



**Plataformas de expresión en plantas de péptidos humanos terapéuticos:
expresión transitoria y estable.
(In plant expression platforms of therapeutic human peptides:
transient and stable expression)**

Arnaldo Noguera¹✉, Gustavo Fermín¹.

¹ Laboratorio de Biodiversidad y Variabilidad Molecular, Instituto Jardín Botánico de Mérida, Facultad de Ciencias.
Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.

[REVISIÓN]

Recibido: 16 de Mayo de 2013. Aceptado: 20 de Julio de 2013.

Resumen

Las plantas representan un sistema de expresión alternativo para la producción de proteínas heterólogas complejas tales como vacunas, antígenos, anticuerpos, eritropoyetina e insulina humana. Este sistema posee diversas ventajas sobre los sistemas de expresión tradicional basados en el cultivo de células de bacterias, levaduras, insectos y mamíferos, como su bajo costo de producción, menor tiempo para alcanzar la producción a gran escala, expresión, modificación y ensamblaje apropiado de la proteína recombinante y ausencia de riesgo de contaminación con patógenos humanos. En la última década la ingeniería genética de plantas ha utilizado ampliamente los sistemas de expresión estable basados en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y la expresión transitoria basada en los vectores virales de plantas para la obtención de compuestos beneficiosos para la salud y el bienestar del hombre. La introducción de estos elementos virales en los sistemas de producción de proteínas recombinantes ha simplificado la manipulación y el proceso de infección de las plantas con el gen quimérico. Aunado a esto, el entendimiento de la inmunogenicidad que poseen los glicanos de origen vegetal sobre la actividad de los péptidos heterólogos, ha permitido dilucidar cuales son las vías moleculares más convenientes para expresar, ensamblar, compartamentalizar e incrementar la acumulación de las proteínas de interés. Con la presente revisión se busca proporcionar al lector una información detallada acerca de las estrategias de expresión heterólogas que utilizan sistemas vegetales, los principales agentes terapéuticos desarrollados basados en estos sistemas y la importancia biológica de las modificaciones post-traduccionales de los péptidos recombinantes.

Palabras clave

Expresión transitoria y estable, proteínas recombinantes, modificaciones post-traduccionales, vectores virales.

Abstract

Plants represent an alternative expression system for the production of complex heterologous proteins such as vaccines, antigens, antibodies, erithropoietin and human insulin. These living systems offer many advantages over other traditional expression systems based on the cultivation of cells of bacterial, yeast, insect or mammal origin: low production costs, a reduced time to reach big scale production, as well as proper expression, modification and folding of the recombinant protein, along with a complete lack of contamination risks with human pathogens. In the last decade, genetic engineering of plants has made a wide use of the stable expression systems based on the phytopathogenic bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, besides the transient expression based on plant virus vectors aimed at producing beneficial compounds for the health and well being of humans. Use of these viral elements in the production systems of recombinant proteins has simplified both the manipulation and infection processes of plants with the chimeric gene. Furthermore, the analysis of immunogenicity displayed by plant glicans when present in heterologous peptides has allowed understanding which molecular pathways are more convenient to express, fold, compartmentalize and increase the accumulation of the protein of interest. With this short review we intend to provide the readers detailed information about the strategies of heterologous expression that make use of plant systems, the main therapeutic agents developed based on these systems and the biological importance of the post-translational modifications of the recombinant peptides.

Keywords

Transient and stable expression, recombinant proteins, post-translational modifications, viral vectors.

Sistemas de expresión de proteínas heterólogas

Progresos recientes en ingeniería genética y expresión de proteínas heterólogas han acelerado el desarrollo de compuestos biológicos importantes con aplicaciones médicas. Biofármacos tales como anticuerpos, sustitutos de productos sanguíneos, vacunas, hormonas, citokinas y una gran variedad de otros agentes terapéuticos, se han expresado a través de múltiples sistemas biológicos ideados para producir proteínas recombinantes biológicamente activas. Estos sistemas abarcan desde la expresión utilizando la bacteria *E. coli* para proteínas estructuralmente simples, hasta la producción de péptidos que presentan diversos niveles de complejidad estructural y funcional, los cuales se expresan en hospederos eucarióticos como células de levaduras, insectos, plantas y mamíferos. Los sistemas convencionales de expresión de proteínas basados en el cultivo de células bacterianas, insectos, levaduras y mamíferos presentan diversas desventajas en términos de costo, rendimiento, seguridad del producto y autenticidad estructural (Tabla 1).

Dentro de las desventajas más relevantes de estos sistemas se encuentran, ausencia de la maquinaria involucrada con la modificación post-traduccional en bacterias, por lo que su utilidad en la producción de proteínas multiméricas es limitada (1), los sistemas de expresión empleando células de levaduras con frecuencia generan proteínas hiperglicosiladas que pueden ver afectado su funcionamiento, el cultivo de células de insectos y mamíferos o el uso de animales transgénicos demandan complejas plataformas de expresión que requieren procedimientos costosos y con alto nivel de bioseguridad (2), aunado a la susceptibilidad de generar proteínas contaminadas con toxinas, priones o virus (3). No obstante, en los últimos diez años la agricultura molecular basada en plantas superiores ha surgido como una plataforma promisoriosa para producir a gran escala y eficientemente proteínas recombinantes farmacológicamente útiles (4). En este sentido, la posibilidad de producir biofármacos utilizando plantas ofrece soluciones para algunos de los problemas relacionados con los sistemas convencionales; por ejemplo, ausencia de riesgo de contaminación con patógenos animales, bajo costo (especialmente para la producción a gran escala), alto rendimiento de la proteína foránea (5), anticuerpos ensamblados apropiadamente o con un plegamiento proteico equivalente al encontrado en otros sistemas

eucarióticos, posibilidad de expresar anticuerpos humanizados (6), expresión de vacunas múltiples en un mismo órgano vegetal comestible (7), facilidad de manejo de plantas en invernadero, rápida distribución de plantas a escala mundial y posibilidad de producir vacunas comestibles para la vacunación masiva (8-10).

Con este propósito se desarrollaron inicialmente plantas transgénicas para expresar proteínas foráneas a través de la integración estable de genes heterólogos dentro del genoma nuclear o del genoma plastidial (3). No obstante, surgieron múltiples inconvenientes asociados a este sistema de expresión; entre ellos, bajo rendimiento de proteínas (11), costo de producción elevado en comparación con otros sistemas de expresión vegetal, expresión limitada a una especie de planta transgénica individual, máximo rendimiento obtenido luego de 1 a 3 años desde que se inicia la clonación del gen foráneo (12) y poca aceptación de los transgénicos por parte de algunos sectores de la comunidad mundial. Posteriormente se desarrolló un sistema que ha permitido producir una diversidad de compuestos con acción nutritiva y terapéutica, comúnmente llamados nutraceuticos, empleando los virus de plantas como vectores de expresión transitoria (13-19). Esta última estrategia basada en vectores virales ofrece como ventajas, alto rendimiento de proteínas libres o no fusionadas al virión quimérico, integración estable de la secuencia foránea dentro del genoma del virus pero no dentro del genoma vegetal (por lo que no es heredado), amplificación del gen foráneo por la replicasa viral, capacidad de replicación de los virus en un amplio rango de especies vegetales, máximo rendimiento alcanzado entre 1 y 3 meses una vez que la planta es inoculada con el virus quimérico, bajo costo de producción y gran aceptación como método de expresión transitoria sobre cualquier otro sistema que emplea plantas en un medio confinado (17).

Expresión de anticuerpos en plantas transgénicas

La expresión estable de proteínas recombinantes en muchos grupos de plantas, especialmente en dicotiledóneas como el tabaco, ha sido posible utilizando la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* o el bombardeo de partículas como métodos de modificación genética. Desde que se reportó por primera vez la expresión de anticuerpos procedentes de plantas (plantibodies) utilizando estas estrategias (20), diferentes

Tabla 1. Comparación de varios sistemas de expresión de proteínas farmacéuticas recombinantes.

Características	SISTEMA						
	Bacteria	Levadura	Cultivo de células de mamífero	Animales transgénicos	Cultivo de células de planta	Plantas transgénicas	Vectores de virus de plantas
Costo general de producción	Bajo-medio	Medio	Alto	Alto	Medio	Bajo	Bajo
Costo de almacenamiento	Moderado (20°C)	Moderado (20°C)	Costoso	Costoso	Moderado (18–25°C)	Moderado (25°C)	Moderado (–20 °C)
Capacidad de ampliación	Alta	Alta	Muy baja	Baja	Medio	Alta	Muy alta
Costo de ampliación	Alto ¹	Alto ¹	Alto ¹	Alto	Alto	Alto	Bajo
Escala de producción	Limitado	Limitado	Limitado	Limitado	Limitado	Mundial	Mundial
Tiempo para producción a gran escala	Bajo	Medio	Alto	Muy alto	Medio	Alto	Bajo
Distribución	Difícil	Difícil	Muy difícil	Difícil	Difícil	Fácil	Fácil
Propagación del sistema	Fácil	Fácil	Difícil	Factible	Fácil	Fácil	Fácil
Tamaño del gen	Desconocido	Desconocido	Limitado	Limitado	No limitado	No limitado	Limitado ²
Rendimiento del producto	Medio	Alto	Medio–alto	Alto	Alto	Alto	Muy alto
Calidad del producto	Bajo	Medio	Alto–muy alto	Alto–muy alto	Alto	Alto	Alto
Homogeneidad de la proteína	Bajo	Medio	Medio	Alto	Alto	Alto	Alto
Glicosilación	Ausente	Incorrecta	Correcta (diferencias menores)	Correcta (diferencias menores)	Correcta (diferencia de los glicanos añadidos)	Correcta (diferencia de los glicanos añadidos)	Correcta (diferencia de los glicanos añadidos)
Plegamiento proteico	Bajo	Medio	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
Ensamblaje de proteínas triméricas	No	No	No	Sí	No	Sí	Sí
Seguridad	Baja	Alta	Baja Virus, priones y ADN oncogénico	Baja Virus, priones y ADN oncogénico	Alta	Alta	Alta
Riesgo terapéutico	Endotoxinas	Desconocido			Desconocido	Desconocido	Desconocido
Percepción pública del riesgo	Bajo	Medio	Medio	Alto	Alto	Alto	Alto

