chile**

Acad. Aquiles Arancibia Orrego

Acad. Rosa I. Morán Gana

Acad. Wanda Quilhot Palma

### **Colombia**

Acad. Fleming Martínez Rodríguez

### **Cuba**

Acad. Ricardo Galvis

Acad. Héctor Zayas Bazán y Perdomo

### **Ecuador**

Acad. Julio E. Araújo

Acad. Eduardo Goetchel

### **España**

Acad. M. del Carmen Francés Causapé

Acad. Eduardo Mariño Hernández

Acad. Ángel Montero Carcaboso

Acad. Antonio M. Rabasco Álvarez

Acad. Alberto Ramos Cormenzana

Acad. Bartolomé Ribas Ozonas

Acad. Miguel Ylla Catalá Genis

Acad. Francisco Zaragoza García

### **Estados Unidos**

Acad. Jorge R. Barrio

Acad. Jorge D. Briolini

Acad. Silvio Gutkind

### **Francia**

Acad. Jean Marc Aïache

Acad. Paul Fleury

Acad. Carlos Soto

### **Italia**

Acad. Stefano Govoni

### **Panamá**

Acad. Ceferino Sánchez

### **Perú**

Acad. José Amiel Pérez

### **Uruguay**

Acad. Jorge Ares Pons

Acad. Pietro Fagiolino

Acad. Raquel Lombardo de Bertolaza

Acad. Justo Emilio Menes

Acad. Patrick Moyna

Acad. Anibal A. Olmos Ferreira

Acad. Oscar Polla Bermúdez

Acad. Joaquín E. Royer Meicoso

### **Venezuela**

Acad. José Luis Andrade

---

## SUMARIO

<b>Producción de vacunas en plataformas vegetales: estado del arte</b>	<b>9</b>
Production of plant made vaccines: state of the art <b>María Alejandra Álvarez</b>	
<b>Mucormicosis, hipoxia y pandemia COVID-19</b>	<b>21</b>
Mucormycosis, hypoxia and COVID-19 pandemic <b>Beatriz Mollerach</b>	
<b>Consumo de Beta-2 agonistas de acción corta en farmacias de la ciudad de Córdoba (Pharmacy survey)</b>	<b>31</b>
Consumption of short-acting Beta-2 agonists in pharmacies in Cordoba (Pharmacy survey) <b>Nicolás Castiglioni, Fabián Ledesma, Nadia Zuccarino, Francisco Rovira</b>	
<b>166° Aniversario de la Academia Nacional De Farmacia y Bioquímica</b>	<b>37</b>
Pharmacy and Biochemical National Academy 166th Aniversary <b>Rafael Alberto Mora</b>	





# PRODUCCIÓN DE VACUNAS EN PLATAFORMAS VEGETALES: ESTADO DEL ARTE\*

María Alejandra Álvarez

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas/ Universidad Maimónides, Facultad de Ciencias de la Salud, Carreras de Farmacia y Bioquímica-CEBBAD. Hidalgo 775 Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina.

[alvarez.mariaalejandra@maimonides.edu](mailto:alvarez.mariaalejandra@maimonides.edu)

\* Este artículo está basado en la conferencia dictada el 11 de mayo del año 2022 en la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica.

## RESUMEN

Las células vegetales poseen la maquinaria adecuada para la producción de proteínas complejas como las animales. Esto las hace capaces de producir inmunógenos que se pueden usar para formular vacunas. Los sistemas vegetales que expresan estas proteínas recombinantes se pueden desarrollar a campo o en sistemas confinados (invernáculo, cultivos *in vitro*, hidroponía). En el primer caso se aprovecha la infraestructura preexistente lo que se traduce en una reducción en los costos de producción, en el segundo caso es posible la bio-contención del transgén. En el caso particular de los cultivos *in vitro* además es posible trabajar en condiciones de buenas prácticas de laboratorio y manufactura tal como lo exige la industria farmacéutica. Se ha logrado desarrollar numerosas vacunas para enfermedades humanas (por ej. contra dengue, malaria, influenza, hepatitis B) y veterinarias (por ej. contra ántrax, diarrea viral bovina, aftosa, parvovirus). Dentro de estas se debe mencionar a las llamadas vacunas comestibles, aquéllas en donde el inmunógeno se expresa en una parte del cuerpo vegetal (fruto, rizoma, hoja, semilla) que luego es consumida con o sin previo procesamiento y que tienen la ventaja de los bajos costos asociados a la ausencia de requisitos relacionados con su transporte, almacenamiento y administración. Recientemente se ha aprobado la primera vacuna elaborada en la plataforma vegetal para ser utilizada en la emergencia causada por la epidemia por SARS COVID-19, desarrollada por la compañía Medicago inc. (Canadá) y aprobada en el año 2022 por los organismos regulatorios del país de origen. Los recientes desarrollos exitosos actúan como motor para avanzar en la consolidación de estas plataformas y así contribuir con la disminución de la morbilidad y mortandad causada por enfermedades infecciosas y enfermedades huérfanas que reciben poca financiación para investigación y desarrollo.

## SUMMARY

### PRODUCTION OF PLANT MADE VACCINES: STATE OF THE ART

Plant cells have the appropriate machinery for the production of complex proteins like animal cells which makes them capable of producing immunogens that can be used to vaccine formulation. Plant systems that express these recombinant proteins can be grown in the field or in confined systems (greenhouse, *in vitro* cultures, and hydroponics). In the first case, the use of the pre-existing infrastructure is translated into a reduction in costs; in the second case, the bio-containment of the transgene is possible. In the particular case of *in vitro* cultures, it is also possible to work under conditions of good laboratory and manufacturing practices as required by the pharmaceutical industry. Numerous vaccines have been developed against human (e.g.: against dengue, malaria, influenza, hepatitis B) and animal (e.g.: against anthrax, bovine viral diarrhea, foot-and-mouth disease, parvovirus) diseases. Among these, the so-called edible vaccines should be mentioned, those in which the immunogen is expressed in a part of the plant body (fruit, rhizome, leaf, seed) that is then consumed with or without prior processing. These edible vaccines have the advantage of their low costs associated with the absence of requirements related to its transportation, storage and administration. The first plant-made vaccine approved for human use was developed by the company Medicago Inc. (Canada) to be used in the emergency caused by the SARS COVID-19 epidemic, and was approved in 2022 by Canada's regulatory organisms. The recent successful developments contribute to consolidate these platforms and thus contribute to the reduction of morbidity and mortality caused by infectious diseases and orphan diseases that receive little funding for research and development.

---

**Palabras clave:** vacunas vegetales, vacunas a subunidad, cosecha molecular

**Key words:** plant-made vaccines, subunit vaccines, molecular farming

## INTRODUCCIÓN

En la reunión de las Naciones Unidas del año 2000 se estableció el compromiso de alcanzar los Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM) con la finalidad de mejorar las condiciones sociales y económicas de los países en desarrollo. Los ocho objetivos especificados estaban asociados a la reducción de la pobreza y el hambre, el acceso a la educación y atención de la salud y el desarrollo sustentable. Estos objetivos se rubricaron y ampliaron en la Agenda 2030 para el Desarrollo sostenible aprobada por la Asamblea General de las Naciones Unidas en el año 2015 (A/Res/70/1). La vacunación es un medio eficiente y relativamente económico para combatir las enfermedades infecciosas. Dentro de este contexto las vacunas desarrolladas en plantas surgen como herramientas útiles para alcanzar algunos de los objetivos ligados a la reducción de la incidencia de enfermedades relevantes y de la mortalidad infantil por enfermedades evitables tales como el cólera y la enfermedad causada por la bacteria *Escherichia coli* enterohemorrágica (Penney *et al.*, 2011). La pandemia iniciada en el año 2022 causada por el virus por SARS Covid-19 dio a conocer al público general la existencia de vacunas a subunidad que utilizan una plataforma vegetal, llamadas popularmente vacunas vegetales. Sin embargo esta tecnología no es reciente sino que comenzó su desarrollo en la segunda mitad del siglo XX. La primer patente para una vacuna elaborada usando esta plataforma data del año 1990, su finalidad era la prevención de las caries causadas por *Streptococcus mutans* (patente No. 5.654.184 US). El desarrollo consistió en la expresión en tabaco de la proteína de superficie SpaA de *S. mutans*, expresión que resultó heredable a la progenie de las plantas transformadas. La SpaA recombinante se mostró estable e inmunogénica luego de su administración oral a ratones detectándose anticuerpos anti-SpaA de tipo IgG en sangre y de tipo IgA en saliva (Mason & Arntzen, 1995; Curtis & Cardineau, 1990). La primera licencia comercial fue otorgada a DOW Agrosience (LLC, Indianápolis, USA) para una vacuna veterinaria desarrollada en suspensiones celulares de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) destinada a prevenir la enfermedad causada por el virus de Newcastle en aves de corral (Sparrow *et al.*, 2007). Desde entonces se han usado una gran variedad de plataformas vegetales (plantas y cultivos de células de especies tales como tabaco, arroz (*Oryza sativa* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), batata (*Ipomoea batatas* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merr.), ginseng siberiano (*Eleutherococcus senticosus* Rupr. & Maxim.) y coreano (*Panax ginseng* C. A. Meyer), lechuga (*Lactuca sativa* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), algas y musgos) para expresar inmunógenos contra una gran variedad de enfermedades infecciosas humanas (hepatitis B, influenza, cólera, malaria, VIH, rabia, contra *E. coli* enterohemorrágica, entre otras) y veterinarias (ántrax, aftosa, diarrea viral bovina, entre otras) (Meric *et al.*, 2021; Sharma & Negri, 2021; Kumar *et al.*, 2018; Takeyama *et al.*, 2015; Rybicki, 2014; Mason & Arntzen, 1995).

