



Koronavirüs ile Mücadelede Alternatif Bir Yaklaşım: Bitki Bazlı Yenilebilir Covid-19 Aşısı

Ömer ÇAKMAK^{1, a}
Mehmet ÇALICIOĞLU^{2, b}

¹ Esenyurt Üniversitesi,
Uygulamalı Bilimler
Yüksekokulu,
Gastronomi ve Mutfak
Sanatları Bölümü,
İstanbul, TÜRKİYE

² Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Besin Hijyeni ve Teknolojisi
Ana Bilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0002-7898-1764

^b ORCID: 0000-0002-6658-784X

Geliş Tarihi : 20.06.2022
Kabul Tarihi : 18.11.2022

Yazışma Adresi Correspondence

Ömer ÇAKMAK
Esenyurt Üniversitesi,
Uygulamalı Bilimler
Yüksekokulu,
Gastronomi ve Mutfak
Sanatları Bölümü
İstanbul – TÜRKİYE

omercakmak@esenyurt.edu.tr

Son yıllarda dünyada EBOLA, SARS CoV-1, MERS gibi patojenik yeni viral suşların ortaya çıkması, özellikle de son örnek olarak yeni koronavirüs suşu Covid-19 ile küresel pandemi tehdidine neden olmuştur. Bu salgın ile mücadelede ilaçların ve aşılarda hızla geliştirilmesi önem kazanmıştır. Aşılarda, vücudun bağışıklık sistemini antijeni tanıması amacıyla uyarıcı ajanlardır. Son dönemlerde, geleneksel aşılardan kaynaklanan riski azaltabilecek yeni bir aşı formu tanıtıldı. Bu aşılarda, genetiği değiştirilmiş bitkilerden üretilen yenilebilir aşılardır. Bitkisel esaslı aşılarda, klinik düzeydeki adaylar için umut verici sonuçlar sağladığından Covid-19'a karşı mücadelede de etkili olabileceği ihtimali olan bir teknolojidir. Enjekte edilebilir aşılarda, yüksek oranda protein verimlerini sunan ve İyi Ürün Üretimi (GMP) süreçleri altında Virüs Benzeri Partiküller (VLP) aşılarda ve diğer biyofarmasötikler endüstriyel olarak kabul görmüş olan geçici ekspresyon sistemleri kullanılarak üretilmektedir. Ayrıca, bu yaklaşım ile bitki hücresi, antijen taşıyıcı ajan olarak hareket edebileceğinden oral aşılarda geliştirme imkanı sunmaktadır. Yenilebilir aşılarda üretiminde, gen kodlayan bakteriyel veya viral hastalığa neden olan ajan, immünojenik özelliğini kaybetmeden bitkilere dahil edilebilmektedir. Yenilebilir aşılarda ana etki mekanizması, hastalığa neden olan yabancı bir organizmaya karşı sistemik ve mukozal bağışıklık tepkilerini aktive etmektir. Yenilebilir aşılarda, seçilen bitki hücresine transgen eklenerek üretilmektedir. Günümüzde veterinerlik ve tıp alanında yenilebilir aşılarda geliştirilmektedir. Toplum, yenilebilir aşılarda kullanım ve faydaları hakkında bilinçlendirilmelidir. Yenilebilir aşılarda, geleneksel aşılarda karşılaştırıldığında; uygun maliyetli, verimli ve güvenlidir. Hastalıklardan daha iyi bir şekilde korunma için gelecek vaat etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bitki biyoteknolojisi, Covid-19, genetiği değiştirilmiş bitkiler, yenilebilir aşı

An Alternative Approach to Fight Coronavirus: Plant-Based Edible Covid-19 Vaccine

In recent years, the emergence of pathogenic new viral strains such as EBOLA, SARS CoV-1, MERS in the world have caused a global pandemic threat, especially with the new coronavirus strain Covid-19 as the last example. Rapid development of drugs and vaccines has gained importance in the fight against this epidemic. Vaccines are agents that stimulate the body's immune system to recognize the antigen. Recently, a new vaccine form has been introduced that can reduce the risk from conventional vaccines. This type of vaccine is an edible vaccine produced from genetically modified plants. Herbal-based vaccines are a technology that may also be effective in the fight against Covid-19, as it provides promising results for clinical-level candidates. Injectable vaccines can be produced using transient expression systems that offer high protein yields and are industrially accepted as Virus-Like Particles (VLP) vaccines and other biopharmaceuticals under Good Product Manufacturing (GMP) processes. In addition, this approach offers the opportunity to develop oral vaccines as the plant cell can act as an antigen carrier agent. In the production of edible vaccines, the gene encoding bacterial or viral disease-causing agent can be incorporated into plants without losing its immunogenicity. The main mechanism of action of edible vaccines is to activate systemic and mucosal immune responses against a disease-causing foreign organism. Edible vaccines can be produced by introducing the transgene into the selected plant cell. Currently, edible vaccines are being developed in the veterinary and medical field. The society should be aware of the use and benefits of edible vaccines. Compared to other traditional vaccines, edible vaccines are cost-effective, efficient and safe. They are promise for better prevention from diseases.

Key Words: Plant biotechnology, Covid-19, genetically modified plants, edible vaccine

Giriş

Koronavirüsler (CoV'ler), pozitif anlamda, tek sarmallı genomik RNA'ya sahip zarflı virüslerdir ve dört cinse ayrılır: α -CoV'ler, β -CoV'ler, γ -CoV'ler ve δ -CoV'ler (1). Memelileri etkileyenler α - ve β -CoV'ler iken, diğer iki cins ise kuşları ve memelileri enfekte etmektedirler (2). Çin Halk Cumhuriyeti'nin Wuhan kentinde, Aralık 2019'da nedeni bilinmeyen bir dizi pnömöni hastasından koronavirüsün teşhis edilmesi son zamanlarda ortaya çıkan küresel salgın bakımından endişe vericidir. Salgın, canlı egzotik hayvanların satışının yapıldığı Wuhan Toptan Deniz Ürünleri Pazarı'ndaki işçilerle ilişkilendirilmiştir (3). Hastalık etkeni, 2002-2003 yılları arasında görülen ve şiddetli akut solunum sendromu (SARS) salgınından sorumlu olan SARS-CoV-1'e benzerliği (genomik olarak % 70) göz önüne alındığında SARS-CoV-2 olarak adlandırılmıştır. Bu yeni koronavirüs türünün resmi ve kabul edilen adı, koronavirüs

bulaşıcı hastalık 2019'un kısaltması olan Covid-19 virüsüdür (1).

Günümüzde, Covid-19 için spesifik bir tedavi yoktur. En umut verici olarak önceden bilinen hidrosiklorokin ve Remdesivir ilaçlarının etkinliğini belirlemede klinik çalışmalar yapılmıştır (4). Ayrıca, SARS-CoV-2 enfeksiyonu geçirmiş ve iyileşen bireylerden alınan plazma (nötralize edici antikorlar içeren) kullanılarak yapılan transfüzyon çalışmaları sonucunda olumlu bulguların elde edildiği bildirilmiştir (5).