¹Fermentadores grandes y costosos. ²A medida que aumenta el tamaño del inserto es más probable que ocurra su delección (Referencia 88).
 Compilado de las referencias 3, 6 y 31.

anticuerpos y sus derivados se han producido en estos sistemas vegetales (Tabla 2). Este hallazgo demostró que las plantas pueden ensamblar glicoproteínas compuestas por diversas sub–unidades proteicas con una gran autenticidad funcional y estructural (3). Es por ello que el desarrollo de anticuerpos monoclonales empleando estos métodos ha resultado atractivo para muchas empresas farmacéuticas interesadas en encontrar alternativas de producción a gran escala que sean económicamente viables y operacionalmente seguras (21-25). En este sentido, diferentes tipos de inmunoglobulinas se han producido exitosamente en

plantas, incluyendo algunas subclases de IgG dirigidas contra la creatinkinasa humana, el éster fosfonato, el antígeno II de *Streptococcus mutans* o las glicoproteínas de la envoltura del virus del herpes simplex–2. Asimismo se han expresado fragmentos variables (scFv) de un idiotipo de IgG específico contra epítopes derivados de linfomas de células B murinas (26, 27), anticuerpos idiotípicos de la clase IgM con alta actividad anti–NP [(4–hidroxi–3–nitro–fenil) acetyl] con su hapteno correspondiente (28), inmunoglobulinas secretoras híbridas IgA/G específicas para la proteína de adhesión principal de *S. mutans*

(29) y un anticuerpo monoclonal neutralizante denominado 2F5, el cual se une al epítipo lineal altamente conservado ELDKWS sobre el extremo C-terminal de la gp41 del VIH-1 (30). Otro gran número de anticuerpos (31) cuyo uso ha sido propuesto no sólo en el diagnóstico y prevención, sino también en el tratamiento de enfermedades de diversas etiologías se han desarrollado empleando la transformación genética de plantas.

Aun cuando muchos anticuerpos y sus derivados se han producido en sistemas vegetales, sólo siete inmunoglobulinas farmacéuticas recombinantes derivadas de plantas han alcanzado un estatus comercial. Entre ellas, la IgA/G secretora *CaroRx*TM que es producida en plantas de tabaco transgénico mostró eficacia en el control del patógeno bucal *S. mutans*; por otro lado el anticuerpo monoclonal T84.66 y su derivado de simple cadena T84.66scFv que reconocen el antígeno carcinoembrionario (CEA), resultaron de gran utilidad en el inmunodiagnóstico *in vitro* y detección *in vivo* mediante imagenología de cánceres epiteliales (carcinoma) en humanos (32). Un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 que reconoce la glicoproteína B del virus del herpes humano 2 (HHV-2), una de las proteínas principales involucradas en la adherencia y fusión de la envoltura viral y la membrana plasmática (33, 34), fue expresada en soya transgénica. Los anticuerpos lograron prevenir la transmisión vaginal de HHV-2 en modelos murinos después de aplicación tópica (35). El anticuerpo monoclonal PIPP que reconoce la gonadotropina coriónica humana (hCG) fue producido en sus formas completa, scFv y diabody en plantas de tabaco transgénicas (36). Cada una de las formas del anticuerpo fue capaz de inhibir la producción de testosterona estimulada por hCG en cultivos celulares *in vitro*, además de bloquear el incremento de peso uterino inducido por hCG en ratas jóvenes. La IgG *Avicidin*TM que reconoce antígenos anti-EpCAM, mostró excelente actividad contra el cáncer colorectal. No obstante, esta molécula producida en maíz y primera inmunoglobulina derivada de plantas que se ha administrado a humanos, fue retirada del mercado por los fabricantes (NeoRx-Monsanto) a causa de la diarrea y a otros efectos secundarios que indujo en pacientes durante un ensayo de Fase II. Los fabricantes atribuyeron el efecto observado a la reacción cruzada entre epítopes relacionados en el epitelio intestinal.

Avances más recientes de esta tecnología incluyen la producción de anticuerpos humanizados

mediante la co-expresión en plantas transgénicas de las enzimas $\beta(1,4)$ -galactosiltransferasa y sialiltransferasa (6), incorporación del hexapéptido "SE(H/K)DEL" en el extremo C-terminal de la proteína heteróloga para su retención en el lumen del retículo endoplasmático (RE) y así evitar modificaciones post-traduccionales propias de células vegetales (4), eliminación de sitios específicos de *N*-glicosilación sobre la secuencia (NXS/T) de los anticuerpos, siempre que su actividad no se vea afectada (37, 38), además se puede implementar la inhibición de la expresión de las glicosiltransferasas involucradas en la $\beta(1,2)$ -xilosisilación y $\alpha(1,3)$ -fucosilación en plantas (39) y la producción de anticuerpos asociados con proteínas de almacenamiento para mejorar su estabilidad y acumulación como cuerpos proteicos u oleosos en compartimientos sub-celulares adecuados (40, 41).

Formas de anticuerpos recombinantes expresados en plantas

Las plantas se han utilizado para expresar muchas formas diferentes de anticuerpos, desde completamente murinos a enteramente humanizados, anticuerpos compuestos sólo por el dominio variable o aquellas formas en las que se combinan en diferentes proporciones regiones de los dominios variables o constantes de las inmunoglobulinas. La elección de la secuencia y la estructura a expresar depende básicamente de las aplicaciones terapéuticas o de inmunodiagnóstico que se esté proponiendo para la molécula. Por ejemplo, cuando la aplicación del anticuerpo requiere de una interacción ligando receptor lo más específica posible, como ocurre cuando se desean neutralizar toxinas o virus, los derivados de anticuerpos más recomendables son aquellos que carecen del dominio Fc. Por el contrario, si se desea identificar antígenos de patógenos, inhibir infecciones o inducir una respuesta inmune efectora con un mecanismo terapéutico que implique el reclutamiento de células asesinas naturales (NK) y macrófagos, se recomienda entonces expresar anticuerpos completos que induzcan un mecanismo de respuesta inmune dependiente de Fc como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Esta última forma de anticuerpo presenta una estructura típica constituida por dos polipéptidos distintos, dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, por lo que se pueden concebir dos estrategias de inserción diferentes para su expresión y ensamblaje. En la primera estrategia se realiza la inserción de un constructo de ADN individual

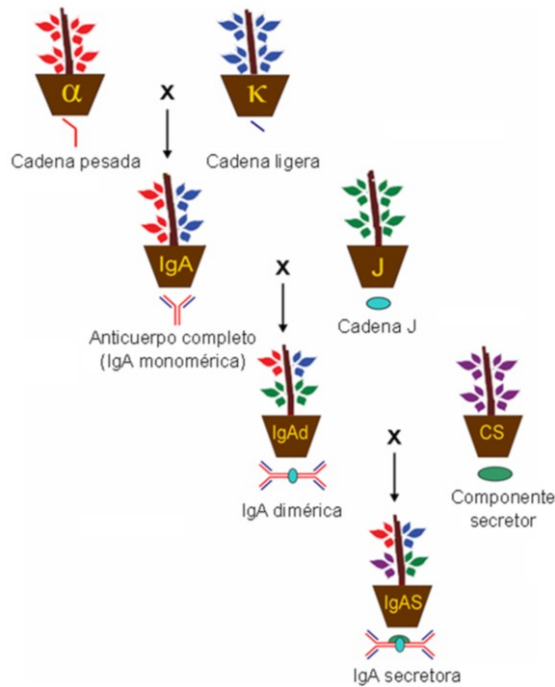


Figura 1. Representación esquemática de los cruzamientos sucesivos necesarios para producir una IgA secretora a partir de cuatro parentales transgénicos. Nótese que cada parental expresa de manera individual la secuencia codificante de las cadenas pesadas (α), ligeras (κ), la proteína de unión (cadena J) o el componente secretor (CS) y posteriormente, a través de polinización cruzada, los polipéptidos se van agrupando en parentales transgénicos híbridos (Adaptado de la referencia 42).

(usualmente un ADN-T) portando las secuencias codificantes tanto de la cadena pesada como la ligera, o bien se pueden ejecutar dos eventos de inserción independientes. Para esta última estrategia se han desarrollado dos métodos: 1) se desarrollan plantas independientes de una misma línea, cada una conteniendo un transgén (constructo para la cadena pesada o para la cadena ligera) y posteriormente se agrupan en un único parental transgénico híbrido obtenido por polinización cruzada (Figura 1), ó 2) se realiza la transformación simultánea de una misma planta con ambos constructos de ADN, pero en plásmidos diferentes (39, 42, 43).

Una variación de esta estrategia la representa la producción de los anticuerpos de cadena pesada denominados camélidos, en los cuales el componente de cadena ligera está ausente (44), por lo

que pueden ser expresados como un transgén individual. Otras formas de anticuerpos recombinantes obtenidos a partir de la inserción de secuencias parciales de las cadenas pesadas y ligeras, incluyen: fragmentos Fab, fragmentos variables de simple cadena (por su acrónimo en inglés scFv), scFv biespecíficos, minibodies, diabodies, cadenas pesadas individuales y formas más complejas de anticuerpos fusionados con proteínas, como ocurre con la IgA secretora (Figura 2), que requiere no sólo de las secuencias que codifican las cadenas pesadas y ligeras, sino también de las secuencias codificantes de la proteína de unión (cadena J) y del componente secretor (CS).