En el año 2012 la FDA la primera proteína recombinante producida en plantas (proceso llamado cosecha molecular o *molecular farming*) para uso en humanos. Se trató de la tagliglucerasa alfa (Elelyso<sup>®</sup>, Protalyx; Uplyso<sup>®</sup>, Pfizer) producida en suspensiones de células de zanahoria para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher tipo 1 (Mor, 2015; Zimran *et al.*, 2015; Grabowski *et al.*, 2014; Fox, 2012; Ratner, 2010). Esto resultó un hito para la investigación en el área de la cosecha molecular incluyendo la producción de inmunógenos para el desarrollo de vacunas.

En el año 2022 los organismos reguladores de Canadá aprobaron la primera vacuna desarrollada en plantas (*Nicotiana benthamiana* Domin) para uso humano. Se trató de la vacuna Covifenz<sup>®</sup> desarrollada por la compañía Medicago para ser usada en la emergencia resultante de la pandemia por COVID-19 (Maharjan & Choe, 2021).

### Sistemas vegetales para la producción de vacunas

Los sistemas vegetales son una plataforma alternativa a los sistemas tradicionales de producción de vacunas (bacterias, levaduras, cultivos de células animales). La elección de una u otra plataforma dependerá de factores técnicos y económicos. En el caso de los cultivos bacterianos éstos se caracterizan por producir altos niveles de proteínas recombinantes, pero desarrollan cuerpos de inclusión y poseen limitaciones en cuanto a las modificaciones post-traducción. En contraste, los sistemas eucariontes realizan estas modificaciones con pequeñas variaciones según la especie. En los cultivos de células animales no existen inconvenientes respecto a las modificaciones post-traducción, sin embargo, en estos cultivos hay riesgos de contaminación con patógenos, priones y oncogenes. Además, se desarrollan en medios con alto contenido proteico que encarece notablemente los costos asociados al proceso de purificación de la proteína recombinante. En el caso de los sistemas vegetales las características que los hacen atractivos son el hecho de no presentar riesgos de contaminación por proteínas patógenas de origen animal o toxinas bacterianas, no formar cuerpos de inclusión y cuando se desarrollan cultivos celulares sus medios nutritivos son libres de sueros y los costos de producción son, en general, menores (Álvarez, 2020; Parvathy, 2020; Twyman *et al.*, 2012; Nandi *et al.*, 2016; Mason & Arntzen, 1995). Por otro lado, dentro de sus desventajas se encuentra el

hecho de que los rendimientos de proteína recombinante son en general bajos. Su uso es cuestionado por parte de la opinión pública y, en el caso de las vacunas administradas por vía oral (vacunas comestibles), el manejo de la dosis es un punto controversial (Parvathy, 2020; Van Montagu, 2016; Yusibov *et al.*, 2011; Roberts & Kirk, 2006; Kirk & McIntosh, 2005; Kirk & Webb, 2005)

Cuando se plantea desarrollar una vacuna vegetal se debe tener en cuenta varios aspectos, algunos de ellos comunes con las otras plataformas productivas y otros específicos de la plataforma. Estos aspectos son: selección y diseño del antígeno a utilizar, selección del vector y del hospedante adecuado, transformación vegetal, regeneración de la planta transgénica, confirmación de la expresión del antígeno, evaluación y caracterización del antígeno purificado o del inmunógeno y determinación de su inmunogenicidad o immuno-protección, ensayos de calidad y seguridad del producto, aprobación por parte de los cuerpos regulatorios, producción y controles (Monreal-Escalante *et al.*, 2022).

**Selección y diseño de inmunógenos:** se recurre en general a herramientas de bioinformática, genómica y proteómica. Los epitopes inmunoprotectores pueden identificarse mediante técnicas tales como fago *display*. Después del diseño del inmunógeno se debe optimizar seleccionando los sitios adecuados de restricción, los promotores, adaptando el codón a la especie y eliminando intrones y motivos de ARN inestable (Monreal-Escalante *et al.*, 2022; Dubey *et al.*, 2018)

**Selección y diseño del vector:** los casetes de expresión pueden tener un promotor constitutivo o inducible, por ejemplo, para la expresión selectiva en un tejido u órgano particular (ej.: semillas para un almacenamiento prolongado a temperatura ambiente). Se suele agregar regiones en 5' min para mejorar la eficiencia de la traducción, en 3' min para la poliadenilación y estabilidad del ARNm, regiones flanqueantes que favorezcan la expresión mediante eventos de recombinación homóloga para la integración sitio-específica, etc. Los vectores más usados son los basados en el virus del mosaico del tabaco (TMV) y hay vectores de primera y segunda generación (desconstruidos) con una cantidad mínima de elementos virales para la replicación del vector. La liberación de ADN a la célula vegetal es vía elementos no virales. Por otra parte, hay vectores binarios que reúnen las características del plásmido binario de *Agrobacterium* y de vectores de expresión de virus de plantas. Este tipo de vectores se han usado para sistemas de expresión de anticuerpos monoclonales debido a los altos y estables niveles de expresión de proteínas. Existe una gran variedad de vectores de expresión comerciales (Meric *et al.*, 2021; Venkataraman *et al.*, 2021; Hefferon, 2014; Twyman *et al.*, 2012; Tiwari *et al.*, 2009). Un caso particular es el de las partículas tipo virus (VLPs), proteínas de la cápside de virus vegetales recombinantes autoensambladas (PVNs) no infectivas y sin potencial de replicación, a los que se les adicionan epitopes antigénicos de un agente patógeno y que desencadenan respuestas inmunes efectivas (Lua *et al.*, 2013). Las cápsides helicoides de virus de plantas no envueltas son flexibles, estables y en términos de expresión de genes foráneos son plataformas ideales para los sistemas de presentación de epitopes. Virus helicoides tales como el del mosaico del bambú (BaMV), del mosaico del cardamomo (CdMV), del mosaico de la papaya (PapMV), *ringspot* de la papaya (PRSV), de la papa (PVX, PVY), virus del grabado del tabaco (TEV), del mosaico del tabaco (TMV), del mosaico del zucchini amarillo (ZYMV), entre otros, han sido manipulados para presentar epitopes inmunogénicos en sus superficies lográndose elaborar con éxito vacunas experimentales (Patel *et al.*, 2021; Balke *et al.*, 2018; Dubey *et al.*, 2018; Lua *et al.*, 2013).

**Elección del hospedante:** se debe considerar la capacidad de transformación y regeneración *in vitro* de la especie vegetal, la estrategia de expresión (estable nuclear, en cloroplastos, transitoria), la facilidad de establecer y mantener el cultivo y el rendimiento de biomasa, la presencia de sustancias tóxicas que requieran de purificación o si se va a administrar sin purificar y/o cruda. En el caso del tabaco suelen utilizarse especies con bajo contenido de nicotina o se realiza una extracción y purificación de la proteína (Aliahmadi *et al.*, 2006).