Bununla birlikte aşılama, bulaşıcı hastalıkların kontrol edilmesi ve ortadan kaldırılması için en etkili yaklaşım olmaktadır. Aşılar, konakçının hastalığa yakalanmadan önce, etkene karşı bağışıklık oluşmasını sağlayan biyolojik maddelerdir. Hastalığa neden olan patojen etkenin zayıflatılmış veya inaktif hale getirilmiş şekillerini ya da patojenin, bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını sağlayan proteinleri içermektedirler. SARS-CoV-2 yüksek bulaşıcılığa sahip olduğundan bu etkene karşı mücadelede aşıların geliştirilmesi acil bir hedeftir. Aşı üretiminin basit yolu, daha önce kimyasal veya fiziksel olarak etkisiz hale getirilmiş SARS-CoV-2 viryonları ile formüle edilebilen etkisizleştirilmiş aşı teknolojisidir. Canlı zayıflatılmış virüs temelli aşı üretimi bir diğer olası yaklaşımdır (6). SARS-CoV-1 ve MERS-CoV için inaktif edilmiş aşı adaylarında, virüs nötralizasyonuna yol açan güçlü hümmoral tepkiler ortaya çıkmıştır. Örneğin, influenza virüsü, SARS-CoV-2 antijenlerini açığa çıkarmak ve solunum yolu hastalıklarına neden olan ilgili etkeni hedef alan bivalent aşının oluşturulmasında yapısal iskelet olarak kullanılmaktadır (7). Benzer şekilde, adenoviral vektörler de bu alanda uygulanabilmektedir (8). Virüslere karşı geliştirilen tüm aşılar, güvenilirliklerinin yanı sıra viral enfeksiyonun antikora bağlı olarak artması, reaktöjenite ve suşun patojenik formlara dönüşmesi ile ilgili endişelerleri de beraberinde getirmektedir (9).

CoV'ların konak hücreye girişi, CoV spike proteinlerinin reseptör tanıma ve membran füzyon fonksiyonları aracılığıyla gerçekleşmektedir. Aşının birincil amacı CoV spike proteinlerini nötralize eden antikorlar oluşturmaktır. Sitotoksik T-lenfosit (CTL) yanıtları da viral enfeksiyonlara karşı korumada anahtar rol oynamaktadır (10). Bu ilkeler çerçevesinde, Covid-19'a karşı aşı geliştirme çalışmaları başlatılmıştır. Yapılan çalışmalar arasında CureVac (11, 12) tarafından tam uzunlukta, prefüzyonla stabilize edilmiş bir "S" proteinini kodlayan mRNA'yı taşıyan lipid nanopartikül (LNP: Lipid nonoparticle) ile formüle edilmiş RNA bazlı aşıların geliştirilmesi yer almaktadır (13). Shenzhen Geno-Immune Medical Institute tarafından geliştirilen diğer bir aşı adayı da viral antijenleri eksprese etmenin bir yolu olarak transdüksiyon yoluyla yapay antijen hücrelerinin üretilmesi ve sonuç olarak da T hücrelerinin aktive edilmesi amacıyla bağışıklık modülatör gen temeline dayanan multiepitopik bir aşıdan oluşmaktadır (14). Covid-19'a karşı aşı geliştirilmesinde SARS-CoV-1 virüsü ile benzerlikler, değerli bir referans teşkil etmektedir. Ancak ikiden fazla varyant tanımlandığı için SARS-CoV-1'in genetik değişkenliğinin daha yüksek

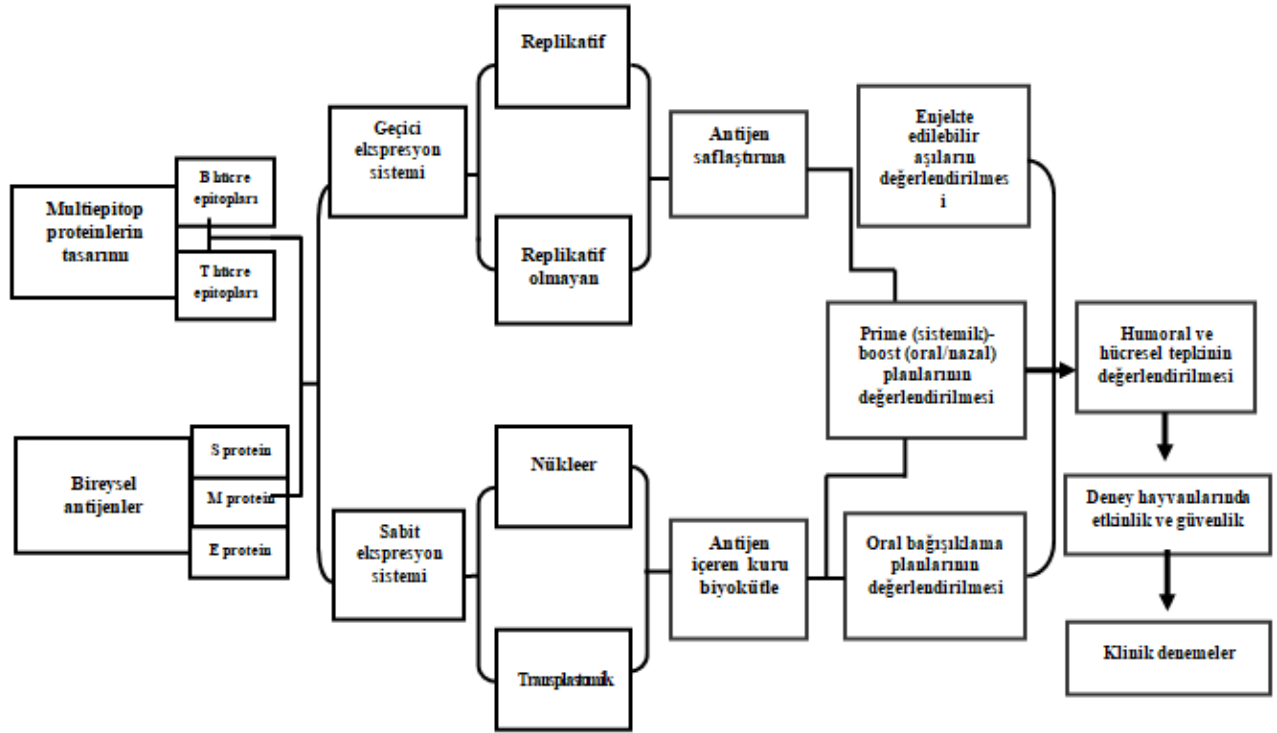
olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Bazı SARS-CoV-1'in nötralize edici antikorlarının, SARS-CoV-2 ile çapraz reaksiyona girmesi konusunda kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır. SARS-CoV-1 ve SARS-CoV-2 arasında tanımlanan epitoplara aşı geliştirme için önerilmiştir (15).