Expresión de vacunas en plantas transgénicas

La biotecnología de plantas no solamente ha permitido la producción a gran escala y económicamente factible de anticuerpos; también ha funcionado como una plataforma de fabricación de drogas importantes, vacunas y otros compuestos biofarmacéuticos de origen bacteriano, fúngico o viral, especialmente diseñados para combatir un gran número de enfermedades infecciosas en humanos y animales (Tabla 2). La variedad de agentes terapéuticos derivados de plantas también incluye productos sanguíneos como albúmina sérica humana, para la cual hay una demanda anual de 500 toneladas (3), citocinas, hormona de crecimiento humano (somatotropina), enzimas (glucocerebrosidasa y fosfatasa alcalina), aprotinina humana, α -1-antitripsina, eritropoyetina, hemoglobina humana, interleukinas (IL), interferones (IFN) (31, 45) y proteínas constituyentes del sistema del complemento (46). Recientemente, esta plataforma de expresión vegetal se ha explorado para desarrollar vacunas contra algunos antígenos de parásitos humanos como *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium vivax* y *P. falciparum* (47, 48). Por ejemplo, el antígeno-1 de membrana apical (PfAMA1) y el péptido de superficie del merozoíto (PvMSP1) de *Plasmodium* fueron expresados en plantas transgénicas de *Brassica napus* y analizados como vacunas contra la fase asexual sanguínea de este parásito (49, 50). Los resultados demostraron una inducción de IgG1 específica de antígeno e incremento de la producción de las citocinas IL-12, TNF e IFN- γ en ratones inmunizados sub-cutánea y oralmente.

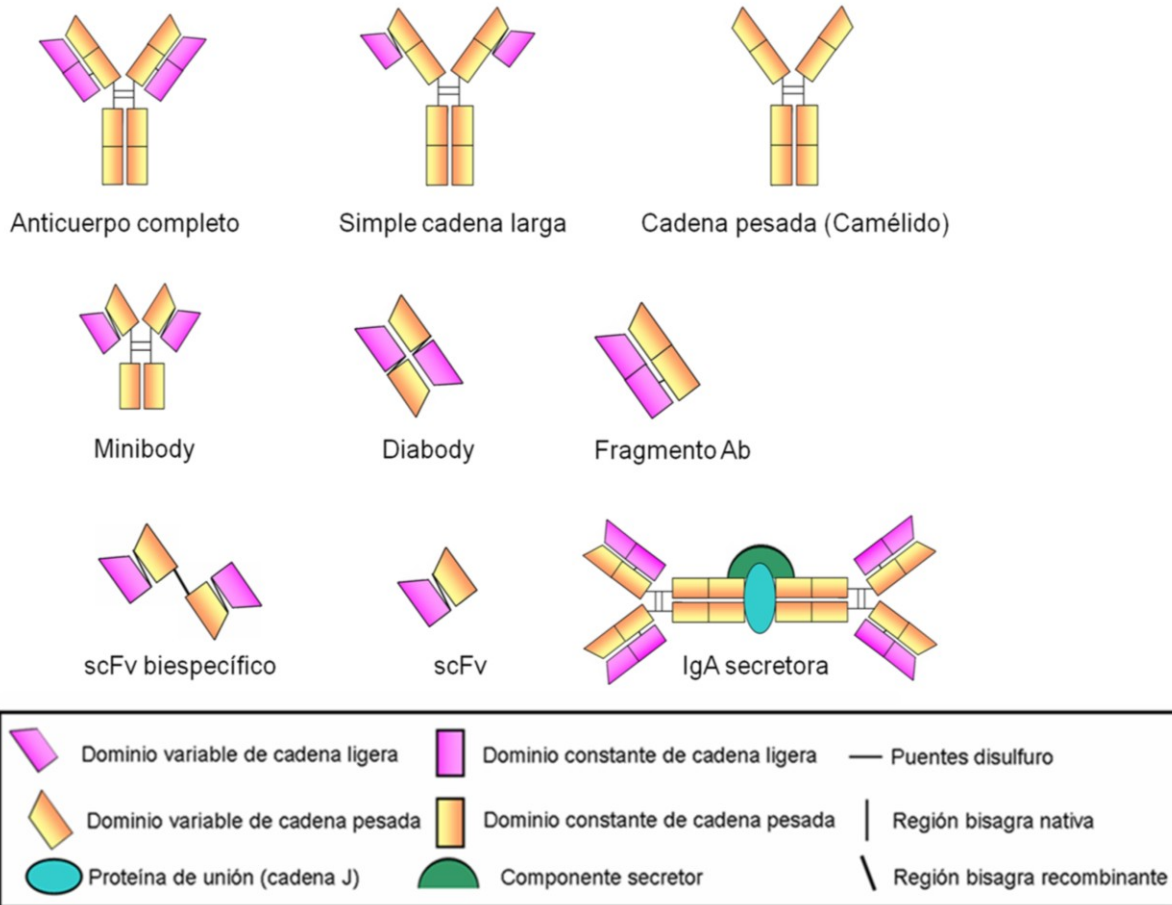


Figura 2. Formas de anticuerpos recombinantes expresados en plantas. scFv: acrónimo proveniente del inglés para designar a los fragmentos variables de simple cadena, Minibody/Diabody: convencionalmente se definen como diabody a los pequeños anticuerpos constituidos únicamente por los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras, y minibody, a los pequeños anticuerpos compuestos por dominios variables de cadenas pesadas y ligeras cuando se encuentran unidos a través de la "región bisagra" a dos dominios constantes de cadena pesada.

De igual forma esta estrategia de desarrollo de vacunas derivadas de plantas ha explotado el uso de diferentes especies vegetales como tabaco, papa, tomate, soya, alfalfa, lechuga, banana, melón, caupí, maíz y *Arabidopsis thaliana*, para la producción de antígenos de diversos patógenos causantes de enfermedades infecciosas. Dentro de ellos destacan la producción de la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza aviar subtipo H5N1 (51) y la proteína estructural E2 del virus de la diarrea viral bovina (VDVB) (52), por la capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes específicos. También se ha reportado la producción simultánea de antígenos de superficie de las proteínas S, M y L del virus de la hepatitis B (VHB) como un prototipo de vacuna oral tri-componente anti-VHB (53), la expresión de epítopes de la glicoproteína transmembranal gp41 del VIH, la

producción de las proteínas no estructurales E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH), la proteína VP2 del parvovirus canino (PVC) (54) y otro gran número de antígenos provenientes de bacterias patógenas como la proteína TcpA de *Vibrio cholerae*, la cual ha funcionado como un potente inductor de anticuerpos protectivos, y la proteína estafilokinasa que ha mostrado funcionar como un activador del plasminógeno específico de fibrina y como un factor trombolítico promisorio, especialmente ocasionando la trombólisis de coágulos ricos en trombocitos y eritrocitos (55).

Expresión de anticuerpos y vacunas en plantas utilizando vectores virales

Los vectores virales son sistemas de expresión no clásicos que utilizan la asociación entre plantas y

virus de plantas para producir proteínas farmacéuticas recombinantes. Estos sistemas híbridos, considerados modelos para la agricultura molecular, han sido ampliamente utilizados como herramientas para la producción y administración de un gran número de antígenos y anticuerpos de importancia médica (Tabla 2) (2, 7, 14- 19).

El primer intento en el desarrollo de vectores virales de plantas incluyó el uso de virus con genomas de ADN; sin embargo, la complejidad de los ciclos de replicación de esta clase de virus los hace incompatible para alcanzar altos niveles de expresión de la proteína foránea (5). Por tal motivo, la mayoría de los vectores virales emplea virus que poseen genomas de ARN bicatenario o monocatenario con polaridad positiva. En este sentido, la expresión de proteínas a través de este sistema aprovecha la fácil manipulación de los clones de ADNc de virus vegetales con genomas de ARN monocatenario (5, 17) y la capacidad que poseen los transcritos virales modificados para ser traducidos directamente en células vegetales aisladas o en plantas completas. Hasta ahora se han reportado dos sistemas básicos de expresión basados en vectores virales, el primero de ellos denominado "*sistema de expresión de polipéptidos*", a través del cual se expresa una proteína recombinante completa no fusionada que se acumula dentro de la planta (5) y el segundo conocido como "*sistema de presentación de epítopes*", en el cual el vector viral es diseñado de forma tal que un péptido antigénico corto es fusionado a la cubierta proteica del virión (Figura 3) y posteriormente es desplegado sobre la partícula del virión ensamblado (13-15). Dentro de los vectores virales más utilizados hasta el presente se encuentran aquellos basados en los virus del mosaico del caupí, virus del mosaico del pepino, virus del mosaico de la alfalfa, virus arbustivo enanizante del tomate, virus de la viruela del ciruelo, virus x de la papa, virus del mosaico del tabaco, virus de la necrosis del tabaco, virus del mosaico amarillo del calabacín, y más recientemente, el virus de la tristeza de los cítricos (Figura 4a) que infecta plantas leñosas (54, 56).

A través de este sistema se han producido péptidos terapéuticos para muchas enfermedades infecciosas ocasionadas por agentes virales, entre ellos el epítipo lineal conservado de la glicoproteína gp41 (12), epítipes del lazo V3 de la gp120 (14), la proteína auxiliar-regulatoria *Tat* (57) y las proteínas

estructurales p17 y p24 (7), todas determinantes en el establecimiento y progresión de la infección del VIH. También se han expresado la proteína de la cápside L1 del VPH-16 (58), la proteína de la envoltura E del virus dengue serotipo 2 (59), epítipes de las proteínas estructurales M2 y NP del virus de la influenza A (60) y la proteína estructural VP1 del FMDV (61). Asimismo se han logrado ensamblar mediante esta estrategia anticuerpos completos y sus derivados para tratar enfermedades crónicas como el cáncer. Algunos ejemplos de esta estrategia son el anticuerpo monoclonal CO17-1A, dirigido contra antígenos asociados a cáncer colorectal (2) y un anticuerpo idiotípico scFv desarrollado contra el linfoma folicular de células B, el cual ya ha sido evaluado en humanos con resultados muy promisorios (62).