**Sistemas de producción:** pueden ser a campo o confinados (invernáculo, hidroponía, cámara de cultivo, biorreactor). El tipo de cultivo puede encontrarse fuera o dentro de la cadena alimentaria como es el caso de *Nicotiana benthamiana*, tabaco, lenteja de agua, *Arabidopsis thaliana* (L.), Heynh. o dentro de ésta como es el caso de arroz, maíz, zanahoria, tomate, soja, lechuga, papa, alfalfa, banana (*Musa x paradisiaca* L.), papaya (*Carica papaya* L.) (Monreal-Escalante *et al.*, 2022)

**Transformación vegetal:** se refiere de esta manera a la incorporación del gen o genes que codifican para la/s proteína/s de interés en la célula vegetal para su expresión. Se puede alcanzar mediante una transformación estable que implica la integración al genoma nuclear o del plástido, o mediante una transformación transitoria que lleva a la producción de la proteína de interés sin integración del gen que la codifica al genoma del hospedante (Alvarez, 2020, Tiwari *et al.*; 2009).

La transformación estable puede ser nuclear o en cloroplastos, en este caso el transgén se integra al genoma de la planta o del cloroplasto y de esta manera, es heredable y las plantas transgénicas obtenidas pueden ser multiplicadas para la producción de la proteína de interés. Puede lograrse mediante métodos directos (electropo-

ración, biobalística, sonicación), mediante el uso del patógeno natural *Agrobacterium tumefaciens* o de vectores virales o una combinación de ambos. En el caso específico de la transformación nuclear el constructo posee en general secuencias señal que dirigen la expresión de la proteína a una vacuola, al RE (KDEL) o al apoplasto para aumentar la acumulación del antígeno. El proceso demanda tiempo pues luego de la transformación se requiere la regeneración de la planta. Muchas veces la transformación nuclear origina bajos niveles de expresión principalmente debido a efectos posicionales sobre la expresión del transgén o al silenciamiento génico. Aparecen además riesgos de escape génico por lo que debe invertirse en estrategias de contención. Un ejemplo dentro de la gran variedad de desarrollos realizados es el de la expresión de la proteína de fusión F1-V que combina dos antígenos inmunogénicos de *Yersinia pestis* por transformación nuclear en tomate. Los frutos congelados que expresaban la proteína de fusión recombinante fueron administrados a ratones por vía oral como *boost* de una vacuna a subunidad producida en bacterias administrada por vía subcutánea. Se detectaron anticuerpos neutralizantes de tipo IgG en sangre y de tipo IgA en los pellets fecales cuando se administró el *boost* con la vacuna vegetal oral mientras que no se detectó IgA neutralizante en los animales que no recibieron la vacuna vegetal (Tiwari *et al.*, 2009; Alvarez *et al.*, 2006).

En el caso de la transformación plástica los genes foráneos se integran en el genoma de los cloroplastos por recombinación homóloga. Se caracteriza por ser rápida, con producción de un alto número de copias del transgén lo que lleva a altos niveles de expresión, es posible la expresión de varios genes, hay una integración sitio específica sin el fenómeno de silenciamiento génico y es además un mecanismo de contención natural del gen. Sin embargo, no es adecuada para proteínas que requieren de modificaciones post-traducción complejas (Alvarez, 2020; Daniell *et al.*, 2009). La transformación de cloroplastos evita las etapas costosas de fermentación, purificación, almacenamiento respetando la cadena de frío y transporte. La liofilización permite el almacenaje a temperatura ambiente reteniendo la eficacia y el plegado/ensamblado del antígeno. Con esta metodología se han desarrollado vacunas contra cólera, enfermedad de Lyme, ántrax, tétanos, rotavirus, parvovirus canino, entre otras. Arlen *et al.* (2008) produjeron altos niveles del antígeno F1-V de *Yersinia pestis* en cloroplastos de tabaco transgénico, alcanzándose niveles máximos de expresión de 14.8 % de proteína total soluble en hojas. En otro estudio el 33 % de los ratones inyectados subcutáneamente con F1-V (con adyuvante) sobrevivieron mientras que lo hicieron el 88 % de los inmunizados oralmente (Daniell *et al.*, 2009). Como ejemplo de vacunas múltiples desarrolladas en cloroplastos se expresó la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) fusionada con los antígeno-1 de membrana apical de la malaria (AMA1) y la proteína- 1 de superficie del merozoito (MSP1) expresadas en cloroplastos de lechuga y tabaco. Se logró inhibir la proliferación de la malaria en sangre por inducción de anticuerpos específicos en ratón (Davoodi-Semiromi *et al.*, 2010). Se logró también expresar antígenos del virus del papiloma humano (HPV) utilizando la proteína de la cápside L1 del virus (HPV-16 L1), agente causal del cáncer cervical. Se expresó la proteína L1 de una secuencia viral natural (L1v) y de una sintética (L1pt) optimizada para la expresión bajo el control de señales de expresión plásticas en cloroplastos de tabaco. Se observó que los extractos de hojas que expresaban el antígeno resultaron altamente inmunogénicos al ser inoculados en ratones (Latif *et al.*, 2021; Fernández-San Millán, 2008).

En el caso de la expresión transitoria el transgén no se integra al genoma, por lo tanto, no se hereda, sino que se expresa de manera temporal. El gen es integrado a un genoma viral (virus del mosaico del tabaco, del mosaico de la coliflor, del mosaico de la alfalfa), al plásmido Ti de *Agrobacterium*, o se emplea una combinación de ambos (Magniffection®) para ser utilizados como vector de transformación. En la célula vegetal el genoma foráneo se replica en el citoplasma, dando como resultado altos niveles de expresión de la proteína de interés. La ventaja es una rápida expresión, detectable 3 a 4 horas después de la aplicación, alcanzando su nivel máximo de expresión entre las 18 a 48 horas post inoculación. La expresión se puede mantener durante 10 a 14 días con niveles generalmente más altos que con la transformación estable. El proceso es mucho más sencillo que la generación de plantas transgénicas. La cosecha de hojas se realiza dentro de la semana de realizada la aplicación del vector. La proteína se extrae, purifica y luego se continúa con los procedimientos comunes a otros métodos de producción de proteínas recombinantes (Alvarez, 2020; Balke *et al.*, 2018; Tiwari *et al.*, 2009).

Modificaciones post-traducción: en las proteínas la glicosilación, plegado y ensamblado son etapas significativas para su actividad biológica y en consecuencia lo son también para la funcionalidad de una vacuna. Las plantas poseen la maquinaria para desarrollar esos procesos preservando la necesaria inmunogenicidad. Las proteínas recombinantes en plantas se glicosilan, pliegan y pueden formar proteínas multiméricas pues estos procesos son similares a los de las células animales (Paravathy *et al.*, 2020). En el caso particular de la N-glicosilación, los N-glicanos de plantas difieren de los humanos. En plantas la  $\beta$ -manosa del núcleo central del glicano presenta un sustituyente de  $\beta$ -1,2-xilosa que no se encuentra en los N-glicanos de mamíferos, mientras que la N-acetylglucosamina (GlcNAc) proximal está sustituida por una  $\alpha$ -1,3-fucosa en lugar de por la  $\alpha$ -1,6-fucosa que se encuentra en mamíferos. Los GlcNAc terminales en vegetales están unidos a  $\beta$ -1,3-galactosa y  $\alpha$ -1,4-fucosa mientras que en mamíferos los re-

siduos de  $\beta$ -1,4-galactosa está frecuentemente combinado con ácidos siálicos. Cabe destacar que los patrones de glicosilación en plantas pueden ser modificados “humanizando” los derivados proteicos por ejemplo por direccionamiento de la proteína recombinante al RE, inactivación de las glicosiltransferasas vegetales o la expresión *de novo* de glicosiltransferasas heterólogas (Bosch *et al.*, 2013; Gomord *et al.*, 2010; Beck *et al.*, 2008).

Evaluación y caracterización del inmunógeno: La cuantificación, inmunogenicidad y el potencial inmunoprotectivo se analiza por los métodos tradicionales comunes a todas las plataformas productivas (ELISA, ensayos de proliferación, determinación de las respuestas humorales y celulares, entre otras).