Covid-19 hakkındaki temel bilgiler, aşı tasarımının iyileştirilmesi çalışmalarında faydalı olmaktadır. Örneğin, Walls ve ark. (16), aşıların ve viral giriş blokerlerinin tasarımında kritik öneme sahip olacak ektodomain trimerinin kriyo-EM yapılarını bildirmişlerdir. Ayrıca, SARS-CoV-1'e karşı murin poliklonal antikorları kullanarak SARS-CoV-2'nin konak hücrelere girişinin güçlü şekilde inhibe edildiğine dair kanıtlar da bulunmuştur. Bu virüsler arasında korunmuş "S" epitoplarının bağışıklama için uygun olabileceği ve belki de önceden var olan bağışıklama modellerinin Covid-19 ile mücadelede faydalı olacağı değerlendirilmektedir. Aşı tasarımındaki bu gelişmelere paralel olarak hızlı ve büyük ölçekli üretime uygun aşı platformlarının tanımlanması gerekmektedir. Özellikle de gelişmekte olan ülkelerde geniş kapsamlı aşılama kampanyalarının uygulanmasında güvenli, düşük maliyet, kolay dağıtım ve teslimat olması gereken nitelikler arasında yer almaktadır. Aşılar çoğunlukla enjeksiyonla insan ve hayvanlara verilse de ağız ya da burundan spreyle şeklinde uygulanan aşılar da bulunmaktadır. İnaktif veya zayıflatılmış özellikteki aşıların maliyetli olması, uygulama sırasında ve soğuk muhafaza koşullarında karşılaşılan zorluklar, insanların tamamına ulaşımının gerçekleşmemesi gibi çeşitli dezavantajları vardır. Bu nedenle 1990'lı yılların başında genetik alanda yapılan çalışmalardan biri olan transgenik gen teknolojisi ile bitkilerden daha ucuz maliyetli, her kesimden insana kolay ulaştırılabilen ve ısıya dayanıklı yenilebilir aşı formu geliştirilmiştir (17).

Bitki Bazlı Yenilebilir Aşılar

Son dönemlerde bitkiler, ekzojen proteinlerin uygun şekilde çoğaltmasını kolaylaştıran ve ekonomik olarak uygulanan yeni biyofarmasötik sistemlerin tasarlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (18, 19).

Geleneksel aşıların dezavantajlarına karşı son zamanlarda yenilebilir ürünlerin geliştirilmesi alanında araştırmalar yapılmıştır. Yenilebilir aşı üretiminde bitkilerin kullanılmasının çeşitli faydaları görülmüştür. Bunlardan ilki, biyofarmasötik endüstrisinde bitki aşıları daha düşük üretim maliyetlerine ve ölçeklendirilmeye sahiptirler (20, 21). Bununla birlikte, biyomolekül üretiminden farklı olarak yenilebilir aşı formülasyonları uygulama öncesi herhangi bir tedavi veya saflaştırma gerektirmediğinden üretim maliyetinin düşmesine neden olmaktadır. Bu konuda yapılan araştırmaların çoğunda kültür patatesi kullanılmıştır. Ancak pişirme veya kaynatma işlemi antijenik proteinlerin çoğunun etkisinin zayıflamasına neden olabileceğinden, yenilebilir aşı üretiminde patates kullanımının iyi bir tercih olmadığı belirtilmiştir (22). Buna karşın, başarılı genetik dönüşüm yöntemlerinin tasarımı ve geliştirilmesi ile domates, mısır, tütün, muz, havuç ve yer fıstığı gibi bitkiler



Şekil 1. Bitki bazlı aşuların gelişiminde izlenecek akış şeması (17)

yenilebilir aşı üretiminde önem kazanmışlardır. Bugüne kadar, marul, domates, patates, papaya, havuç, kinoa ve tütün gibi yenilebilir çok sayıda bitki türü aşı antijenlerine dönüştürülmüştür (23).

Son zamanlarda, domuz gribi, kuduz ve hepatit B'ye karşı bazı bitkisel kökenli aşılarda klinik araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalarda en umut verici sonuçlar influenza aşularında tespit edilmiştir (24, 25). Bu aşuların, insan ve fare hücrelerinde yapılan in-vitro testler sonucunda güvenilir ve bağışıklık oluşturma özelliklerinin pozitif olduğu değerlendirilmiştir (26). Bununla birlikte, düşük maliyetli aşı geliştirmenin nihai hedefinin saflaştırma gerektirmeden ve jelatin hapları veya tabletleri içinde dondurularak kurutulmuş özellikte oral formülasyonların üretilmesi olduğu belirtilmiştir (27). Bu oral aşular, enjekte edilebilir aşuların uygulamasında ortaya çıkan ağrı gibi dezavantajların ve invaziv dağılım yolu ile ilişkili risklerin önlenmesinde de etkili olabilmektedir (28). Başlangıçta, beklenenden daha yavaş olduğu kabul edilmekle birlikte bitki bazlı oral aşuların geliştirilmesi bir gerçeklik kazanmıştır (27, 29). Bitki bazlı aşuların geliştirilmesinde uygulanan olası yöntemler Şekil 1'de gösterilmiştir (17).

Yenilebilir Aşuların Üretim Yöntemleri

Yenilebilir aşular, seçilen bitki hücresine transgenin dahil edilmesiyle üretilmektedir. Transgenin entegrasyonu, vektörle doğrudan veya dolaylı gen transferi yöntemiyle gerçekleştirilmeden yapılabilmektedir.

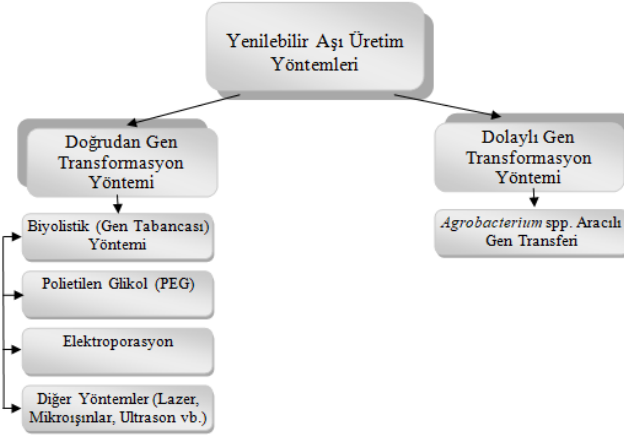
Yenilebilir aşı üretim yöntemleri Şekil 2'de gösterilmiştir. Transgen, antijenin hücrelerle birleşmesi gereken yere bağlı kararlı transformasyon ve geçici transformasyon olmak üzere iki sistem ile bitkilerde eksprese edilebilmektedir (30).

Doğrudan Gen Transformasyon Yöntemi:

Doğrudan gen transformasyonu basit yöntemdir. Bu yöntemde seçilen DNA veya RNA doğrudan bitki hücresine verilir. En yaygın kullanılan doğrudan gen transferi yöntemi biyolistik yöntemdir. Gen tabancası veya mikro mermi bombardmanı yöntemi olarak da bilinmektedir. Agrobacterium türlerinin aracılık ettiği gen transferinin mümkün olmadığı durumlarda kullanılmaktadır (31, 32). Bu transformasyon yönteminde DNA veya RNA, mikro taşıyıcı görevi gören altın veya tungsten ile kaplanır. Daha sonra kaplanmış DNA gen tabancasına yerleştirilir ve yüksek basınç altında helyum gazına maruz bırakılmaktadır. Kaplanmış DNA, yüksek basınç etkisiyle hareket ederek hedeflenen bitki hücresine yerleşmektedir. Ancak bu yöntem yüksek maliyetlidir (33, 34). Nükleer transformasyon ve kloroplast transformasyonu, biyolistik yöntemle yapılabilmektedir. Bunlar, iki tip antijen ekspresyon yöntemidir (35). Homolog olmayan genin rekombinasyon yoluyla bitki hücresinin çekirdeğine dahil edilmesi nükleer transformasyon olarak tanımlanmaktadır. Protein ekspresyonunu artırmak için genin kloroplasta enjekte edilmesine ise kloroplast transformasyonu adı verilmektedir. Yenilebilir aşı üretiminde en yaygın

kullanılan yöntem kloroplast transformasyonudur (36, 37). Biyolistik yöntemler ile; kolera, Lyme hastalığı, şarbon, tetanoz, veba, rota virüsü ve köpek parvovirüsüne karşı aşı üretilmektedir (38).