Expresión de anticuerpos y vacunas en plantas a través de agroinfiltración

Otra estrategia que puede ser utilizada para expresar transitoriamente proteínas farmacéuticas a escala comercial es la denominada agroinfiltración o agroinyección, la cual utiliza la familia de vectores binarios construidos a partir del plásmido Ti de la bacteria patógena de plantas *A. tumefaciens* (63, 64). Este sistema consiste de dos componentes, un primer vector que contiene el ADN-T delimitado por las secuencias de los bordes derecho e izquierdo, secuencias correspondientes a múltiples sitios de clonación, un gen marcador de selección para células de plantas transformadas y un gen reportero. El segundo componente está representado por las secuencias estructurales propias del vector, en el que se ubican sitios de replicación para *A. tumefaciens* y *Escherichia coli*, genes marcadores de selección para las bacterias y un conjunto de genes denominados *vir*, codificantes de un grupo de proteínas relacionadas con la transferencia del ADN-T (17,64).

Algunas ventajas obvias de la expresión basada en *Agrobacterium* son la simplicidad del sistema y el corto tiempo requerido para expresar el gen de interés una vez que las hojas han sido agroinfiltradas. El procedimiento experimental no demanda suministros ni equipos costosos, ya que las hojas de plantas cultivadas en invernadero pueden ser infiltradas utilizando una jeringa sin aguja, infiltración por vacío o un método de agroaspersión.

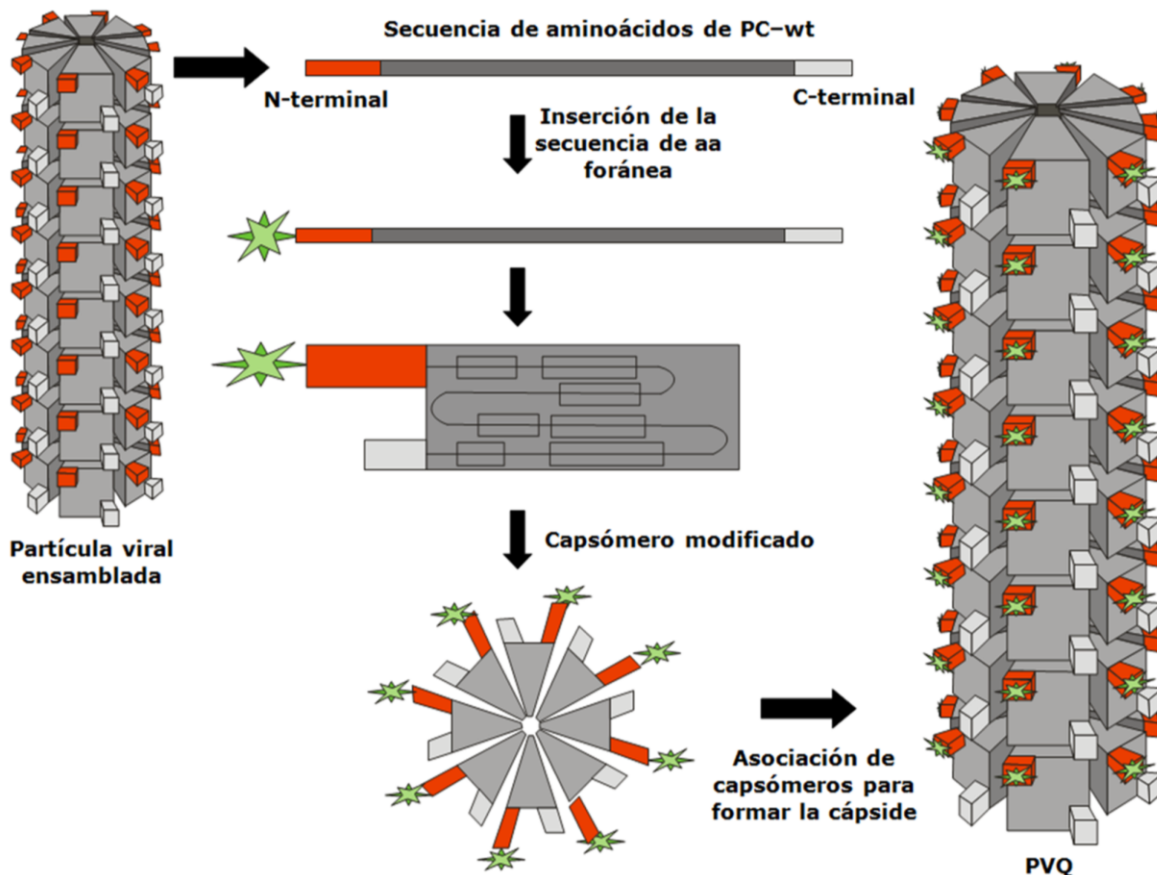


Figura 3. Sistema de presentación de epítopes basado en los vectores virales de plantas. El vector viral se diseña fusionando un péptido antigénico corto (estrella amarilla) a la cubierta proteica del virión en sus extremos N-terminal o C-terminal y posteriormente este es desplegado sobre la partícula del virus ensamblado. *PC-wt*: proteína de cápside wild type; *aa*: aminoácido; *PVQ*: Partícula viral quimérica (Adaptado de Touriño-Fenández, INIA-Madrid, no publicado).

Una variación de la estrategia de expresión transitoria basada en *A. tumefaciens* utiliza un sistema híbrido con los vectores virales. Este último sistema conocido como MagnICON™ (Icon Genetics, Halle, Germany) emplea módulos separados conformados por el genoma de un vector de expresión viral deconstruido (Figura 4b), los cuales son transferidos y ensamblados dentro de la célula vegetal utilizando la información genética y la maquinaria metabólica de *Agrobacterium* (54, 65). Los formatos de vectores virales deconstruidos que son entregados a las plantas vía agroinfección generan un replicón viral funcional y permiten expresar la proteína foránea a niveles bastante aceptables. Actualmente se encuentran disponibles versiones deconstruidas para algunos virus de ARN, entre ellos el virus del mosaico del tabaco, el virus X de la papa, el ARN-2 del virus del mosaico del caupí y el virus causante del enrollado apical de la remolacha *Curtovirus* (*Geminiviridae*). Muchas

proteínas biofarmacéuticas se han expresado a través del sistema MagnICON con un rendimiento exitoso y una autenticidad funcional y estructural similar a la de su contraparte mamífero.

Modificaciones post-traduccionales de proteínas en plantas. Relevancia biológica de las modificaciones post-traduccionales

Las proteínas requieren de un adecuado ensamblaje para preservar su conformación nativa, biológica y fisiológicamente activa. Además, los péptidos maduros requieren de señales o grupos funcionales específicos que les permitan modular la interacción proteína-proteína, proteína-ácido nucleico, determinar su actividad enzimática, papel estructural o incluso definir la localización sub-celular en la que deben ser almacenados o van a realizar su función (37, 66). En sistemas celulares eucarióticos estas características son logradas a través de una

compleja red de modificaciones post-traduccionales (MPT) que incluyen: clivaje, fosforilación, glicosilación, miristoilación, metilación, acetilación, ubiquitinización,

sumoilación y establecimiento de puentes disulfuros.

Estos sistemas de MPT de proteínas están

Tabla 2. Ejemplos de anticuerpos, antígenos y péptidos terapéuticos expresados en plantas a través de diferentes estrategias.

Anticuerpo	Isotipo	Planta hospedera	Sistema de expresión	Rendimiento de la proteína purificada	Condición contra la cual fue desarrollada	Ensayo biológico	Ref
CO17-1A	m ¹ IgG2a	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Transitoria (VV-TMV)	nd ²	Inmunoterapia dirigida contra cáncer colorectal	nr ³	2
6D4	mIgG1	<i>Nicotiana tabacum</i>	Estable (TMA)	1,3% PST, ensamblaje de 95%	Tratamiento de desórdenes asociados con el metabolismo del calcio (formación de huesos)	nr	20
PhR3	IgG1	<i>N. tabacum</i>	Estable (TMA)	0,25% PST	Terapia contra el carcinoma de células escamosas	Progresión del ciclo celular (línea celular H125), estudios de farmacocinética y biodistribución en ratas, actividad anti-tumoral en ratones	38
CarLA	scFv	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Estable (TMA)	0,25–0,9% PSTS	Inmunización pasiva para tratar enfermedad parasitaria intestinal en caprinos (nematelmintos)	Inmunofluorescencia de larvas infectivas, (estado L3) de <i>Trichostrongylus colubriformis</i>	41
H10	hIgG1λ	<i>N. tabacum</i> <i>N. benthamiana</i>	Estable (TMA) Transitoria (AGR)	0,6–1,1 mg/kg de peso fresco/ 50–100 mg/kg de peso fresco	Diagnóstico y terapia de tumores en tejido adulto experimentando neoplasia	Inmunohistoquímica de formaciones tumorosas provenientes de ratones BALB/c inoculadas con células de glioblastoma U87	76
Nef VIH-1		<i>N. tabacum</i>	Estable	0,7% PST	Tratamiento de la infección causada por VIH	nr	1
Pr55Gag p17/p24,p24		<i>N. tabacum</i>	Estable (TMA) Transitoria (AGR), (VV-TMV)	Variable según el péptido expresado y la estrategia utilizada**	Diagnóstico de la infección causada por VIH	Producción de anticuerpo específico de epítipo y análisis de IFN-γ ELISPOT a partir de ratones BALB/c inoculados	7
gp41 (7aa)		<i>N. benthamiana</i>	Transitoria (VV-PVX)	nd	Tratamiento de la infección causada por VIH	Evaluación de la actividad neutralizante de suero obtenido a partir de ratones hu-PBL-SCID (ensayo de inhibición de sincitio)	14

Tabla 2. Ejemplos de anticuerpos, antígenos y péptidos terapéuticos expresados en plantas a través de diferentes estrategias.