Regeneración de la planta: este es un paso imprescindible cuando se trata de la transformación estable. Se lleva a cabo *in vitro* en presencia de un agente de selección. Las condiciones se deben optimizar para cada especie vegetal y es un proceso que tarda varios meses en alcanzarse. El cultivo a campo de las plantas transgénicas enfrenta algunas desventajas tales como la posibilidad de contaminación con agroquímicos, condiciones climáticas adversas, composición irregular de los suelos, ataque de patógenos, características particulares de la proteína recombinante que se expresa, como por ejemplo su toxicidad. Para resolver los inconvenientes derivados de la aparición de alguno de estos factores se puede desarrollar el proceso en sistemas confinados tales como invernáculos o cámaras acondicionadas o en cultivos *in vitro* (suspensiones celulares, raíces transformadas). En los sistemas confinados los niveles de producción son moderados, sin embargo, presentan la gran ventaja de la bioseguridad (sin riesgo de patógenos, oncogenes, toxinas) y los bajos costos. En el caso de los cultivos *in vitro* se suman los bajos costos del proceso de purificación pues los medios de cultivo desde los que se purifica la proteína de interés son simples, sin componentes proteicos. Al escalar a biorreactores es posible conducir los procesos fitofermentativos bajo Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) con un control estrecho de las variables ambientales tal como lo exige la industria farmacéutica (Parvathy, 2020; Franconi *et al.*, 2010; Tiwari *et al.*, 2009).

Se ha comprobado también la capacidad de los cultivos de algas y musgos de expresar proteínas recombinantes. En el caso de las algas se han expresado diferentes proteínas en los cloroplastos del alga fotosintetizadora unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* R.W.Howshaw & H.Ettl. Mediante este mecanismo se han producido vacunas que resultaron estables a temperatura ambiente por tiempos prolongados. Por ejemplo, el dominio de unión a D2 fibronectina de CTB fusionado a *Staphylococcus aureus* se expresó de manera estable en cloroplastos de *C. reinhardtii*. La vacuna experimental desarrollada y administrada por vía oral resultó en una protección del 80 % de los ratones a los que se les administraron dosis letales de *S. aureus* (Gunasekaran & Gothandam, 2020; Specth & Mayfield, 2014; Rosales-Mendoza, 2013; Dreesen *et al.*, 2010). En el caso de los musgos se puede mencionar el caso de *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. que es capaz de realizar modificaciones post traducción del tipo de N-glicosilaciones que resultan idénticas a las de las plantas superiores. Además, se pueden propagar *in vitro* según BPM. Un ejemplo de esto es el desarrollo de una vacuna experimental contra el virus de inmunodeficiencia humana (HIV). Las líneas de musgos transgénicas produjeron una proteína multiepitope (poli-VIH) que desencadenó la respuesta inmune en ratón y es candidata a una vacuna a subunidades (Reski *et al.*, 2018; Cools *et al.*, 2017; Rosales-Mendoza *et al.*, 2014).

Costos de producción: las plataformas vegetales presentan ciertas ventajas respecto a las plataformas clásicas. Una de ellas es la posibilidad de usar la infraestructura preexistente para cultivos a campo comerciales ya bien establecidas. En ambientes confinados los costos también son menores respecto a las plataformas tradicionales. Además, si el inmunógeno no se va a purificar, sino que se va a mantener en el órgano en que se ha expresado, como por ejemplo es el caso de las vacunas comestibles, no se requiere de costosas cadenas de frío y se evita los costos e inconvenientes derivados de la purificación, almacenamiento y administración (Paravathy *et al.*, 2020). Si se utilizan biorreactores los costos lógicamente son mayores, pero como ya se mencionó los medios de cultivo son simples y libres de suero por lo que la purificación es más sencilla y por ende más económica.

Se calcula que el costo de producción de una proteína recombinante en plantas es 10-50 veces menor que en procesos fermentativos con *E. coli*. Se ha calculado el costo de construcción de una planta que cumple Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) para producir 100 kg/año de una vacuna en *Nicotiana benthamiana* (suficiente para mil millones de dosis de 0,1 mg), en aproximadamente 15 millones de dólares, luego de este gasto los costos de mantenimiento son relativamente bajos (Penney *et al.*, 2015; Gleba *et al.*, 2005). Los mayores costos de producción se encuentran en la etapa de purificación de la proteína. En las plataformas vegetales es posible realizar la purificación mediante fusión reversible de la proteína de interés con polipéptidos tipo elastina (ELPs) y separar las proteínas por precipitación desde el extracto crudo seguida de resuspensión (Floss *et al.*, 2010), o usando etiquetas que lleven a la formación de cuerpos oleosos (oleosinas) o cuerpos proteicos (hidrofobinas) y separarlos del extracto crudo por diferencia de densidad (Joensuu *et al.*, 2010; Capuano *et al.*, 2007). A todo esto, se suma la capacidad demostrada de las plataformas vegetales de producir rápidamente grandes cantidades de una vacuna

específica lo que refuerza su potencial en el caso de brotes epidémicos (Penney *et al.*, 2015).

**Seguridad:** las plantas no portan patógenos animales o humanos como virus y priones que pueden encontrarse en sistemas de cultivos de células de mamíferos o animales transgénicos. Tampoco se encuentran las toxinas ni se forman los cuerpos de inclusión que pueden hallarse en sistemas microbianos. Las posibilidades de contaminación con patógenos durante la fermentación y los procesos de extracción son bajas. Si se trabaja en BPM, no existen preocupaciones de bioseguridad y ambientales en estos sistemas salvo si se generan transgénicos y en este caso se subsanan siguiendo las normativas de cada país (Álvarez, 2020; Parvathy *et al.*, 2020).

**Dosis:** cuando el antígeno se extrae y purifica del material vegetal las etapas de elaboración son similares a otras plataformas productivas, de modo que se procede de la misma manera. En el caso de las vacunas comestibles la determinación de la dosis efectiva para una vacuna liberada en mucosa es más compleja. Una cantidad insuficiente de antígeno no alcanzaría a producir la respuesta inmune necesaria para la protección e incluso podría desencadenar tolerancia a la vacuna y tornarla inefectiva (Parvathy *et al.*, 2020). Por otra parte, las vacunas orales requieren de adyuvantes para alcanzar la suficiente actividad inmunogénica.

**Sencillez de la preparación y administración:** el diseño de un vector recombinante y la introducción e integración al sistema vegetal para producir la proteína de interés son relativamente simples. Una vez establecida la plataforma no es difícil adaptarla para la producción del inmunógeno de interés cuando un microorganismo o su antígeno evolucionan y se transforman en una amenaza para la salud. En el caso de las vacunas comestibles éstas son sencillas de distribuir y no requieren de un método particular ni de personal entrenado para su administración. Los órganos vegetales que expresan el inmunógeno (hojas, frutos, semillas) pueden almacenarse cerca del lugar de uso sin riesgos ambientales y ofrecen inmunidad sistémica y de mucosa. Por el contrario, si no se trata de vacunas comestibles, los tejidos vegetales que expresan la proteína de interés pueden ser sujetos a métodos convencionales de extracción de proteínas recombinantes para ser usadas en la formulación la vacuna (Parvathy *et al.*, 2020).

**Estabilidad, almacenamiento, transporte:** según el órgano o tejido en el que se almacenen es posible la conservación a temperatura ambiente, por ejemplo, si se acumulan en semillas las proteínas son estables por varios años sin pérdida de su actividad a temperatura ambiente. Las vacunas comestibles pueden también liofilizarse lo que les da alta estabilidad en un sistema de distribución sin requerimiento de cadena de frío (Tiwari *et al.*, 2009).

**Inmunogenicidad:** La respuesta inmune depende de la naturaleza de la vacuna, su vía de administración y el sistema de *delivery*. Para el caso particular de las vacunas comestibles, muchos antígenos son inmunógenos pobres, reconocidos pobremente por los sistemas inmunes y fáciles de degradar en el tracto digestivo, Las células vegetales protegen al antígeno de la degradación. Inmunógenos tales como la subunidad B de la toxina del cólera (CTB), que puede modificar el medio celular para la presentación del antígeno, puede actuar como un eficiente *carrier* transmucosa y sistema de *delivery* para vacunas a subunidad derivadas de plantas y superar así este inconveniente (Yuki *et al.*, 2013).

**Riesgos ambientales y de salud:** los riesgos potenciales son transferencia génica, exposición al antígeno o al marcador de selección, tolerancia oral, alergenicidad, inconsistencia del dosaje, exposición de trabajadores, exposición accidental al antígeno o al marcador de selección en la cadena alimentaria. Estos riesgos son controlables tomando las medidas apropiadas en todas las etapas de producción y distribución de la vacuna (Clark & Maselko, 2020). En lo que respecta a la posibilidad de escape del transgen y a los métodos de contención el uso de cultivos en biorreactores o en invernáculos y de sistemas de expresión virales aparecen como alternativas menos riesgosas (Franconi *et al.*, 2010).