Dolaylı Gen Transformasyon Yöntemi: Bu yöntemde vektör aracılığı ile bir gen transferi söz konusudur. Yöntemde, istenen bitki hücrelerine ilgili proteinin üretilmesi için bakteriler veya viral etkenler bulaştırılmaktadır (39).



Şekil 2. Yenilebilir aşı üretim yöntemleri (30)

Yenilebilir Aşı Modeli Olarak Kullanılan Başlıca Bitki Türleri

Patates: Bu ürün, tetanoz, difteri, hepatit B ve Norwalk virüsüne karşı yenilebilir aşı üretiminde uygun bir numunedir. *Escherichia coli* suşlarının neden olduğu enterite karşı patatesten yenilebilir aşı geliştirilmesine yönelik ilk denemeler yapılmıştır (40). Ayrıca, vizon enterit virüsüne karşı patatesten yenilebilir bir aşı da geliştirilmiştir. Patatesten yenilebilir aşı üretiminin temel faydası, dönüştürme ve çoğaltma kolaylığına sahip olmasıdır. Depolama için buzdolabına ihtiyaç yoktur. Başlıca dezavantajlardan biri pişirilmesi antijenlerin denatüre olmasına yol açmaktadır (41).

Pirinç: Yenilebilir aşuların geliştirilmesinde kullanılan bir diğer bitki türüdür. Pirinç, diğer bitkilere göre bebek mamasında ve yüksek antijen ekspresyonunda yaygın olarak kullanılmıştır. Ancak yavaş büyür ve sera koşuluna ihtiyaç duyulmaktadır. 2007 yılında, *Oryza sativa* adlı transgenik pirinçte yapılan bir araştırmada *E. coli*'ye karşı önemli miktarda antikor oluşmuştur. HBsAg'nin pirinç tohumlarındaki fonksiyonel ifadesi 2008'de onaylanmıştır. Pirinç bitkisinden geliştirilen aşuların halk sağlığı üzerinde etkili olacağı belirtilmektedir (41, 42).

Muz: Yaygın olarak yenilebilir aşı üretiminde kullanılan bitki türüdür. Pişirmeye ihtiyaç duymamaktadır. Pişirildikten sonra proteinlerin yok edilmediği belirtilmiştir. Yaprakları antijen içermektedir. Başlıca dezavantajı, meyve vermesinin 2-3 yıl sürmesi ve meyvesinin olgunlaştıktan sonra hızla bozulmasıdır (43).

Domates: Koronavirüsün neden olduğu akut solunum yolu sendromu (SARS)'na karşı etkili ilk aşı, domates kullanılarak yapılmıştır. Norwalk virüsüne karşı patatesten üretilen aşılardan daha iyi etki göstermektedir. Domatesin yaprakları, gövde, meyve ve diğer dokuları *Vibrio cholera B* toksininden CT-B proteinlerini eksprese etme yeteneğine sahiptir (44). Ayrıca HBsAg'yi eksprese etmek için de domatesler kullanılmıştır. Bu bitkiden beta-amiloid proteinlerinin ekspresyonu ile Alzheimer hastalığına karşı etkili bir aşı geliştirilmiştir. Ayrıca domatesten pnömoni, septisemi ve bubonik (hiyarcıklı) veba aşularının da geliştirildiği bildirilmiştir. Hızlı büyüme ve geniş çapta yetiştirilebilme özelliğine sahip bitkidir. Domates, bileşiminde yer alan yüksek A vitamini ile bağışıklık tepkisini artırabilmektedir. Ancak, çabuk bozulabilme özelliğine sahip bitkilerdir (44, 45).

Marul: Bu bitki hem hayvanlar hem de insanlarda *E. coli*'nin neden olduğu enterik hastalıklara karşı etkili olan model bir bitkidir. Evcil ve yaban domuzların en bulaşıcı viral hastalıkları arasında yer alan Domuz virüsü olarak da bilinen Klasik Domuz Veba Virüsü (Classical Swine Fever Virus)'ne karşı glikoprotein E2 eksprese edilmiş marul geliştirilmiştir. Bu bitki başlıca taze olarak tüketilir ve hepatit B virüsüne karşı faydalı etkilere neden olmaktadır. Yenilebilir aşı olarak kullanılabilir son derece etkili bitkidir (46).

Tütün: Yenilebilir bir bitki olmamasına rağmen yenilebilir aşuların geliştirilmesinde örnek olarak kullanılmaktadır. Gastroenterite neden olan Norwalk virüsü için 1996 yılında tütünden bir aşı geliştirilmiştir. Transgenik tütün, tavuk bulaşıcı anemisine karşı VP1 proteinini eksprese etme yeteneğine sahiptir. Ayrıca tütün, hepatit B ile ilgili bir polipeptidi eksprese etmektedir. Koksidiyoza karşı aşı geliştirilmesinde de kullanılmaktadır (47).

Havuç: Sadece sağlığa yararlı ve lezzetli değil, aynı zamanda yenilebilir aşı formları olarak da kullanılabilen bir bitkidir. HIV, *E. coli*, *Helicobacter pylori*'ye karşı aşular, transgenik havuçlarda üretildiğinde potansiyel etkileri görülmektedir. Bağışıklık sistemi zayıf olan kişilerde, bu tip antijen içeren yenilebilir havuç aşısının fayda sağlamayacağı belirtilmektedir (48).

Covid-19'a Karşı Bitki Bazlı Aşı Geliştirme İmkanları

Geleneksel aşulara göre yenilebilir aşı geliştirilmesi yönteminin avantajları olmasına rağmen COVID-19'a neden olan SARS-CoV-2'ye karşı alternatif yenilebilir aşı üretim yöntemi çok az araştırılmıştır. Son yıllarda COVID-19 sorununun çözümü amacıyla aşı niteliğindeki virüs proteinlerinin domateslerde üretilmesine odaklanılmıştır. Nitekim biyoinformatik yöntemler kullanılarak bağışıklık tepkisinin oluşması için en uygun aşı adayları antijenler tespit edilmiştir. Bu işlem, patojen etkenin genom yapısının bilgisayarda analizi ile gerçekleştirilmektedir. Daha sonra domatesin nükleotit dizilimi ve *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi tarafından gerçekleştirilen transformasyonu en uygun hale getirilmektedir. Domates bitkilerinden yeni epitoplardan ekspresyonu sonucunda çok sayıda

rekombinant proteini elde edilmektedir. SARS'a neden olan SARS-CoV-1, COVID-19'a sebep olan SARS-CoV-2 virüsü ile % 70 genomik benzerlik göstermektedir. Ancak geliştirilen transgenik domatesin deneysel olarak farelere verilerek SARS-CoV-1'e karşı yüksek değerlerde antijen üretiminin kaydedildiği klinik çalışmalara devam edilmemiştir. Günümüzde SARS-CoV-1 virüsü ile olan benzerlik durumu rehber alınarak SARS-CoV-2'nin genomik ve proteomik dizilimi kullanılarak bağışıklık cevabını oluşturacak en iyi antijenlerin elde edilmesi için biyoinformatik yöntemlerden yararlanılan analiz yapma süreci devam etmektedir (17).