Continuación

Anticuerpo	Isotipo	Planta hospedera	Sistema de expresión	Rendimiento de la proteína purificada	Condición contra la cual fue desarrollada	Ensayo biológico	Ref
PvMSP-1		<i>Brassica napus</i>	Estable (TMA)	nd	Diagnóstico de <i>P. vivax</i> en estado sanguíneo y celular temprano	Producción de anticuerpos específicos de epítoto (IgG1) y de citokina IL-12, TNF- α e IFN- γ .	50
SAK		<i>Solanum tuberosum</i>	Estable (TMA)	nd	Tratamiento de miocarditis aguda	nr	55
gp120 (13aa)		<i>N. benthamiana</i>	Transitoria (VV-TBSV)	nd	Tratamiento de la infección causada por VIH	Detección de anticuerpo específico para V3 a partir de suero obtenido de pacientes VIH+ y de ratones inoculados con PVQ.	87

¹m: murino; ²nd: no determinado; ³nr: no realizado; AGR: agroinfiltración; hu-PBL-SCID: ratones con inmunodeficiencia combinada severa reconstituida con linfocitos de sangre periférica humana (acrónimo traducido al español); PST: Proteína soluble total; PSTS: PST de semillas; PVQ: partícula viral quimérica; PVX: Potato virus x; TBSV: Tomato bushy stunt virus; TMA: transformación mediada por *Agrobacterium*; TMV: Tobacco mosaic virus; VV: vector viral.

**para mayor detalle se recomienda consultar la bibliografía citada.

involucrados en actividades regulatorias celulares que modulan una extensa cantidad de procesos biológicos incluyendo síntesis y reparación de ADN, control del ciclo celular, transcripción, traducción, transducción de señales, biogénesis de organelos y control de calidad de las proteínas en el retículo endoplasmático. A diferencia de lo que ocurre en los sistemas de expresión procarióticos, en los sistemas eucarióticos vegetales las proteínas heterólogas expresadas son modificadas y ensambladas adecuadamente y acumuladas en compartimientos celulares apropiados.

La producción de polipéptidos funcionales requiere principalmente de la formación de puentes disulfuro y de glicosilación. En plantas, el retículo endoplasmático, el cual es el compartimiento subcelular que funciona como puerta de entrada a la vía secretora (67), es el lugar de mayor importancia para que ocurran estas reacciones y se produzca el ensamblaje apropiado de las proteínas (68).

La razón por la cual la vía secretora de plantas ha sido ampliamente explotada para la producción de proteínas farmacéuticas importantes, radica en la mayor estabilidad que posee la proteína heteróloga cuando es almacenada en compartimientos subcelulares donde predomina un ambiente oxidativo, pocas proteasas y baja actividad hidrolítica, características propias del RE (6, 67). Además, este compartimiento puede tolerar alta acumulación de proteínas solubles sin comprometer el funcionamiento celular (69). No obstante, aun cuando el plegamiento que puedan sufrir las proteínas en el RE ha evolucionado para favorecer su estabilidad y actividad biológica (67), la retención en el lumen del RE de polipéptidos que naturalmente residen en el citosol puede cambiar su plegamiento y tener efectos adversos sobre su funcionamiento. Esta consecuencia deriva básicamente de la diferencia existente entre los patrones de glicosilación de estos compartimientos.

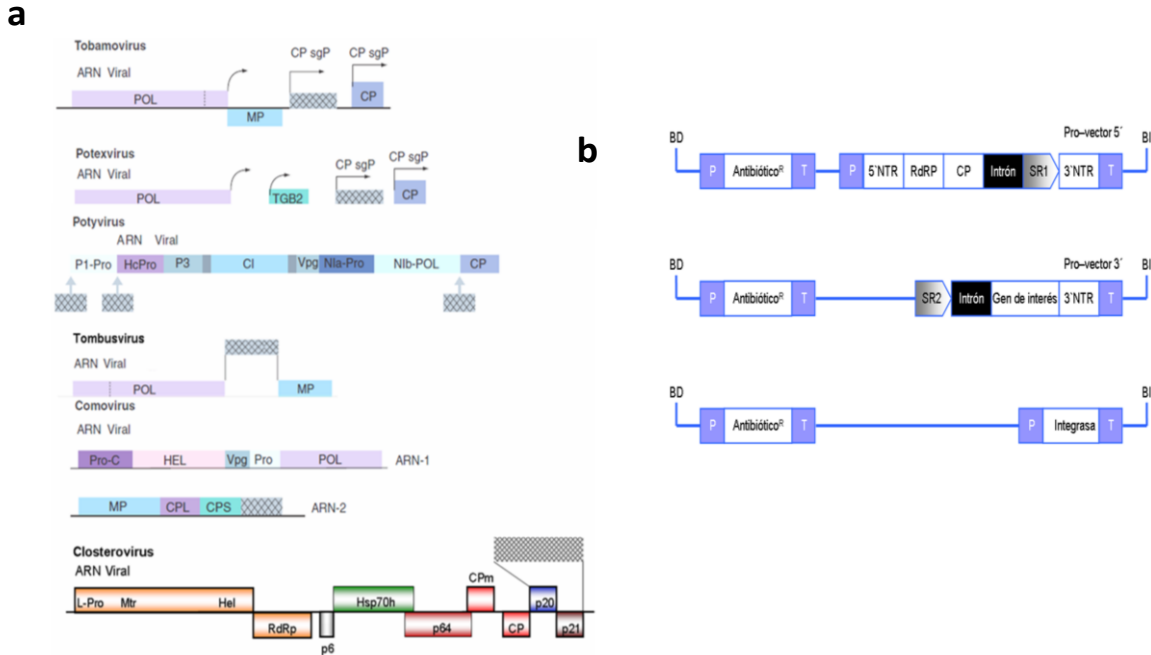


Figura 4. 4a. Organización genómica de los virus de plantas utilizados para expresar proteínas recombinantes. Las posiciones donde se insertan los genes de interés se identifican con cajas de líneas entrecruzadas. Las funciones de algunos genes se detallan a continuación. *POL/RdRp*: ARN polimerasa dependiente de ARN; *MP*: proteína de movimiento; *CP*: proteína de cápside; *sgP*: promotor sub-genómico; *TGB*: bloque triple de genes; *P1-Pro*: proteasa P1; *HcPro*: componente auxiliar de la proteasa; *CI/HEL*: helicasa; *VPg*: proteína viral de anclaje/cebadora; *Pro*: proteasa; *Pro-C*: cofactor de proteasa; *CPL*: proteína de cápside grande; *CPS*: proteína de cápside pequeña; *L-Pro*: secuencia líder de la proteasa; *Mtr*: metiltransferasa; *Hsp70h*: homólogo de proteína de choque térmico; *CPm*: proteína menor de cápside (Adaptado de las referencias 17 y 34). **4b** Representación esquemática del sistema de expresión basado en el genoma de vectores virales deconstruidos. Se muestran las regiones del ADN-T de los módulos del sistema de expresión. Cada uno de los pro-vectores porta un sitio de recombinación (SR). Cuando son co-expresados con un tercer vector codificante de una integrasa sitio específica, los dos módulos de los pro-vectores se recombinan *in vivo* para crear un genoma viral completo modificado. *P*: promotor; *T*: terminador; *NTR*: región no traducida; *RdRp*: ARN polimerasa dependiente de ARN; *CP*: proteína de cápside; *BD*: borde derecho; *BI*: borde izquierdo (Adaptado de la referencia 85).

Diversos trabajos han mostrado especial interés acerca de la divergencia en los pasos de glicosilación que ocurren en el Golgi medio y *trans* entre células de plantas y mamíferos (6, 70). Aun cuando el patrón de glicosilación que ocurre en residuos específicos de asparaginas (NXS/T) durante su paso por el lumen del RE y el Golgi *cis* es bastante conservado entre estos dos tipos celulares (39), el uso en humanos de muchas glicoproteínas de importancia terapéutica derivadas de plantas ha tenido aplicaciones limitadas. La desventaja principal de esta clase de proteínas recombinantes está asociado con el tipo de *N*-glicanos propios de células vegetales [$\beta(1,2)$ -xilosa y $\alpha(1,3)$ -fucosa] que son añadidos a la estructura de las proteínas durante su desplazamiento por los compartimientos del Golgi medio y *trans* (figura 5). Esto se debe básicamente a que los residuos de xilosil y fucosil sobre los complejos *N*-glicanos de

plantas han demostrado ser el epítipo clave responsable de la alergenicidad en humanos de este tipo de glicoproteínas (71).

Aunque estas diferencias hasta ahora no han mostrado afectar la actividad biológica de las proteínas recombinantes, otras propiedades físico-químicas tales como plegamiento, estabilidad, solubilidad, susceptibilidad a proteasas, farmacocinética, tasa de eliminación sistémica (*CL*) y antigenicidad, pueden ser profundamente afectadas (37,70, 71). Contrariamente, y a pesar de las diferencias significativas de la *O*-glicosilación entre plantas y animales, la ingeniería genética vegetal ha estado enfocada en estrategias que utilizan deliberadamente los *O*-glicanos específicos de plantas sobre péptidos recombinantes (37). Este tipo de modificación consiste en la adición de oligosacáridos al oxígeno del grupo hidroxilo sobre