**Vacunas comestibles:** Las vacunas orales son medios efectivos para la inducción de inmunización por mucosas usando la respuesta de IgA y la subsecuente memoria inmunológica de mucosas. El término vacuna comestible aplicado a vegetales que expresan un inmunógeno recombinante fue acuñado por Charles Arntzen en el año 1990. En ellas el antígeno vacunal es expresado en una parte comestible de la planta o un subproducto y luego de la ingestión estimula al sistema inmune. Una vez que es ingerido la pared de la célula vegetal protege al antígeno de la degradación por parte de la secreción gástrica. Los antígenos se liberan en la superficie de la mucosa intestinal, son absorbidos y estimulan una respuesta inmune específica y fuerte. Resultan atractivas para su distribución sobre todo en zonas en donde es difícil mantener la cadena de frío y disponer de instalaciones y vacunatorios adecuados y por reducir costos al evitar la extracción y purificación de los antígenos. Se han elaborado con éxito vacunas comestibles contra coronavirus (MERS-CoV) (brote 2012 a 2016) en tomate y maíz, contra el cólera (brote 2010 a 2013 y 2015) en papa, tomate y algas y contra la rubeola en tomate entre otras (Gunasekaran & Gothandam, 2020; Patil & Patil, 2006; Charguelegue *et al.*, 2004).

**Vacunas antiparasitarias:** los sistemas vegetales se usan también para desarrollar vacunas contra varias enfermedades parasitarias. Por ejemplo, se encuentra en desarrollo una vacuna contra *Taenia solium cisticercosis*. Se trata de una vacuna de bajo costo, multiepitope, desarrollada en tabaco mediada por transformación con

*Agrobacterium*. Se desarrollaron líneas transgénicas por autopolinización y obtuvieron plantas T1 transgénicas a partir de las semillas cosechadas. Se expresaron varios antígenos en un sistema de poliproteína basado en el mecanismo de escape ribosomal via la secuencia 2A derivada del virus de la aftosa que induce eventos de auto-clivado a nivel traduccional (Monreal-Escalante *et al.*, 2015; Rybicki, 2014; Betancourt *et al.*, 2012).

**Vacunas veterinarias:** la investigación en esta área es abundante y se han desarrollado vacunas contra enfermedades diversas tales como ántrax, virus del herpes bovino, diarrea viral bovina, parvovirus, *E. coli* enterotóxica, entre otras (Mc Donald *et al.*, 2015). En tabaco se expresó el virus VP1 de la aftosa en alfalfa, hojas de *Arabidopsis thaliana* y en papa mientras que la poliproteína P1-2A/proteasa 3C se expresó en tomate (Pan *et al.*, 2008; Dus Santos *et al.*, 2002; Carrillo *et al.*, 2001; Carrillo *et al.*, 1998). Epitopes del virus de la enteritis del visón, hepatitis murina y virus hemorrágico de conejos se expresaron en *Vigna unguiculata*. La glicoproteína S2 del virus de la bronquitis se expresó en papa mientras que el dominio N terminal de la glicoproteína del coronavirus causal de gastroenteritis se expresó en maíz., se expresó la glicoproteína E2 del virus de la diarrea viral bovina mediante transformación estable nuclear y transitoria (Nelson *et al.*, 2012) y plasmídica (Pérez Aguirreburualde *et al.*, 2013). Se ha expresado antígenos para el desarrollo de vacunas para peces criados en acuacultivo (salmón, carpa, bagre, trucha) debido a la alta densidad de individuos que facilita la transmisión de infecciones (Su *et al.*, 2021)

## Marco regulatorio

Como las especialidades medicinales desarrolladas en cultivos vegetales para la producción de proteínas recombinantes con actividad biológica no son productos alimenticios los organismos reguladores involucran tanto a instituciones reguladoras del cultivo de organismos transgénicos como del control de medicamentos (Penney *et al.*, 2011, Franconi *et al.*, 2010).

En el caso de los Estados Unidos de América la regulación es a nivel de producto. Las vacunas vegetales se encuentran bajo el control de la FDA y el departamento de Agricultura (USDA) y, cuando corresponde, el centro de Medicina veterinaria (CVM). Allí las vacunas a base de plantas se consideran materiales biológicos además de entidades químicas, por lo tanto, los productos farmacéuticos elaborados a partir de plantas deben cumplir con la solicitud de licencia de productos biológicos (BLA). En mayo de 2020, el Servicio de Inspección de Sanidad Animal y Vegetal (APHIS) del USDA publicó una revisión de las regulaciones de la Parte 340 del Código de Regulaciones Federales (CFR) 7 (85 Fed. Reg. 29790) que regula la importación, el movimiento interestatal y la liberación ambiental de productos genéticamente modificados (Meric *et al.*, 2021, Tusé 2011, Sparrow *et al.*, 2007).

En la UE, la regulación es tanto a nivel de producción como de producto final. Los miembros de la Unión Europea tienen tanto su propia regulación nacional como una regulación centralizada bajo la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) que actúa como la contraparte de la FDA en Europa. El Comité de Medicamentos a Base de Hierbas (HMPC) es el comité de la EMA responsable de recopilar y evaluar datos científicos sobre sustancias, preparados y combinaciones a base de plantas, para apoyar la armonización del mercado europeo. Sin embargo, las vacunas de origen vegetal están bajo la autorización del Comité de Productos Médicos para Uso Humano (CHMP). Todos los productos farmacéuticos derivados de plantas modificadas genéticamente, incluidas las vacunas a base de plantas, están sujetos a la misma regulación de otros medicamentos derivados de la biotecnología que se indica en la Directiva 2001/83/CE de la Comisión Europea (sobre el código comunitario relativo a los medicamentos para uso humano) y el Reglamento No. 726/2004 (para la autorización y supervisión de medicamentos para uso humano y veterinario). Además, si la planta hospedante es una fuente de alimento para humanos o para animales, el cultivo y la liberación de plantas GM están regulados por la Directiva de la CE 2001/18/EC (sobre la liberación deliberada en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente) y 1829 /2003/EC (sobre alimentos y piensos genéticamente modificados) (Meric *et al.*, 2021, Tusé 2011, Sparrow *et al.*, 2007).

En 2005 la OMS publicó un informe sobre la evaluación de las vacunas para humanos desarrolladas en plantas. La principal conclusión fue que es posible aplicar a las vacunas derivadas de plantas las guías ya existentes sobre desarrollo, evaluación y uso destinadas a las vacunas tradicionales adicionando algunas consideraciones específicas como las referidas a la contención de los cultivos productores y la eliminación de los materiales de desecho (WHO, 2005).

En nuestro país los organismos reguladores son la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) y la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA).

**Tabla 1:** algunos antígenos vacunales expresados en plataformas vegetales utilizando diferentes estrategias de transformación para la prevención de enfermedades infecciosas humanas y animales