Virüs Benzeri Parçacıklar (VLP'ler): Aşı tasarımı için öne çıkan bir yaklaşım, virüslere benzeyen, ancak genomları olmayan makromoleküler kompleksler olan virüs benzeri parçacıkların (VLP'ler) kullanımı temeline dayanmaktadır. Bu yöntemde, VLP'ler virüslerin doğal yapısına benzer ancak onlar kadar enfektif değildirler. Atenüe veya inaktif virüslerle formüle edilen, reaktogenite ve patojenik formlara dönüşen aşuların dezavantajları önlenmektedir (49). İnfluenza virüsü, insan papilloma virüsü, insan immün yetmezlik virüsü, şap hastalığı virüsü, Norwalk virüsü, rift vadisi ateşi virüsü ve hepatit B virüsünün neden olduğu vakalara karşı VLP'lerin üretimi konusunda çok sayıda araştırma bulunmaktadır (50, 51).

VLP'lerin oluşumuna yol açan rekombinant sistemlerde ifade edilen SARS-CoV-1 ve MERS antijenlerin benzerleri Covid-19 aşısının geliştirilmesi yönünde önemli rehber oluşturmaktadır. Mortola ve Roy (2004) tarafından SARS-Cov için "S" (Spike), "E" (Zarf), "M" (Membran) ve "N" (Nükleokapsid) yapısal proteinlerini esas alan bakulovirüs/böcek hücreleri ekspresyonu (Sf 9 hücreleri) uygulayan koronavirüs VLP'leri üretilmiştir (52). 2007 yılında, ilk kez SARS-CoV-1 VLP'lerin immünojenitesi, M, E ve S proteinlerine dayalı böcek hücresi yapımı VLP'ler değerlendirilerek tanımlanmıştır. Enfekte böcek hücrelerindeki VLP oluşumu elektron mikroskop ile gözlemlenmiştir. Freund adjuvanı ile emülsiyon haline getirilen dört deri altı VLP'nin kullanıldığı aşılamaya programına alınan farelerde SARS CoV'a karşı yüksek antikor titreleri tespit edilmiştir (53).

Zarflı virüslerin VLP'lerinin bitkilerde Hemaglutinin (HA) proteinini başarılı bir şekilde eksprese etmesi dikkate alındığında, S proteinini de eksprese ederek SARS-CoV-2 VLP'lerinin birleştirilmesi mümkün olabilmektedir (54). Bu amaçla, VLP'lerin glikosilasyon ve salgılama mekanizması ile üretimin yapılması amacıyla trans-Golgi salgılanmasını hedefleyen nükleer ekspresyonun bir proteine ihtiyacı olduğu bildirilmiştir (55). Bu nedenle, COVID-19'a karşı bitki bazlı aşuların geliştirilmesi sürecinde bu çalışmaların kabul edilmesi faydalı olmaktadır. SARS-CoV-2 virüsüne benzeyen VLP'lerin yanı sıra, olası diğer bir yaklaşım SARS-CoV-2 epitoplarını kabul ederek kimerik VLP'lerde tanımlamaktadır. Bu durumda ilişkili olmayan bir virüsten alınan VLP, mevcut hedef SARS-CoV-2 epitoplarının yapısal iskeleti olarak görev yapabilmektedir (56).

Multiepitopik Aşular: Koruyucu bağışıklık tepkilerini indükleyen epitoplar seçilerek sağlam ve potansiyel bir rasyonel aşı modeline sahip özellikte multiepitopik aşular geliştirilmiştir. Özellikle rasyonel aşı tasarımında sadece immün koruma yönünden değil, aynı zamanda güvenliği bakımından da tekrarlama çalışmaları oldukça önemli olmaktadır (57).

Viral hastalığa karşı multiepitopik aşuların geliştirilmesinde önemli faktör, genetik değişkenliktir. Hatta, SARS-CoV 2 virüsünün iki ana tipi olan L ve S'ye dönüştüğü ileri sürülmüştür. L tipi (~%70), S tipine (~%30) karşı baskın ve S tipinden daha agresiftir. Tang ve ark. (58), salgın ortaya çıktıktan hemen sonra insana bulaşmasının engellenmesi ile L ve S tiplerinin prevalansının etkilendiğini bildirmişlerdir (59).

İmmün Kompleksleri: Bitkilerde immün komplekslerin (İK'ler) üretimi, yüksek oranda immünojenik ajanlar oluşturan başka bir yaklaşımdır. İK'ler, antijen sunan hücreler tarafından verimli bir şekilde yakalanan ve işlenen makromoleküler varlıkları oluşturan, onları tanıyan antikolarla kompleks haline getirilmiş antijenlerden oluşmaktadır (60). Protein sentezi ve işlenmesi için bitki hücrelerinden yararlanarak, antikor ve İK fabrikaları olarak kullanılmışlardır (61). Örneğin, bir monoklonal antikora kaynaştırılan tetanoz toksini fragmanı C'ye dayalı İK'ler, transgenik tütün bitkilerinde üretilmiştir (62). Bu yaklaşımın başlıca dezavantajı, henüz SARS-CoV-2 için mevcut olmayan antijeni hedefleyen tanımlanmış antikora olan ihtiyaçtır. Bununla birlikte, anti-SARS-CoV-1 S protein antikolarının SARS-CoV-2 karşılık çapraz reaktivitesi rapor edilmiştir (3).

Elastin Benzeri Polipeptit Füzyonlar: Enjekte edilebilir aşuların üretiminin bir parçası olarak antijenlerin saflaştırılması zahmetli ve pahalı bir faaliyettir. Saflaştırma işlemini basitleştirmek için kullanılan alternatif yaklaşım, sıcaklığın değiştirilerek proteinin çöktürülmesine izin veren, tersine çevrilebilir faz geçişi adı verilen benzersiz bir özelliğe sahip olan elastin benzeri polipeptitlerin (ELP) füzyonuna dayanmaktadır. Bu yaklaşım, bitki bazlı aşı adaylarının geliştirilmesi için uygulanan karmaşık/pahalı affinite kromatografisine bir alternatif olmaktadır (63).

Mukozal Aşuların ve Bağışıklığı Güçlendirme Planlarının Uygunluğu: Solunum yolu hastalıklarına karşı kullanılan aşuların çoğu parenteral olarak uygulansa da, özellikle burun içi uygulanan mukozal aşular, patojen etkenlerin girişi için kritik olan akciğerler ve diğer mukozal dokularda solunum yolu hastalıklarına karşı bağışıklığın oluşmasında etkili olmaktadır (64, 65).