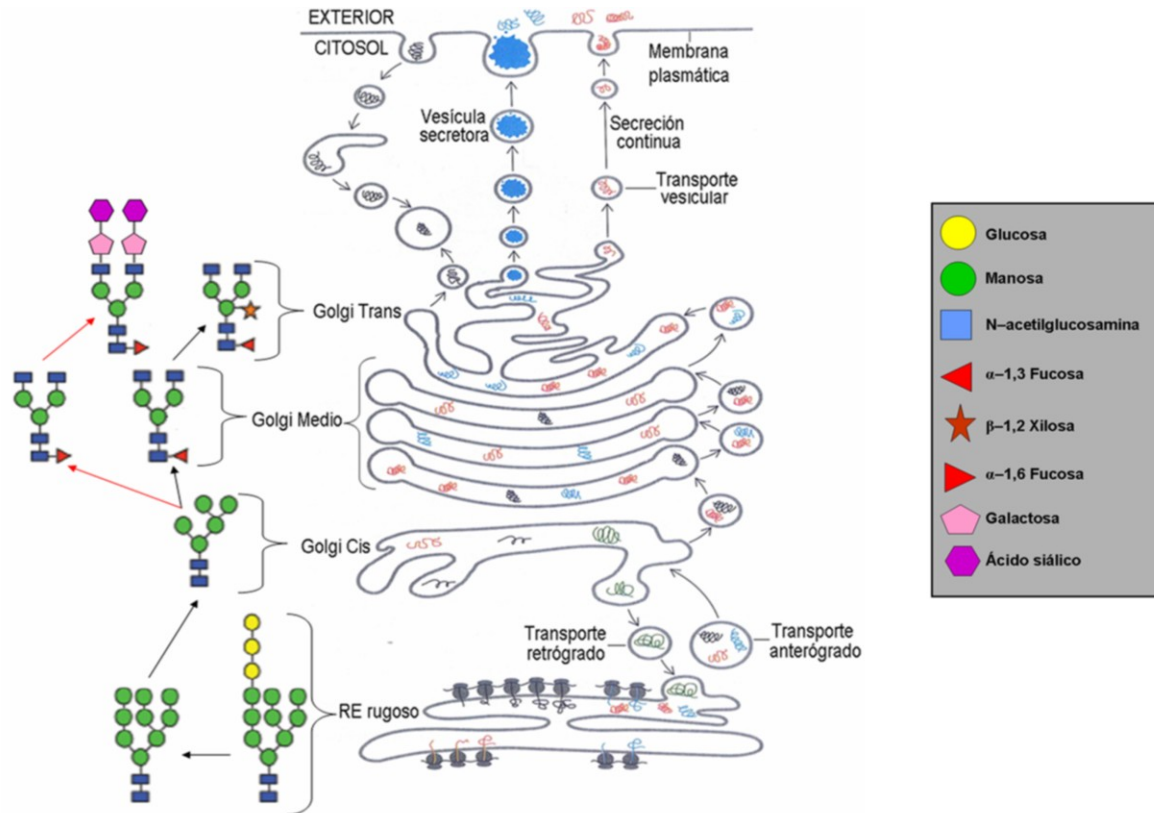


Figura 5. Patrón de glicosilación de proteínas en plantas y animales. Las proteínas recombinantes expresadas en plantas experimentan la adición de N-glicanos propios de células vegetales [α (1,3)-fucosa y β (1,2)-xilosa], los cuales son añadidos a su estructura durante el desplazamiento por los compartimientos del Golgi medio y *trans*. Nótese que las modificaciones post-traduccionales entre ambos tipos de células son iguales hasta el Golgi *cis*. La ruta de glicosilación en células animales se indica con flechas rojas. Los polipéptidos destinados a permanecer en el lumen del retículo endoplasmático (RE) son marcados con la secuencia del tetrapéptido señal KDEL antes de ser exportados por primera vez desde el RE hacia el Golgi *cis* (transporte anterógrado), lo cual permite que estos péptidos sean recuperados y devueltos al RE a través del transporte retrógrado (Adaptado de las referencias 75 y 86).

la cadena lateral de los aminoácidos serina, treonina, hidroxilisina o hidroxiprolina, y su empleo se debe al amplio rango de características estructurales y funcionales que estos conjugados son capaces de afectar. En este sentido, diversos trabajos han propuesto que la *O*-glicosilación puede aumentar la estabilidad, el rendimiento y el comportamiento fármaco-cinético de muchas proteínas que tienen un tiempo de vida media muy corto (72-74).

Algunas estrategias para evitar la formación de glicanos inmunogénicos de plantas, incluyen: retención de la glicoproteína recombinante en el lumen del RE para prevenir las glicosilaciones tardías específicas de células vegetales, humanización de la maquinaria de glicosilación a través de la expresión de las enzimas β (1,4)-galactosiltransferasa y sialiltransferasa (6), silenciamiento de la expresión de las glicosiltransferasas propias de plantas a través del

uso de ARN interferente (75) y expresión de dominios o epítopos no glicosilados de las proteínas de interés.

Esta estrategia de expresión de proteínas heterólogas glicosiladas en plantas se ha utilizado para producir mediante agroinfiltración anticuerpos monoclonales completos contra antígenos tumorales (76) y contra antígenos asociados a cáncer colorectal, estos últimos producidos empleando el sistema de vectores de virus de plantas (2). De igual forma se ha utilizado el sistema de vectores virales para expresar en plantas algunos dominios del lazo V3 de la proteína estructural de membrana gp120 del VIH-1 (13), la cual está altamente glicosilada (33).

Adicionalmente, se ha reportado la ocurrencia en plantas de otros tipos de modificaciones post-traduccionales que incluyen sulfatación de residuos de tirosinas, hidroxilación de prolina y lisinas,

arabinosilación de hidroxiprolinas e hidroxilisinas y lipidación (37, 77). Este grupo de modificaciones, que hasta la fecha no se han reportado por interferir en el plegamiento y estabilidad de proteínas heterólogas, son comunes en péptidos secretados que cumplen funciones de señalización en diversos aspectos de la biología de la planta como el crecimiento, la diferenciación y la defensa.

Péptidos señal en la modificación post-traduccional de proteínas recombinantes

En muchos casos cuando se requiere que las proteínas heterólogas sean retenidas en el lumen del RE se añade a su extremo C-terminal la secuencia del hexapéptido "SE(H/K)DEL" (4) o la secuencia de la prolamina "γ-zein" del maíz, la cual permite formar cuerpos proteicos y acumularlos en altas cantidades en este compartimiento celular (67). Una estrategia alternativa desarrollada para moléculas que requieren del ambiente citosólico, consiste en anclar los polipéptidos a la cara citosólica del RE utilizando una isoforma del citocromo *b5* de mamífero. Por el contrario, si la proteína foránea debe ser redirigida a algún compartimiento sub-celular específico donde sólo ocurre la formación de puentes disulfuro (6), como sucede en el apoplasto (29), la vacuola (78) o los cloroplastos, se fusiona al extremo N-terminal de la proteína de interés la secuencia de algún péptido señal como el de la proteína PR1 del tabaco (1), la secuencia de la disulfuro isomerasa de la alfalfa (4), la proteína de almacenamiento vacuolar phaseolin de las leguminosas (78) o el péptido de tránsito plastidial "TPSS" de la sub-unidad pequeña de la enzima plastidial Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO) (79). Otros péptidos frecuentemente utilizados en la compartimentalización de las proteínas recombinantes son la esporamina de la papa, la quitinasa de *A. thaliana* y la secuencia de la α-amilasa de los cereales, la cual mejora la acumulación y la estabilidad de los polipéptidos en las semillas (43).

Eficacia inmunológica de vacunas, anticuerpos y antígenos derivados de plantas

Todas las proteínas farmacéuticas recombinantes producidas a través de la agricultura molecular de plantas, para las cuales se pretenda una aplicación potencial en inmunoterapia y/o inmunodiagnóstico, deben presentar algunas características básicas. Dentro de estos requisitos se encuentran: alto rendimiento de la proteína

heteróloga, fácil administración de los antígenos expresados (bien sea purificados o como extracto foliar crudo), producción de un polipéptido farmacológicamente activo con capacidad para inducir una respuesta inmunitaria celular y/o humoral efectiva, alta especificidad para tratar la condición contra la cual fue desarrollada y baja toxicidad comparada con las drogas existentes en el mercado.

En términos generales, los anticuerpos expresados en plantas han mostrado una actividad biológica similar a la de su contraparte mamífero; por ejemplo, se han desarrollado diferentes plantibodies con la capacidad de interactuar específicamente con antígenos asociados a trastornos neoplásicos (76), interrumpir la cascada de transducción de señales propias de afecciones cancerígenas (2, 38) o inducir un mecanismo de respuesta inmune basado en CCDa (80). Asimismo, se han expresado diferentes formatos de anticuerpos que han permitido contrarrestar patógenos causantes de enfermedades infecciosas como el VIH (30, 81, 82), VHB (83), VHC, virus del herpes simplex (35), distintos tipos de influenza virus y el virus causante de la rabia (84).

Igualmente ha sido posible inducir la producción de anticuerpos neutralizantes contra la proteína estructural gp41 del VIH (14), la hemaglutinina del virus de la influenza aviar (51) y la proteína estructural E2 del virus causante de la diarrea viral bovina (52). También se lograron desarrollar anticuerpos idiotípicos personalizados (específicos de pacientes) contra enfermedades crónicas como el linfoma no Hodgkin (62). La administración de esta última vacuna permitió que los pacientes en estudio desarrollaran un mecanismo de respuesta inmune celular y humoral, así como una respuesta específica de antígeno. Otros mecanismos de repuestas observados en modelos murinos, a partir de la inoculación de proteínas recombinantes derivadas de plantas, han sido la producción incrementada de las citokinas IL-12, TNF e IFN-γ (50) y la amplificación de la respuesta inmune dependiente de células T, esta última inducida por las proteínas estructurales p17/p24 del VIH (7).

Perspectivas

En los últimos años los avances de la ingeniería genética y de otras herramientas moleculares han permitido la producción a bajo costo y a gran escala de muchas proteínas recombinantes

derivadas de plantas. Aun cuando los sistemas vegetales son considerados seguros para la expresión de péptidos heterólogos, debido a la incapacidad que poseen de replicar virus humanos; la ausencia de la maquinaria de MPT propia de células animales ha limitado la utilización de ciertos péptidos de importancia médica. Sin embargo, el número de vacunas, antígenos y anticuerpos derivados de plantas ha incrementado en la última década. Esto ha sido posible gracias al entendimiento de la función biológica que ejercen los glicanos de origen vegetal en la actividad, estabilidad, solubilidad e inmunogenicidad de los péptidos recombinantes. De esta manera se espera que en un futuro próximo se desarrollen mayor número de plantas que expresen de manera estable o

transitoria péptidos con buena tolerancia oral, ensamblados apropiadamente, sin riesgos de efectos secundarios y con una alta eficacia para controlar las principales enfermedades que nos afectan a nivel mundial.

Agradecimientos

Este artículo forma parte de un proyecto de investigación acerca de la expresión en sistemas vegetales de la proteína auxiliar Nef del VIH-1, financiado por el Fondo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (FONACIT), proyecto PEI N° 2012001279.