Patógeno/enfermedad	Inmunógeno	Especie vegetal	Tipo de Transformación	Destino	Referencia
Hepatitis B	Antígeno de superficie S-HBsAg	Lechuga	Nuclear	Humano	Pniewski <i>et al.</i> , 2018
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Proteína de fusión TBAg-ELP	Tabaco	Nuclear	Humano	Dedieu <i>et al.</i> , 2010
<i>Yersinia pestis</i>	Proteína de fusión F1-V	Tomate	Nuclear	Ratones	Alvarez <i>et al.</i> , 2006
Sarampión	Hemaglutinina del virus del sarampión (MV-H)	Lechuga	Nuclear	Humano	Webster <i>et al.</i> , 2006
Bronquitis viral	Proteína Spike (S)	Papa	Nuclear	Aves	Zhou <i>et al.</i> , 2004
Norwalk virus (NV)	Proteína de la cápside (rNV)	Papa /Tomate	Nuclear	Humano	Zhang <i>et al.</i> , 2006
Rabia	Proteína G	Maíz	Nuclear	Humano y canino	Loza-Rubio <i>et al.</i> , 2012
<i>E. coli</i> <i>S. typhimurium</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	enteroproteína LTB	Tabaco	Nuclear	Humano	Trujillo <i>et al.</i> , 2020
HIV / AIDS	poli-HIV Gp 120 y Gp 41	<i>Physcomitrella patens</i> (Hedw.) Bruch & Schimp	Nuclear	Humano	Orellana– Escobedo <i>et al.</i> , 2015
Síndrome urémico hemolítico	Subunidad B de la toxina termogénica de <i>E. coli</i> enterohemorrágica (LTB)	Soja	Nuclear	Humano	Moravec <i>et al.</i> , 2007
Síndrome urémico hemolítico	Shiga toxina tipo 2	Tabaco	Nuclear	Humano	Wen <i>et al.</i> , 2006
Enfermedad de Lyme	OspA de <i>Borrelia burgdorferi</i>	Tabaco	Cloroplasto	Humano	Glenn <i>et al.</i> , 2006
SARS-COVID-19	Proteína Spike (S) de SARS-CoV2	<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin	Transitoria	Humano	Hager <i>et al.</i> , 2022
Severe acute respiratory síndrome (SARS)	Proteína Spike (S) de coronavirus (CoV, cepa TOR2)	Tabaco con bajo contenido de nicotina, tomate	Nuclear	Ratones	Pogrebnyak <i>et al.</i> , 2005
Influenza H5N1	Hemaglutinina de influenza (H5) cepa A/Indonesia/05/2005 H5N1	<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin	Transitoria	Humano	Pillet <i>et al.</i> , 2018
Papilomavirus humano (HPV)	Proteína L1 de la cápside del virus	Tabaco	Cloroplasto	Humano	Fernández- San Millán <i>et al.</i> , 2008
Cólera	CTB	<i>Arroz Oryza sativa</i>	Nuclear	Humano	Yuki <i>et al.</i> 2013
Enfermedad de Newcastle	Hemaglutinina neuramidinasa	Tabaco	Nuclear	Gallinas	Vermij <i>et al.</i> , 2006
Enfermedad de Newcastle	Proteína F	Arroz	Estable	Gallinas	Guerrero-Andrade <i>et al.</i> , 2006
Aftosa	VP1	<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin	Estable	Cerdos	Yang <i>et al.</i> , 2007
Diarrea viral bovina	Glycoproteína E2		Cloroplasto	Ganado vacuno	Pérez-Aguirreburualde <i>et al.</i> , 2013
Diarrea viral bovina	Glycoproteína E2	Tabaco	Transitoria	Ganado vacuno	Nelson <i>et al.</i> , 2012
Virus rinderpest	Hemaglutinina	Maní <i>Arachis hypogaea</i> L.		Ganado vacuno	Khandelwal <i>et al.</i> , 2003

## El caso de la vacuna contra SARS COVID-19

La plataforma vegetal recibió una gran atención como alternativa de producción rápida de vacunas contra el COVID-19 durante la pandemia iniciada en el año 2020. En particular la utilización de los sistemas de expresión transitoria resultó atractiva por su rapidez, escalabilidad y buenos rendimientos de proteínas recombinantes (Maharjan & Choe, 2021).

La compañía canadiense Medicago Inc. desarrolló dentro de los 20 días de recibida la secuencia genética del SARS-CoV-2 una vacuna contra el COVID-19 por expresión transitoria de la proteína S del virus SARS-CoV-2 usan-



do partículas tipo coronavirus (CoVLP) en *Nicotiana benthamiana*. Esto fue posible pues esta compañía ya tenía bien establecida la plataforma productiva que había producido exitosamente vacunas experimentales durante los brotes de gripe aviar y porcina de años previos (Hendin *et al.*, 2017, Landry *et al.*, 2014). Además de la proteína recombinante S de SARS-CoV-2 se usó el Sistema Adyuvante 03 (AS03) constituido por tocoferol, escualeno y polisorbato 80 en una emulsión agua-aceite, producido por GlaxoSmith Kline, que ya se había usado en tres vacunas contra la influenza: Prepandrix (H5N1), Pandemrix (H1N1pdm09) y Arepanrix (H1N1pdm09) (Maharjan & Choe, 2021). Los datos de ensayos clínicos disponibles hasta la fecha han demostrado que la vacuna CoVLP+AS03 (Covifenz®, Medicago) indujo una fuerte y sostenida producción de anticuerpos neutralizantes y respuesta inmune celular. Estudios clínicos de fase 3 realizados con 24141 voluntarios ( $\geq 18$  años) de 85 centros diferentes de distintos países (Argentina, Brasil, Canadá, México, Reino Unido y los Estados Unidos de América) mostraron que esta vacuna resultó eficaz para prevenir el COVID 19 en las diferentes variantes descritas hasta ese momento con una eficacia que va desde el 69,5 % contra la infección sintomática al 78,8 % contra la enfermedad moderada a severa (Hager *et al.*, 2022). Canadá autorizó el uso de esta vacuna para su uso en adultos entre 18 y 64 años en 24 de febrero del año 2022. Por el contrario, la Organización Mundial de la Salud no aprobó el uso de esta vacuna para su uso en la emergencia en pandemia debido la participación societaria en Medicago de la compañía tabacalera Philip Morris Investments basándose en el hecho de que la OMS y las Naciones Unidas tienen una política estricta en lo relativo a la participación de las tabacaleras en la industria de la salud (Dyer, 2022).

## CONCLUSIÓN

A la luz de los desarrollos que se encuentran en diferentes etapas de estudios clínicos queda claro que la plataforma vegetal permitirá estar mejor preparado frente a futuros brotes de diferentes virus que puedan surgir en el futuro. En una emergencia o crisis lo que se requiere es la solución rápida del problema sin dejar de tener en cuenta los procesos regulatorios y los estándares de calidad de producción y administración. Es imperativo producir vacunas a tasas que compensen la frecuencia de mutación de infecciones virales como la influenza, para la cual aparece una cepa epidémica nueva y única cada año. Las nuevas estrategias recombinantes proporcionadas por la biotecnología vegetal, las evaluaciones funcionales exitosas en modelos animales y el hecho de que hay numerosos desarrollos que ya se encuentran en las fases I, II y III de estudios clínicos indican que en el futuro las vacunas derivadas de plantas serán una parte importante de la lucha contra las enfermedades pandémicas y epidémicas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliahmadi A., Rahmani N., Abdollahi M. (2006). Plant Derived Human Vaccines; An Overview. *Int J of Pharmacol* **2**(3): 268-279.
- Alvarez M.A. (2020). Los sistemas vegetales como plataformas de producción de proteínas de interés para la industria farmacéutica. *Dominguezia* **36**(2): 5-22.
- Alvarez M.L., Pinyerd H.L., Crisantes J.D., Rigano M.M., Pinkhasov J., Walmsley A. M., *et al.* (2006). Plant-made subunit vaccine against pneumonic and bubonic plague is orally immunogenic in mice. *Vaccine* **24**: 2477-2490.
- Arlen P.A., Singleton M., Adamovicz J.J., Ding Y., Davoodi-Semiromi A., Daniell H. (2008). Effective Plague Vaccination via Oral Delivery of Plant Cells Expressing F1-V Antigens in Chloroplasts. *Infect Immun.* **76**(8): 3640-3650.
- Balke I., Zeltins A. (2018). Use of plant viruses and virus-like particles for the creation of novel vaccines. *Adv Drug Deliver Rev.* **145**: 119-129.
- Beck A., Wagner-Rousset E., Bussat M.C., Lokteff M., Klinguer-Hamour C, Haeuw J.F., *et al.* (2008). Trends in glycosylation, glycoanalysis and glycoengineering of therapeutic antibodies and Fc-fusion proteins. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **9**: 482-501.
- Bosch D., Castilho A., Loos A., Schots A., Steinkellner H. (2013). N-Glycosylation of Plant –produced Recombinant Proteins. *Curr Pharm Design.* **19**: 5503-5512.
- Capuano F., Beaudoin F., Napier J.A., Shewry P.R. (2007). Properties and exploitation of oleosins. *Biotechnol Adv.* **25**: 203-206.
- Carrillo C, Wigdorovitz A, Oliveros JC, Zamorano PI, Sadir AM, Gomez N, *et al.* (1998). Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *J Virol.* **72**: 1688-1690.
- Carrillo C, Wigdorovitz A, Trono K, Dus Santos MJ, Castañón S, Sadir AM, *et al.* (2001). Induction of a virus-specific antibody response to foot and mouth disease virus using the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants. *Viral Immunol.* **14**: 49-57.
- Charguelegue D., Drake P.M.W., Obregon P., Ma J.K.C. (2004). *Production of Secretory IgA in Transgenic Plants*. En: Molecular Farming: Plant-Made Pharmaceuticals and Technical Proteins. (R. Fischer, S. Schillberg eds.) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Pp.: 159-169.