Bazı firmalar, geçici ekspresyon sistemlerini kullanarak bitki bazlı VLP aşularının üretimine hali hazırda başlamış olsa da, bu çalışmalar esas olarak enjekte edilebilir aşuların geliştirilmesine yönelik olmaktadır (54, 66). Bu nedenle mukozal bağışıklama ile ilgili alternatiflerin geliştirilmelidir. Bu amaçla, SARS-CoV-2 antijenlerini kararlı bir şekilde eksprese eden bitkilerin üretilmesi, bu teknolojinin kullanılması için yeni imkanlar sunabilmektedir. Bu yaklaşım ile oral

güçlendirici ajanların geliştirilmesine kullanılan SARS-CoV-2 antijenlerini içeren yenilebilir bitki materyalleri üretilmektedir (67). Dondurularak kurutulmuş bitki materyali, termostabilite ve uygulanması kolay özellikleri ile düşük maliyetli bir aşı olarak kullanılmaktadır. Benzer şekilde bitkilerde üretilen saf antijenlerin, geleneksel bir aşının kullanıldığı ve bitkiden elde edilen antijenin takviye amaçlı olarak oral yoldan verildiği uygulamalarda da başarılı olduğu bildirilmiştir (68).

Yenilebilir Aşının Avantajları

Yenilebilir aşının başlıca avantajları şunlardır (36):

1. Bağışıklama için taşıyıcı olarak etkilidir çünkü bağışıklık tepkisini artıran yardımcı maddelere ihtiyaç duyulmamaktadır.

2. Geleneksel aşılarla gözlenmeyen mukozal bağışıklık ortaya çıkmaktadır.

3. Depolama, hazırlama, üretim ve nakliye edilmesinde maliyet açısından etkindir. Biyoteknolojik yöntemle üretilen aşılar, soğuk zincir depolamaya ihtiyaç duyan geleneksel aşıların aksine, aşıları korumak için yıllık maliyeti artıran oda sıcaklığında stabildir. Ayrıca, tohumlarda daha az nem içeriği olduğu için transgenik bitki tohumları kurutulmaktadır. Yağ veya sulu ekstraktlar daha fazla depolama olanağına sahiptir. Yenilebilir aşıların üretimi toprak bakımından zengin bölgelerde kolaylıkla yapılabildiğinden pahalı ekipman ve makinelere ihtiyaç yoktur. Aynı zamanda bitki yetiştirme maliyeti de fermenterlerde yetiştirilen hücre kültürüne göre düşüktür.

4. Bitkilerden üretildiği için kolaylıkla temin edilebilmektedir. Geleneksel aşıların üretiminde gerekli olan özel üretim alanları ve sterilizasyon gibi bölümlere ihtiyaç duyulmadığından üretim maliyeti düşüktür.

5. Geleneksel aşıların aksine enjeksiyon yoluyla uygulama gerektirmediğinden kolaylıkla kabul edilmektedirler. Ayrıca hem sağlık personeli ihtiyacı azalmakta hem de steril koşullara ihtiyaç duyulmadığından dolayı kontaminasyon riski düşük olmaktadır.

6. Bitki türevli aşılar, çok sayıda antijeni birleştiren yeni aşıların kaynağı olabilmektedir. Bu çok bileşenli aşılar, birkaç antijenin aynı anda M hücrelerine yaklaşmasına izin verebildiğinden ikinci nesil aşılar olarak adlandırılmaktadır.

7. Proteinlerin bulaşıcı organizmaya dönüşme olasılığı olmadığından geleneksel aşıya kıyasla bireyin güvenliğini artırmaktadır. Yenilebilir aşılar, zayıflatılmış patojen etkenleri içermezler.

8. Hayvandan üretilme sistemine kıyasla yenilebilir aşının seri olarak üretimi kolay olmaktadır.

Yenilebilir Aşının Dezavantajları

Yenilebilir aşıya ulaşmak kolaydır ancak bazı zorlukları vardır. Yenilebilir aşı kullanımı ile ilgili başlıca sorunlar şunlardır (36):

1. Aşı proteini veya peptidine karşı immüntolerans geliştirme olasılığı bulunmaktadır.

2. Dozaj formunun tutarlılığı, bitki türüne ve nesilden nesile, protein içeriği de hastanın yaşı, ağırlığı, meyvenin olgunluğu ve bitki materyalinin/ürünün standardizasyonu için yöntemler bulunmadığında tüketilen gıdanın miktarına göre farklılık göstermektedir. Yenilebilir aşının düşük dozları tüketildiğinde daha az sayıda antikor üretilmektedir. Buna karşın yüksek dozları ise bağışıklık toleransına neden olmaktadır.

3. Aşı stabilitesi bitkilere göre farklılık göstermektedir.

4. Patates gibi bazı yiyecekler çiğ olarak tüketilemez ve yapısında bulunan proteinin denatüre veya zayıflatılacak şekilde pişirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

5. Yenilebilir aşı için değişen ortam koşulları da büyük bir problemdir. Aşı içeren patatesler 40C'de daha uzun süre saklanabilirken domatesler ise bu sıcaklık koşullarında uzun süre muhafaza edilememektedir. Bu nedenle, mikrobiyal bozulma yoluyla enfeksiyonu önlemek için bu aşıların uygun şekilde saklanması gerekmektedir.

6. Toleransa yol açabilecek yanlış aşı uygulamasının önlenmesi amacıyla "aşı meyvesi" ve "normal meyve" arasında uygun ayırt edici karakterlere ihtiyaç duyulmaktadır.

7. Bitkilerin ve insanların glikozilasyon (proteinlere şeker ilavesi) modelleri farklıdır, bu durum aşıların fonksiyonlarını etkileyebilmektedir.

Sonuç

Özellikle son on yıllık dönemde bitkilerin yenilebilir kısımlarında antijen veya antikor eksprese edilerek bazı salgın hastalıkların önlenmesi amacıyla elde edilecek yenilebilir aşıların arttırılmasına yönelik olarak birçok girişim söz konusu olmuştur. Covid-19'un ortaya çıkması ile oluşan tehdide karşı koymak için yeni biyolojiklerin, özellikle de aşıların geliştirilmesine yönelik küresel bir acil durum ortaya çıkmıştır. İlk deneysel aşıların üretilmesinde inaktif aşılar temel olsa da, alternatif olarak alt birim aşıların geliştirilmesi araştırılmalıdır. Bitki bazlı yenilebilir bir aşı, ihtiyaca hızla yanıt vermek için uygun bir yaklaşımdır. Ancak yenilebilir aşının gelecekteki durumu birçok kritere bağlıdır. Bu tür aşılar üretilirken, bitkilerin büyüme sürecindeki güvenilirlik ve kalitelerinin yüksek seviyede sürdürülmesi amacıyla izlenebilirlikleri oldukça önemlidir. Çünkü genetiği değiştirilmiş bitkiler ile genetiği değiştirilmemiş bitkiler arasında tozlaşma esnasında çapraz bulaşma olabilmektedir. Ayrıca yenilebilir aşı üretiminde kullanılan genetiği değiştirilmiş bitkilere böceklerin veya kuşların teması sonucunda, DNA ya da antijen su kaynaklarına ve gıda zincirine dahil olarak doğal yaşamı etkileyebilmektedir. Bitki sistemlerinin multiepitop proteinlerini başarıyla üretimi göz önüne alındığında, COVID-19'a karşı bu tür aşıların üretilmesi son derece uygulanabilir olmaktadır.