Referencias

1. Marusic C, Nuttall J, Buriani G, Lico Ch, Lombardi R, Baschieri S, Benvenuto E, Frigerio L. Expression, intracellular targeting and purification of HIV Nef variants in tobacco cells. *Biomed Central Biotechnol* 2007;7:1–12. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Verch T, Yusibov V, Koprowski H. Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. *J Immunol Methods* 1998;220:69–75. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Ma JKC, Drake PMW, Christou P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* 2003;4:794–805. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Badri M, Rivard D, Coenen K, Michaud D. Unintended molecular interactions in transgenic plants expressing clinically useful proteins: The case of bovine aprotinin traveling the potato leaf cell secretory pathway. *Proteomics* 2009;9:746–56. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Cañizares MC, Nicholson L, Lomonosoff GP. Use of viral vector for vaccine production in plants. *Immunol Cell Biol* 2005; 83:263–70. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Ko K, Koprowski H. Plant biopharming of monoclonal antibodies. *Virus Res* 2005; 111:93–100. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
7. Meyers A, Chakauya E, Shephard E, Tanzer FL, Maclean J, Lynch A, Williamson AL, Rybicki EP. Expression of HIV-1 antigens in plants as potential subunit vaccines. *Biomed Central Biotechnol* 2008;8:53–67. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
8. Gómez E, Zoth SC, Berstein A. Plant-based vaccine for potential human application: a review. *Hum Vaccin* 2009;5:738–44. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Hefferon KL. The mucosal immune response to plant-derived vaccine. *Pharm Res* 2010;27:2040–2. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
10. Rybicki EP. Plant-made vaccine for human and animals. *Plant Biotechnol* 2010;8:620–37. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
11. O'Brien GJ, Bryant CJ, Charlotte V, Greenberg HB, Gardner RC, Bellamy AR. Rotavirus VP6 expressed by PVX vectors in *Nicotiana benthamiana* coats PVX rods and also assembles into virus like particules. *Virology* 2000;270:444–53. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
12. Koprowski H, Yusibov V. The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine* 2001;19:2735–41. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
13. Yusibov V, Modelska A, Steplewski K, Agadjanyan M, Weiner D, Hooper DC, Koprowski H. Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies viruses and HIV-1. *PNAS* 1997;94:5784–88. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
14. Marusic C, Rizza P, Lattanzi L, Mancini C, Spada M, Belardelli F, Benvenuto E, Capone I. Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* 2001;75:8434–39. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
15. Donini M, Lico Ch, Baschieri S, Conti S, Magliani W, Polonelli L, Benvenuto E. Production of an engineered killer peptide in *Nicotiana benthamiana* by using a Potato Virus X expression system. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:6360–7. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
16. Vitti A, Piazzolla G, Condelli V, Nuzzaci M, Lanorte MT, Boscia D, De Stradis A, Antonaci S, Piazzolla P, Tortorella C. Cucumber mosaic virus as the expression system for a potential vaccine against Alzheimer's disease. *J Virol Methods* 2010;169:332–40. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
17. Komarova TV, Baschieri S, Donini M, Marusic C, Benvenuto E, Dorokhov YL. Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals. *Expert Rev Vaccines* 2010;9:859–76. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
18. Zhou B, Zhang Y, Wang X, Dong J, Wang B, Han C, Yu J, Li D. Oral administration of plant-based rotavirus VP6 induces antigen-specific IgAs, IgGs and passive

- protection mice. Vaccine 2010;28:6021–7. [PubMed] [Google Scholar]
19. Uhde–Holzem K, Schlösser V, Viazov S, Fischer R, Commandeur U. Immunogenic properties of chimeric potato virus X particles displaying the hepatitis C virus hypervariable region I peptide R9. J Virol Methods 2010;166:12–20. [PubMed] [Google Scholar]
 20. Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K. Production of antibodies in transgenic plants. Nature 1989;342:76–8. [PubMed] [Google Scholar]
 21. Agrenvec. Molecular farming: Fully active, recombinant proteins and clean antibodies for any R & D need [internet]. 2013 [cited 2013 Jan 16]. Available at: <http://agrenvec.com>.
 22. Pharma–Planta, EU–funded project manufactures plant–derived anti–HIV antibody safe for humans [internet]. 2013 [cited 2013 Jan 16]. Available at: http://pharma-planta.org/resources_documents/PP_exec_2008.pdf
 23. Planet Bitechology, Secretary IgA monoclonal antibodies from plants [internet]. 2013 [cited 2013 Jan 18]. Available at: <http://planetbitechology.com/index.html>
 24. Meristem therapeutics, Production of therapeutic recombinant protein in corn and tobacco [internet]. 2013 [cited 2013 Jan 18]. Available at: <http://bioportfolio.com/corporate/company/27952/Meristem-Therapeutics-Llc.html>
 25. Synthon, LEX SystemSM: a technological platforms based on the cultures of Lemna minor (duckweed) to development of pharmaceutical proteins [internet]. 2013 [cited 2013 Feb 15]. Available at: <http://synthon.com/en/nieuwsarchieff/synthon-acquires-lex-systemsm-from-bioalex-therapeutics.aspx>
 26. McCormick AA, Kumagai MH, Hanley K, Turpen TH, Hakim I, Grill LK, Tusé D, Levy S, Levy R. Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor–derived single–chain Fv epitopes in tobacco plants. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:703–8. [PubMed] [Google Scholar]
 27. Giddings G, Allison G, Brooks D, Carter A. Transgenic plants as factory for biopharmaceuticals. Nat Biotechnol 2000;18:1151–55. [PubMed] [Google Scholar]
 28. Düring K, Hippe S, Kreuzaler F, Schell J. Synthesis and self–assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic Nicotiana tabacum. Plant Mol Biol 1990; 15:281–93. [PubMed] [Google Scholar]
 29. Ma JKC, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, van Dolleweerd C, Mostov K, Lehner T. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. Science 1995;268:716–9. [PubMed] [Google Scholar]
 30. Floss DM, Sack M, Stadimann J, Rademacher T, Scheller J, Stöger E, Fischer R, Conrad U. Biochemical and functional characterization of anti–HIV antibody–ELP fusion proteins from transgenic plant. Plant Biotechnol J 2008;6:379–91. [PubMed] [Google Scholar]
 31. Goldstein D, Thomas J. Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. QJM 2004;97:705–16. [PubMed] [Google Scholar]
 32. Perrin Y, Vaquero C, Gerrard I, Sack M, Drossard J, Stöger E, Christou P, Fischer R. Transgenic pea seeds as bioreactors for the production of a single–chain Fv fragment (scFv) antibody used in cancer diagnosis and therapy. Mol Breeding 2000;6:345–52. [Google Scholar]
 33. Carter JB, Saunders VA. Virology: Principles and Applications. UK: John Wiley & Sons Ltd, 2007.
 34. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus taxonomy, eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, California: Elsevier Academic Press. 2005.
 35. Zeitlin L, Olmsted SS, Moench TR, Co MS, Martinell BJ, Paradkar VM, Russell DR, Queen C, Con RA, Whaley KJ. A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. Nature Biotechnol 1998;16:1361–4. [PubMed] [Google Scholar]
 36. Kathuria S, Sriraman R, Nath R, Sack M, Pal R, Artsaenko O, Talwar GP, Fischer R, Finnern R. Efficacy of plant–produced recombinant antibodies against HCG. Hum Reprod 2002;17:2054–61. [PubMed] [Google Scholar]
 37. Webster DE, Thomas MC. Post–translational modification of plant–made foreign proteins; glycosylation and beyond. Biotechnol Adv 2012;30:410–418. [PubMed] [Google Scholar]
 38. Rodríguez M, Pérez L, Gavilondo J, Garrido G, Beuqte–Romero m, Hernández I, Huerta V, Cabrera G, Pérez O, Leyva R, León M, Ramos P, Triguero A, Hernández A, Sánchez B, Ayala M, Soto J, González E, Mendoz O, tiel K, Pujol M. Comparative *in vitro* and experimental *in vivo* studies of the anti–epidermal growth factor receptor antibody nimotuzumab and its aglycosylated form produced in transgenic tobacco plants. Plant Biotechnol J 2013;11:53–65. [PubMed] [Google Scholar]
 39. Ko K, Brodzik R, Steplewski Z. Production of antibodies in plants: approaches and perspectives. Curr Top Microbiol Immunol 2009;332:55–78. [PubMed] [Google Scholar]
 40. de Virgilio M, De Marchis F, Bellucci M, Mainieri D, Rossi M, Benvenuto E, Arcioni S, Vitale A. The human immunodeficiency virus antigen Nef forms protein bodies in leaves of transgenic tobacco when fused to zeolin. J Exp Bot 2008;59:2815–29. [PubMed] [Google Scholar]
 41. Winichayakul S, Pernthaner A, Livingston S, Cookson R, Scott R, Roberto N. Production of active single–chain antibodies in seeds using trimeric polyoleosin fusión. J Biotechnol 2012;161:407–13. [PubMed] [Google Scholar]
 42. Wycoff KL. Secretary IgA antibodies from plants. Curr Pharm Design 2004;10:1–9. [PubMed] [Google Scholar]
 43. De Muynck B, Navarre C, Boutry M. Production of antibodies in plants: status after twenty years. Plant Biotechnol J 2010;8:529–63. [PubMed] [Google Scholar]