- Clark M., Maselko M (2020). Transgene Biocontainment Strategies for Molecular Farming. *Front Plant Sci.* **11**: 210. Disponible en: doi: 10.3389/fpls.2020.00210
- Cools E., Van Dijk P., Avonce N. (2017). Heterologous protein production in the moss *Physcomitrella patens*. *VacciMonitor.* **26** (2): 66-69.
- Dedieu L., Floss D.M., Mockey M., Zanello G., Brosson D.; Diogon M., *et al.* (2010). Expression and immunogenicity of the mycobacterial Ag85B/ESAT-6 antigens produced in transgenic plants by elastin-like peptide fusion strategy. *J. Biomed. Biotechnol.* Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2010/274346>
- Daniell H., Singh N.D., Mason H., Streatfield S.J. (2009). Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci.* **14** (12): 669-679.
- Davoodi-Semiromi A., Schreiber M., Nallapali S., Verma D., Singh N.D., Banks R.K., *et al.* (2010). Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery. *Plant Biotechnol. J.* **8** (2): 223-242.
- Dreesen I.A.J., Charpin-El Hamri G., Fussenegger M. (2010). Heat -stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection. *J. Biotechnol* **145**: 273-280.
- Dubey K.K., Luke G.A., Knox C., Kumar P., Pletschke B.I., Sing P.K., *et al.* (2018). Vaccine and antibody production in plants: developments and computational tools. *Brief Funct Genomics.* **17**(5): 295-307.
- Dus Santos MJ, Wigdorovitz A, Trono K, Rios RD, Franzone PM, Gil F, *et al.* (2002). A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus (FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants. *Vaccine.* **20**: 1141-1147.
- Dyer O. (2022). Covid-19: WHO set to reject Canadian plant based vaccine because of links with tobacco industry. *BMJ*: 376:o811 <https://doi.org/10.1136/bmj.o811>
- Curtis R., Cardineau G.A. (1990). World Intellectual Property Organization, PCT/US89/03799.
- Franconi R., Demurtas O.C., Massa S. (2010). Plant-derived vaccines and other therapeutics produced in contained systems. *Expert Rev. Vaccines.* **9**(8): 577-892.
- Grabowski G.A., Golembó M., Shaaltiel Y. (2014). Taliglucerase alfa: An enzyme replacement therapy using plant cell expression technology. *Mol Genet Metab.* **112**: 1-8.
- Fernández-San Millán A., Ortigosa S.M., Hervás-Stubbs S., Corral-Martínez P., Seguí-Simarro J.M., Gaétan J., *et al.* (2008). Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant Biotechnol J.* **6**: 427-441.
- Floss D.M., Schallau K., Rose-John S., Conrad U., Scheller J. (2010) Elastin-like polypeptides revolutionize protein expression and their biomedical application. *Trends Biotechnol.* **28**:37-45.
- Fox J.L. (2012). First plant-made biologic approved. *Nat Biotechnol.* **30**(6): 472.
- Franconi R., Demurtas O.C., Massa S. (2010). Plant-derived vaccines and other therapeutics produced in contained systems. *Expert Rev. Vaccines.* **9** (8): 877-892.
- Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. (2005) Magniffection-a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine.* **23**: 2042–2048.
- Glenz K., Bouchon B., Stehle T., Wallich R., Simon M.M., Warzecha H. (2006). Production of a recombinant bacterial lipoprotein in higher plant chloroplasts. *Nature Biotechnology.* **24** (1): 76-77.
- Guerrero-Andrade O., Loza-Rubio E., Olivera-Flores T., Fehérvári-Bone T., Gómez-Lim, M. (2006). Expression of the Newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies. *Transgenic Res.* **15**: 455-463.
- Gunasekaran B., Gothandam K.M. (2020). A review on edible vaccines and their prospects. *Braz J Medical Biol Res.* **53** (2): e8749, disponible en: <http://doi.org/10.1590/1414-431X20198749>
- Hager K.J., Pérez Marc G., Gobeil P., Diaz R.S., Heizer G., Llapur C., *et al.* (2022). Efficacy and Safety of a Recombinant Plant-Based Adjuvanted Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med.* **386**: 2084-2096.
- Hefferon K. (2014) Plant Virus Expression Vector Development: New Perspectives. *BioMed Res Int.* **Disponibile en:** <http://doi.org/10.1155/2014/785382>
- Hendin H., Pillet S., Lara A.N., Wu C.-Y., Charland N., Landry, N., *et al.* (2017). Plant-made virus-like particle vaccines bearing the hemagglutinin of either seasonal (H1) or avian (H5) influenza have distinct patterns of interaction with human immune cells in vitro. *Vaccine.* **35**: 2592-2599.
- Joensuu J.J., Conley A.J., Lienemann M., Brandle J.E., Linder M.B., Menassa R. (2010). Hydrophobin fusions for high-level transient protein expression and purification in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* **152**: 622-633.
- Khandelwal A., Lakshmi S., Shaila M. (2003). Oral immunization of cattle with hemagglutinin protein of rinderpest virus expressed in transgenic peanut induces specific immune responses. *Vaccine.* **21**: 3282-3289.
- Kirk D.D., McIntosh K. (2005). Social Acceptance of Plant-Made Vaccines: Indications from a Public Survey. *AgBioForum.* **8**(4): 228-234.
- Kirk D.D., Webb S.R. (2005). The next 15 years: Taking plant-made vaccines beyond proof of concept. *Immunol Cell Biol.* **83**: 248-256.
- Kumar G., Karthik L., Bashkara Rao K.V. (2018). *Plant Vaccines: An Overview.* En *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development* (J. Singh *et al.*, eds, Springer Nature Singapore Pte Ltd.). Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0053-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0053-0_13)