Mevcut ekspresyon teknolojileri ile Covid-19 aşlarının geliştirilmesi çalışmaları yapılmaktadır. VLP'ler, yüksek immünojenitesi, antijenik determinantların korunması ve replikasyon kapasitesinin olmaması ile ilişkili, verimli ve güvenli aşların geliştirilmesi için çekici bir yaklaşım oluşturmaktadır. Bu nedenle, ana SARS-CoV-2 yapısal proteinlerine dayanan VLP'ler, koronavirüs enfeksiyonlarına karşı aşı geliştirmede dikkat çekici bir yaklaşıma neden olmaktadır.

Yenilebilir aşilar düşük maliyetleri ve özellikle yaşlılar için mukozal bölmelerde uygun hümmoral yanıt ve uzun süreli koruma ile karakterize bağışıklık profilleri nedeniyle özel bir öneme sahiptirler. Bu gelişmelere

benzer olarak, bitkilerde monoklonal antikorların üretimi, bitki yapımı antikorların kritik hastalar için düşük maliyetli ve daha güvenli bir intravenöz tedavinin uygulandığı plazma transfüzyonuna karşı alternatif stratejiler oluşturmaktadır. İnsan kullanımı için onaylanmış bitki yapımı bir biyofarmasötik ve klinik deneyler altında influenzaya karşı bitki yapımı aşı örneklerinin olması cesaret vericidir. Bu nedenle Covid-19 ile mücadelede bitki bazlı aşiların potansiyeli bulunmaktadır. Geleneksel aşiların herkese özellikle de fakir ülkelerin tamamına ulaşmaması, muhafaza edilmesinin güç olması ve uygulamada karşılaşılan zorlukları nedeniyle bilim adamları tarafından söz konusu problemlerin çözümü amacıyla alternatif aşı üretimi çalışmaları yapılmaktadır.

Kaynaklar

1. WHO (World Health Organization). "Coronavirus disease (COVID-19)". <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/> 20.01.2022.
2. Chen Y, Liu Q, Guo, D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol* 2020; 92: 418-423.
3. Tian X, Li C, Huang A, et al. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. *Emerg Microbes Infect* 2020; 9: 382-385.
4. Mitjà O, Clotet B. Use of antiviral drugs to reduce COVID-19 transmission. *Lancet Glob Health* 2020; 8: e639-e640.
5. Shen C, Wang Z, Zhao F, et al. Treatment of 5 critically ill patients with COVID-19 with convalescent plasma. *JAMA* 2020; 323: 1582-1589.
6. Menachery VD, Gralinski LE, Mitchell HD, et al. Combination attenuation offers strategy for live attenuated coronavirus vaccines. *J Virol* 2018; 16: e00710-18.
7. Kotomina T, Isakova-Sivak I, Matyushenko V, et al. Recombinant live attenuated influenza vaccine viruses carrying CD8 T-cell epitopes of respiratory syncytial virus protect mice against both pathogens without inflammatory disease. *Antivir Res* 2019; 168: 9-17.
8. Kobinger GP, Figueredo JM, Rowe T, et al. Adenovirus-based vaccine prevents pneumonia in ferrets challenged with the SARS coronavirus and stimulates robust immune responses in macaques. *Vaccine* 2007; 25: 5220-5231.
9. Takano T, Yamada S, Doki T, Hohdatsu T. Pathogenesis of oral type I feline infectious peritonitis virus (FIPV) infection: Antibody-dependent enhancement infection of cats with type I FIPV via the oral route. *J Vet Med Sci* 2019; 81: 911-915.
10. Wu T, Guan J, Handel A, et al. Quantification of epitope abundance reveals the effect of direct and cross-presentation on influenza CTL responses. *Nat Commun* 2019; 10: 2846.
11. Armbruster N, Jasny E, Petsch B. Advances in RNA vaccines for preventive indications: A case study of a vaccine against rabies. *Vaccines* 2019; 7: 132.
12. CUREVAC. "CureVac focuses on the development of mRNA-based coronavirus vaccine to protect people worldwide". [https://www.curevac.com/en/2020/03/15/curevac-focuses-on-the-development-of-mrna-based-](https://www.curevac.com/en/2020/03/15/curevac-focuses-on-the-development-of-mrna-based-coronavirus-vaccine-to-protect-people-worldwide/)
13. Anonim. "Safety and Immunogenicity Study of 2019-nCoV Vaccine (mRNA-1273) for Prophylaxis of SARS-CoV-2 Infection (COVID-19)". <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04283461/> 20.01.2022.
14. Anonim. "Safety and Immunity of Covid-19 aAPC Vaccine". <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04299724?term=vaccine&cond=coronavirus&draw=2&rank=6/> 20.01.2022.
15. Grifoni A, Sidney J, Zhang Y, et al. A sequence homology and bioinformatic approach can predict candidate targets for immune responses to SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe* 2020; 27: 671-680.
16. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell* 2020; 181: 281-292.
17. Rosales-Mendoza S, Marquez-Escobar VA, Gonzalez-Ortega O, Nieto-Gomez R, Arevalo-Villalobos JI. What does plant-based vaccine technology offer to the fight against COVID-19? *Vaccines* 2020; 8: 183.
18. Hernández M, Rosas G, Cervantes J, et al. Transgenic plants: A 5-year update on oral antipathogen vaccine development. *Expert Review of Vaccines* 2014; 13: 1523-1536.
19. Fischer R, Buyel JF. Molecular farming-The slope of enlightenment. *Biotechnol Adv* 2020; 40: 107519.
20. Rosales-Mendoza S, Angulo C, Meza B. Foodgrade organisms as vaccine biofactories and oral delivery vehicles. *Trends Biotechnol* 2016; 34: 124-136.
21. Chan HT, Daniell H. Plant-made oral vaccines against human infectious diseases-are we there yet? *Plant Biotechnol J* 2015; 13: 1056-1070.
22. Waheed MT, Sameeullah M, Khan FA, et al. Need of cost-effective vaccines in developing countries: What plant biotechnology can offer? *SpringerPlus* 2016; 5: 65.
23. Chen Q, Davis KR. The potential of plants as a system for the development and production of human biologics. *F1000 Res* 2016; 5: 912.
24. McNulty MJ, Gleba Y, Tusé D, et al. Techno-economic analysis of a plant-based platform for manufacturing antimicrobial proteins for food safety. *Biotechnol Prog* 2020; 36: e2896.