44. Herrera A. Las inmunoglobulinas G de los camélidos y sus aplicaciones. *Sirivs* 2011;1:2–8. [[Google Scholar](#)]
45. Matveeva NA, Kudriavets I, Likhova AA, Shakhovskii AM, Bezdenezhnykh NA, Kvasko Elu. Antiviral activity of extracts of transgenic chicory and lettuce plants with the human interferon alpha-2b gene. *Tsitol Genet* 2012;46:28–35. [[PubMed](#)]
46. Nausch H, Mischofsky H, Koslowski R, Meyer U, Broer I, Huckauf J. Expression and subcellular targeting of human complement factor C5a in *Nicotiana* species. *PLOS ONE* 2012;7:1–13. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
47. Clemente M, Corigliano MG. Overview of plant-made vaccine antigens against malaria. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012:206918 [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
48. Kumar CS, Deepesh G, Mahavir Y, Archana T. Edible vaccine: a new platform for the development of malaria vaccine. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2012;22:243–8. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
49. Davoodi-Semiromi A, Schreiber M, Nalapalli S, Dheeraj V, Singh ND, Banks RK, Chakrabarti D, Daniell H. Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery. *Plant Biotechnol J* 2010;8:223–42. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
50. Lee C, Kim HH, Choi KM, Chung KW, Choi YK, Jang MJ, Kim TS, Chung NJ, Rhie HG, Lee HS, Shon Y, Kim H, Lee SJ, Lee HW. Murine immune responses to a *Plasmodium vivax*-derived chimeric recombinant protein expressed in *Brassica napus*. *Malaria J* 2011;10:1–8. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
51. Phan HT, Pohl J, Floss DM, Rabenstein F, Veits J, Le BT, Chu HH, Hause G, Mettenleiter T, Conrad U. ELPylated haemagglutinins produced in tobacco plants induce potentially neutralizing antibodies against H5N1 viruses in mice. *Plant Biotechnol J* 2013; DOI 10.1111/pbi.121049. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
52. Aguirreburualde MS, Gómez MC, Ostachuk A, Wolman F, Albanesi G, Pecora A, Odeon A, Ardila F, Escribano JM Santos MJ, Wigdorovitz A. Efficacy of a BVDV subunit vaccine produced in alfalfa transgenic plants. *Vet Immunol Immunopathol* 2013;151:315–24. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
53. Pniewski T, Kapusta J, Bociąg P, Kostrzak A, Fedorowicz–Strońska O, Czyż M, Gdula M, Krajewski P, Wolko B, Plucienniczak A. Plant expression, lyophilisation and storage of HBV medium and large surface antigens for a prototype oral vaccine formulation. *Plant Cell Rep* 2012;31:585–95. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
54. Lico Ch, Santi L, Twyman RM, Pezzotti M, Avesani L. The use of plants for the production of therapeutic human peptides. *Plant Cell Rep* 2012; 31:439–51. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
55. Gerszberg A, Wiktoket–Smagur A, Hnatuszko–Konka K, Luchniak P, Kononowicz AK. Expression of recombinant staphylokinase, a fibrin-specific plasminogen activator of bacterial origin, in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. *World J Microbiol Biotechnol* 2012;28:1115–23. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
56. Folimonov A, Folimonova S, Bar–Joseph M, Dawson W. A stable RNA virus-based or citrus trees. *Virology* 2007;368:205–16. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
57. Karasev AV, Foulke S, Wellens C, Rich A, Shon KJ, Zwierzynski I, Hone D, Koprowski H, Reitz M. Plant based HIV–1 vaccine candidate: Tat protein produced in spinach. *Vaccine* 2005;23:1875–80. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
58. Varsani A, Williamson AL, Stewart D, Rybicki EP. Transient expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in *Nicotiana benthamiana* using an infectious tobamovirus vector. *Virus Res* 2006;120:91–6. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
59. Saejung W, Fujiyama K, Takasaki T, Ito M, Hori K, Malasit P, Watanabe Y, Kurane I, Seki T. Production of dengue 2 envelope domain III in plant using TMV-based vector system. *Vaccine* 2007;25:6646–54. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
60. Meshcheriakova IuA, El`darov MA, Migunov AI, Stepanova LA, Repko IA, Kiselev OI, Lomonosov DP, Skriabin KG. Cowpea mosaic virus chimeric particles bearing ectodomain of matrix protein 2 (M2E) of the influenza A virus: production and characteristics. *Mol Biol* 2009;43:741–50. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
61. Zhang Y, Li J, Pu H, Zhang X, Chen M, Wang B, Han C, Yu J, Li D. Development of Tobacco necrosis virus A as a vector for efficient and stable expression of FMDV VP1 peptides. *Plant Biotechnol J* 2010;8:506–23. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
62. McCormick AA, Reddy S, Reinl SJ, Cameron TI, Czerwinski DK, Voidani F, Hanley KM, Garer SJ, White EL, Novak J, Barrett J, Holtz RB, Tuse D. Plant-produced idiotype vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: Safety and immunogenicity in a phase I clinical study. *PNAS* 2008;105:10131–6. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
63. Hooykaas PJJ, Schilperoort RA. Agrobacterium and plant genetic engineering. *Plant Mol Biol* 1992;19:15–38. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
64. Valderrama Fonseca AM, Isaza RA, Kafuri LA. Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: “Ingeniería genética natural aplicada”. *Rev Fac Nal Agr Medellín* 2005;58:2569–85. [[Google Scholar](#)]
65. Hefferon KL. Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceuticals proteins. *Virology* 2012;433:1–6. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
66. Albert JR, Beuzón–López CR, Bejarano ER, Proteasas de SUMO como proteínas de virulencia de bacterias fitopatógenas [internet]. 2012 [cited 2012 Feb 27]. Available at: http://www.genetica.uma.es/detalle_slineas.php?linea=36
67. Marusic C, Vitale A, Pedrazzini E, Donini M, Frigerio L, Block R, Dix Ph, McCabe M, Bellucci M, Benvenuto E. Plant-based strategies aimed at

- expressing HIV antigens and neutralizing antibodies at high levels. Nef as a case study. *Transgenic Res* 2009; 18:499–512. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
68. Heleinus A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 2001;291:2364–9. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
69. Wandelt C, Khan M, Craig S, Schroeder H, Spencer D, Higgins T. Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high level in the leaves of transgenic plants. *Plant J* 1992;2:181–92. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
70. Hellwig S, Drossard J, Twyman R, Fischer R. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat Biotechnol* 2004;22:1415–22. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
71. Doran PM. Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr Opin Biotechnol* 2000;11:199–204. [[PubMed](#)]
72. Xu J, Tan L, Goodrum KJ, Kieliszewski MJ. High-yields and extended serum half-life of human interferon $\alpha 2b$ expressed in tobacco cells as arabinogalactan-protein fusions. *Biotechnol Bioeng* 2007;97:997–1008. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
73. Xu J, Lampport DT, Showalter AM, Kieliszewski MJ. The O-Hyp glycosylation code in tobacco and Arabidopsis and a proposed role of Hyp-glycans in secretion. *Phytochemistry* 2008;69:1631–40. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
74. Tan L, Varnai P, Lampport DT, Yuan C, Xu J, Qiu F, Kieliszewski MJ. Plant O-hydroxyproline arabinogalactans are composed of repeating trigalactosyl subunits with short bifurcated side chains. *J Biol Chem* 2010;285:24575–83. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
75. Beck A, Reichert JM. Marketing approval of mogamulizumab: a triumph for glyco-engineering. *mAbs* 2012;4:1-7. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]-
76. Villani ME, Morgun B, Brunetti P, Marusic C, Lombardi R, Pisoni I, Bacci C, Desiderio A, Benvenuto E, Donini M. Plant pharming of a full-sized, tumour-targeting antibody using different expression strategies. *Plant Biotechnol J* 2008 DOI 10.1111/j.1467-7652.2008.00371.x. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
77. Matsubayashi Y. Small post-translationally modified peptide signals in Arabidopsis. *Am Soc Plant Biologists* 2011; DOI 10.1199/tab.0150. [[PubMed](#)]
78. Mainieri D, Rossi M, Archinti M, Bellucci M, De Marchis F, Vavassori S, Pompa A, Arcioni S, Vitale A. Zeolin a new recombinant storage protein constructed using maize γ -zein and bean phaseolin. *Plant Physiol* 2004;136:3447–56. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
79. Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol* 2000;18:1167–71. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
80. Brodzik R, Glogowska M, Bandurska K, Okulicz M, Deka D, Ko K, van der Linden J, Leusen JH, Pogrebnyak N, Golovkin M, Steplewski Z, Koprowski H. Plant-derived anti-Lewis Y mAb exhibits biological activities for efficient immunotherapy against human cancer cells. *PNAS* 2006;103:8804–9. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
81. Sack M, Paetz A, Kunert R, Bomble M, Hesse F, Stiegler G, Fischer R, Katinger H, Stoeger E, Rademacher T. Functional analysis of the broadly neutralizing human anti-HIV-1 antibody 2F5 produced in transgenic BY-2 suspension cultures. *FASEB J* 2007;21:1655–64. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
82. Rademacher T, Sack M, Arcalis E, Stadlmann J, Balzer S, Altmann F, Quendler H, Stiegler G, Kunert R, Fischer R, Stoeger E. Recombinant antibody 2G12 produced in maize endosperm efficiently neutralizes HIV-1 and contains predominantly single-GlcNAc N-glycans. *Plant Biotechnol J* 2008;6:189–201. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
83. Ramírez N, Rodríguez M, Ayala M, Cremata J, Pérez M, Martínez A, Linares M, Hevia Y, Páez R, Valdés R, Gavilondo JV, Selman-Housein G. Expression and characterization of an anti-(hepatitis B surface antigen) glycosylated mouse antibody in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants and its use in the immunopurification of its target antigen. *Biotechnol Appl Biochem* 2003;38:223-30. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
84. Girard LS, Fabis MJ, Bastin M, Courtois D, Pétiard V, Koprowski H. Expression of a human anti-rabies virus monoclonal antibody in tobacco cell culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345:602–7. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
85. Garabagi F, McLean MD, Hall JC. *Antibody engineering: methods and protocols*, 2nd Ed. Springer Sc, 2012.
86. Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipurski SL, Matsudaira P, Darnell J. *Molecular Cell Biology*, 3rd Ed. New York: Scientific American Books, 1996.
87. Joelson T, Åkerblom L, Oxelfelt P, Strandberg B, Tomenius K, Morris TJ. Presentation of a foreign peptide on the surface of tomato bushy stunt virus. *J Gen Virol* 1997; 78:1213–17. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
88. Avesani L, Marconi G, Morandini F, Albertini E, Bruschetta M, Bortesi L, Pezzoti M, Porceddu A. Stability of Potato virus X expression vectors is related to insert size: implications for replication models and risk assessment. *Transgenic Res* 2007;16:587–97. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

Como citar este artículo: Noguera A, Fermín G, Plataformas de expresión en plantas de péptidos humanos terapéuticos: expresión transitoria y estable. *Avan Biomed* 2013; 2: 137-53.