- Landry N., Pillet S., Favre D., Poulin J.F., Trépanier S, Yassine-Diab B., *et al.* (2014). Influenza virus-like particle vaccines made in *Nicotiana benthamiana* elicit durable, poly-functional and cross-reactive T cell responses to influenza HA antigens. *CI Immunol.* **154**: 164-177.
- Latif S., Gottschamel J., Syed T., Younus I., Gull K., Sameeullah M., *et al.* (2021). Inducible expression of human papillomavirus-16 L1 capsomeres in the plastomes of *Nicotiana tabacum*: Transplastomic plants develop normal flowers and pollen. *Biotechnol Appl Biochem*: 1-16.
- Lua L.H.L., Connors N.K., Sainsbury F., Chuan Y.P., Wibowo N., Middelberg P.J. (2013). Bioengineering Virus-Like Particles as Vaccines. *Biotechnol Bioeng.* **111**(3): 425-440.
- Loza-Rubio E., Rojas-Anaya E., López J., Olivera-Flores M.T., Gómez-Lim M., Tapia-Pérez G. (2012) Induction of a protective immune response to rabies virus in sheep after oral immunization with transgenic maize, expressing the rabies virus glycoprotein. *Vaccine.* **30**: 5551-5556.
- Mac Donald J., Doshi K, Dussault M, Hall J.C., Holbrook L., Jones G., *et al.* (2015). Bringing plant-based veterinary vaccines to market: Managing regulatory and commercial hurdles. *Biotechnol Adv.* **33** (8): 1572-1581.
- Maharjan P.M., Choe S. (2021). Plant-Based COVID-19 Vaccines: Current Status, Design, and Development Strategies of Candidate Vaccines. *Vaccines.* **9**: 992 Disponible en: <https://doi.org/10.3390/vaccines9090992>
- Mason H.S., Arntzen C.J. (1995). Transgenic plants as vaccine production systems. *TIBTHEC.* **13**: 388-392.
- Meric S., Glumfus T., Ayan A. (2021). *Plant-based Vaccines: The Future of Preventive Healthcare?* En: Botany - Recent Advances and Applications (Ghimire B.K. ed.). InTech Open. Disponible en: <https://doi.org/10.5772/intechopen.97861>
- Mor T.S. (2015). Molecular pharming's foot in the FDA's door: Protalix's trailblazing story. *Biotechnol Lett.* **37**: 2147-2150.
- Moravec T., Schmidt M.A., Herman E.M., Woodford-Thomas T. (2007). Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine.* **25**: 1647-1657.
- Nandi S., Kwong A.T., Holtz B.R., Erwin R.L., McDonald M., McDonald K.A. (2016). Techno-economic analysis of a transient plant-based platform for monoclonal antibody production. *mAbs.* **8** (8): 1456-1466.
- Nelson G., Marconi P., Periolo O., La Torre J., Alvarez M. A. (2012). Immunocompetent truncated E2 glycoprotein of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) expressed in *Nicotiana tabacum* plants: a candidate antigen for new generation of veterinary vaccines. *Vaccine.* **30**: 4499-4504.
- Orellana-Escobedo L., Rosales-Mendoza S., Romero-Maldonado A., Parsons J., Decker E.L., Monreal- Escalante E., Moreno-Fierros L., Reski R. (2015). An Env-derived multi-epitope HIV chimeric protein produced in the moss *Physcomitrella patens* is immunogenic in mice. *Plant Cell Rep.* **34**: 425-433.
- Pan L., Zhang Y., Wang Y., Wang B., Wang W., Fang Y., *et al.* (2008). Foliar extracts from transgenic tomato plants expressing the structural polyprotein, p 1-2A, and protease, 3C, from foot-and-mouth disease virus elicit a protective response in guinea pigs. *Vet Immunol Immunopathol.* **121**: 83-90.
- Parvathy S.T. (2020). Engineering Plants as Platforms for Production of Vaccines. *Am J Plant Sci.* **11**: 707-735.
- Patel M., Shah N., Dave D., Trivedi R., Jetha K., Shah P. (2021). A review on Effectivity of Plant based vaccines in the treatment of viral diseases. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics.* **11**(3-s): 90-97.
- Patil V.U., Patil D.P. (2006). Edible Vaccines from Transgenic Plants. *Res J BioTech.* **1** (1): 52-58.
- Penney C.A., Thomas D.R., Deen S.S., Walmsley A.M. (2011). Plant-made vaccines in support of the Millennium Development Goals. *Plant Cell Rep.* **30**: 789-798.
- Pérez Aguirreburualde M., Gómez M., Ostachuk A., Wolman F., Albanesi G., Pecora A. *et al.* (2013). Efficacy of a BVDV subunit vaccine produced in alfalfa transgenic plants. *Vet Immunol Immunopathol.* **151**: 315-324.
- Pniewski T., Milczarek M., Wojas-Turek J., Pajtasz-Piasecka E., Wietrzyk M., Czyż J. (2018). Plant lyophilisate carrying S-HBsAg as an oral booster vaccine against HBV. *Vaccine.* **36**: 6070-6076.
- Pogrebnyak N., Golovkin M., Andrianov V., Spitsin S., Smirnov Y., Egolf E., *et al.* (2005). Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: Development of recombinant vaccine. *PNAS.* **102** (25): 9062-9067.
- Ratner M. (2019). Pfizer stakes a claim in plant cell-made biopharmaceuticals. *Nat. Biotechnol.* **28** (2): 107-108.
- Reski R., Bae H., Simonsen H.T. (2018). *Physcomitrella patens*, a versatile synthetic biology chassis. *Plant Cell Rep.* Disponible en doi:10.1007/s00299-018-2293-6
- Roberts J.S., Kirk D.D. (2006). Ethics, Biotechnology, and Global Health: The Development of Vaccines in Transgenic Plants. *The Am J Bioethics.* **6**:4, W29-W41.
- Rosales-Mendoza S., Orellana-Escobedo L., Romero-Maldonado A., Decker E.L., Reski R. (2014). The potential of *Physcomitrella patens* as a platform for the production of plant-based vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* **13**(2), 203-212.
- Rosales-Mendoza S. (2013). Future directions for the development of *Chlamydomonas*-based vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* **12**(9), 1011-1019.
- Rybiki E.P. (2014). Plant-based vaccines against viruses. *Virology.* **11**: 205. <http://www.virologyj.com/content/11/1/205>.
- Sharma S., Negri N.P. (2021). Production and Challenges of Plant Based Vaccines. *Ann R.S.C.B.* **25** (1): 3625-3639.

- Sparrow P. A. C., Irwin, J.A., Dale, P.J., Twyman, R.M., Ma, J.K.C. (2007). Pharma-Planta: Road testing the developing regulatory guidelines for plant-made pharmaceuticals. *Transgenic Res.* **16**: 147-161.
- Specht E.A., Mayfield S.P. (2014). Algae-based oral recombinant vaccines. *Front Microbiol.* **5**: 60.
- Su H., Yakovlev I.A., van Eerde A., Su J., Clarke J.L. (2021). Plant-Produced Vaccines: Future Application in Aquaculture. *Front. in Plant Sci.* Disponible en: 12:718775. doi: 10.3389/fpls.2021.718775
- Takeyama N., Kiyono H., Yuki Y. (2015). Plant-Based vaccines for animals and humans: recent advances in technology and clinical trials. *Ther Adv Vaccines.* **3** (5-6): 139-154.
- Tiwari S., Verma P.C., Singh P.K., Tuli R. (2009). Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnol Adv.* **27**: 449-467.
- Trujillo E., Rosales-Mendoza S., Angulo C. (2020). A multi-epitope plant-made chimeric protein (LTB entero) targeting common enteric pathogens is immunogenic in mice. *Plant Mol. Biol.* **102**: 159-169.
- Tusé D. (2011). Safety of plant-made pharmaceuticals. Product development and regulatory considerations based on case studies of two autologous human cancer vaccines. *Hum Vaccines.* **7** (3): 322-330.
- Twyman R.M., Schillberg S., Fischer R. (2012). *The Production of Vaccines and Therapeutic Antibodies in Plants*. En: *Molecular Farming in Plants: Recent Advances 145 and Future Prospects* (A. Wang and S. Ma eds.). Disponible en: 10.1007/978-94-007-2217-0\_7, © Springer Science+Business Media B.V.
- Van Montagu M. (2016). GM crops: not the science but the regulatory policy is the problem. *Acta Hort.* **1124**. Disponible en: <https://10.17660/ActaHortic.2016.1124.1>
- Venkataraman S., Hefferon K., Makhzoum A., Abouhaidar M. (2021). Combating Human Viral Diseases: Will Plant-Based Vaccines Be the Answer? *Vaccines.* **9**: 761. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/vaccines9070761>
- Vermij P. (2006). USDA approves the first plant-based vaccine (News In Brief). *Nature Biotechnol.* **24**: 233-234.
- Webster D.E., Smith S.D., Pickering R.J., Strugnell R.A., Dry I.B., Wesselingh S.L. (2006). Measles virus hemagglutinin protein expressed in transgenic lettuce induces neutralizing antibodies in mice following mucosal vaccination. *Vaccine.* **24**: 3538-3544.
- Wen S.X., Teel L.D., Judge N.A., O'Brien A.D. (2006). A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2. *PNAS.* **103** (18): 7082-7087.
- WHO (2005). WHO Informal Consultation on Scientific basis for regulatory evaluation of candidate human vaccines from plants. Disponible en: <https://www.who.int/publications/m/item/regulatory-evaluation-of-candidate-human-vaccines-from-plants>
- Yang C., Liao J., Lai C., Jong M., Liang C., Lin Y. et al. (2007). Induction of protective immunity in swine by recombinant bamboo mosaic virus expressing foot-and-mouth disease virus epitopes. *BMC Biotechnol.* **7**: 62.
- Yuki Y., Mejima M., Kurokawa S., Hiroiwa T., Takahashi Y., Tokuhara D., et al. (2013). Induction of toxin-specific neutralizing immunity by molecularly uniform rice-based oral cholera toxin B subunit vaccine without plant-associated sugar modification. *Plant Biotechnology Journal.* **11**: 799-808.
- Yusibov V., Streatfield S.J., Kishnir N. (2011). Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: Vaccines, antibodies and beyond. *Hum Vaccines.* **7**(3): 313-321.
- Zhang X., Buehner N.A., Hutson A.M., Estes M.K., Mason H.S. (2006). Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein. *Plant Biotechnol. J.* **4**: 419-432.
- Zhou J.Y., Cheng L.Q., Zheng X.J., Wu J.X., Bin Shang S., Wang J.Y., Chen J.G. (2004). Generation of the transgenic potato expressing full-length spike protein of infectious bronchitis virus. *J. Biotechnol.* **111**: 121-130.
- Zimran A., Brill-Almon E., Chertkoff R., Petakov M., Blanco-Favela F., Terreros Muñiz E., et al. (2015). Pivotal trial with plant cell-expressed recombinant glucocerebrosidase, taliglucerase alfa, a novel enzyme replacement therapy for Gaucher disease. *Blood.* **118** (22): 5767-5773.

## AGRADECIMIENTOS

La autora es miembro del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).