25. Peyret H, Brown JKM, Lomonosoff GP. Improving plant transient expression through the rational design of synthetic 5' and 3' untranslated regions. *Plant Methods* 2019; 15: 108.
26. Márquez-Escobar VA, Rosales-Mendoza S, Beltrán-López JI, González-Ortega O. Plant-based vaccines against respiratory diseases: Current status and future prospects. *Expert Rev Vaccines* 2017; 16: 137-149.
27. Rosales S, Salazar JA. Immunological aspects of using plant cells as delivery vehicles for oral vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2014; 13: 737-749.
28. Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. Magniffection-A new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* 2005; 23: 2042-2048.
29. Yusibov V, Streatfield SJ, Kushnir N. Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: Vaccines, antibodies and beyond. *Hum Vaccines* 2011; 7: 313-321.
30. Madhumita N, Deepak V, Pallavi U. Edible vaccines - A review. *Int J Pharmacother* 2014; 4: 58-61.
31. Ma H, Chen G. Gene transfer technique. *Nature Sci* 2005; 3: 25-31.
32. Chen Q, Lai H. Gene delivery into plant cells for recombinant protein production. *BioMed Res Int* 2015; 932161: 1-10.
33. Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11745-11749.
34. Gomez E, Zoth SC, Carrillo E, Berinstein A. Developments in plant-based vaccines against diseases of concern in developing countries. *Open Infect Dis J* 2010; 4: 55-62.
35. Kim T, Yang M. Current trends in edible vaccine development using transgenic plants. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2010; 15: 61-65.
36. Shah CP, Trivedi MN, Vachhani UD, Joshi VJ. Edible vaccine: A better way for immunisation. *Int J Curr Pharm Res* 2011; 3: 53-56.
37. Arakawa T, Chong DK, Merritt JL, Langridge WH. Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Res* 1997; 6: 403-413.
38. Wu L, Jiang L, Zhou Z, et al. Expression of foot-and-mouth disease virus epitopes in tobacco by a tobacco mosaic virus-based vector. *Vaccine* 2003; 21: 4390-4398.
39. Esmael H, Hirpa E. Review on edible vaccine. *Acad J Nutr* 2015; 4: 40-49.
40. Concha C, Cañas R, Macuer J, et al. Disease prevention: An opportunity to expand edible plant-based vaccines. *Vaccine* 2017; 5: 14.
41. Mason HS, Ball JM, Shi JJ. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(11): 5335-5340.
42. Oszvald M, Kang TJ, Tomoskozi S, et al. Expression of a synthetic neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhoea virus fused with synthetic b subunit of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin in rice endosperm. *Mol Biotechnol* 2007; 35: 215-223.
43. Kumar GBS, Ganapathi TR, Revathi CJ, Srinivas L, Bapat VA. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. *Planta* 2005; 222: 484-493.
44. Zhang X, Buehner NA, Hutson AM, Estes MK., Mason HS. Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein. *Plant Biotechnol J* 2006; 4: 419-432.
45. Lou XM, Yao QH, Zhang Z, et al. Expression of the human hepatitis B virus large surface antigen gene in transgenic tomato plants. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 464-469.
46. Kim TG, Kim MY, Kim BG, et al. Synthesis and assembly of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). *Protein Expr Purif* 2007; 51: 22-27.
47. Gómez E, Zoth SC, Asurmendi S, Rovera CV, Berinstein A. Expression of hemagglutinin neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus in agro infiltrated *Nicotiana benthamiana* plants. *J Biotechnol* 2009; 144: 337-340.
48. Zhang H, Liu M, Li Y, et al. Oral immunogenicity and protective efficacy in mice of a carrot-derived vaccine candidate expressing UreB subunit against *Helicobacter pylori*. *Protein Expr Purif* 2010; 69: 127-131.
49. Chabeda A, Van Zyl AR, Rybicki EP, Hitzeroth II. Substitution of human papillomavirus type 16 L2 neutralizing epitopes into L1 surface loops: The Effect on virus-like particle assembly and immunogenicity. *Front Plant Sci* 2019; 10: 779.
50. Mbewana S, Meyers AE, Rybicki EP. Chimaeric rift valley fever virus-like particle vaccine candidate production in *Nicotiana Benthamiana*. *Biotechnol J* 2019; 14: e1800238.
51. Ruiz V, Baztarrica J, Rybicki EP, Meyers AE, Wigdorovitz A. Minimally processed crude leaf extracts of *Nicotiana benthamiana* containing recombinant foot and mouth disease virus-like particles are immunogenic in mice. *Biotechnol Rep (Amst)* 2018; 20: e00283.
52. Mortola E, Roy P. Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expression system. *FEBS Lett* 2004; 576: 174-178.
53. Lu X, Chen Y, Bai B, et al. Immune responses against severe acute respiratory syndrome coronavirus induced by virus-like particles in mice. *Immunology* 2007; 122(4): 496-502.
54. Medicago. "COVID-19 vaccine". <https://medicago.com/en/covid-19-vaccine/> 20.01.2022.
55. Masters PS. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* 2006; 66: 193-292.
56. Stephen SL, Beales L, Peyret H, et al. Recombinant expression of tandem-HBc virus-like particles (VLPs). *Methods Mol Biol* 2018; 1776: 97-123.
57. Wang Q, Zhang L, Kuwahara K., et al. Immunodominant SARS coronavirus epitopes in humans elicited both enhancing and neutralizing effects on infection in non-human primates. *ACS Infect. Dis* 2016; 2: 361-376.

58. Tang X, Wu C, Li X, et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *Natl Sci Rev* 2020; 7: 1012-1023.
59. Trujillo E, Rosales S, Angulo C. A multi-epitope plant-made chimeric protein (LTBentero) targeting common enteric pathogens is immunogenic in mice. *Plant Mol Biol* 2020; 102: 159-169.
60. Jong JMH, Schuurhuis D, Joan-Facsinay A, et al. Murine Fc receptors for IgG are redundant in facilitating presentation of immune complex derived antigen to CD8+ T cells in vivo. *Mol Immunol* 2006; 43: 2045-2050.
61. Damos AG, Hunter JGL, Pardhe MD, et al. High level production of monoclonal antibodies using an optimized plant expression system. *Front Bioeng Biotechnol* 2020; 7: 472.
62. Pepponi I, Diogo GR, Stylianou E, et al. Plant-derived recombinant immune complexes as self-adjuvanting TB immunogens for mucosal boosting of BCG. *Plant Biotechnol J* 2014; 12: 840-850.
63. Floss DM, Mockey M, Zanello G, et al. Expression and immunogenicity of the mycobacterial Ag85B/ESAT-6 antigens produced in transgenic plants by elastin-like peptide fusion strategy. *Biomed Biotechnol* 2010; 274346.
64. Rubio-Infante N, Govea-Alonso DO, Romero-Maldonado A, et al. A plant-derived Multi-HIV antigen induces broad immune responses in orally immunized mice. *Mol Biotechnol* 2015; 57: 622-674.
65. Miquel-Clopés A, Bentley EG, Stewart JP, Carding SR. Mucosal vaccines and technology. *Clin Exp Immunol* 2019; 196: 205-214.
66. iBio. Guiding Next-Gen Coronavirus Vaccine Development Strategy <https://ibioinc.com/vaccines/ibio-202/> 20.01.2022.
67. Pniewski T, Milczarek M, Wojas-Turek J, et al. Plant lyophilisate carrying S-HBsAg as an oral booster vaccine against HBV. *Vaccine* 2018; 36: 6070-6076.
68. Margolin E, Chapman R, Meyers AE, et al. Production and immunogenicity of soluble plant-produced HIV-1 subtype C envelope gp140 immunogens. *Front Plant Sci* 2019; 10: 1378.