

## 항원 생산 기반으로서의 식물 연구

염정원 · 전재흥 · 정 혁 · 김현순

## Plants as platforms for the production of vaccine antigens

Jung Won Youm · Jae Heung Jeon · Hyouk Joung · Hyun Soon Kim

Received: 2 August 2010 / Accepted: 16 August 2010  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** The expression of vaccine antigens in transgenic plants has the potential to provide a convenient, stable, safe approach for oral vaccination alternative to traditional parenteral vaccines. Over the past two decades, many different vaccine antigens expressed via the plant nuclear genome have elicited appropriate immunoglobulin responses and have conferred protection upon oral delivery. Up to date, efforts to produce antigen proteins in plants have focused on potato, tobacco, tomato, banana, and seed (maize, rice, soybean, etc). The choice of promoters affects transgene transcription, resulting in changes not only in concentration, but also in the stage tissue and cell specificity of its expression. Inclusion of mucosal adjuvants during immunization with the vaccine antigen has been an important step towards the success of plant-derived vaccines. In animal and Phase I clinical trials several plant-derived vaccine antigens have been found to be safe and induce sufficiently high immune response. Future areas of research should further characterize the induction of the mucosal immune response and appropriate dosage for delivery system of animal and human vaccines. This article reviews the current status of development in the area of the use of plant for the development of oral vaccines.

### 서론

Vaccination은 인류의 의료 행위 중 가장 경제적인 것

중의 하나로서 상당수의 감염성 질병에서 개발되어 있다. 그럼에도 불구하고 저개발 국가를 위시한 많은 사람들, 특히 전세계 3천만명 이상의 어린이들이 백신의 혜택을 받지 못하고 있는 것 또한 현실이다. 기존의 백신-개발 시스템이 가지는 고가의 생산설비, 수송과 저장시에 요하는 냉장설비의 경제적 부담 및 백신 투여의 어려움, 위험한 동물 오염원에 대한 안전성 확보, 주사를 맞는 것에 대한 사람들의 보편적인 거부감을 감안할 때 보다 안전하고 값싼 백신의 공급을 위하여 항원의 발현 대상이 확대되어져 왔고 1990년대 이후로 식물-분자농업 연구가 활성화됨에 따라 식물도 그 범주에 들게 되었다.

경구용 식물 백신 (plant derived oral vaccine)은 병원체의 항원유전자를 식물에 도입시켜 항원단백질을 합성하는 식물체를 만들어 경구로 투여하고자 하는 기술로서, 1980년대 중반 처음 아이디어가 제시된 후 1990년 Cutiss와 Cardineau 에 의해 처음 시도되어 현재까지 많은 연구가 진행되고 있는 분야이다. 식물을 생산-기반으로 하는 백신은 ① 사람이나 동물의 병원체를 가지지 않는 시스템에서 항원단백질만을 목표로 발현하므로 안정성 확보가 가능하고, ② 식품의 섭취를 통해 처치되므로 백신의 투여에 고통이 따르지 않고 기존 사용 백신에 비하여 거부감이 없으며, ③ 농업체계를 활용한 대량생산으로 백신 생산비용이 저렴하고, ④ 백신의 보관에 cold-chain을 요구하지 않는 등 많은 장점을 가지고 있다. 더욱이, 식물유래 경구백신은 소화관, 호흡기, 비노생식 기관의 점막표면을 통해 전달되는데, 이곳은 동물 병원균의 주요 침입구로 백신을 섭취할 경우 면역글로블린 A (IgA)를 생성하여 점막 세포 표면의 수용체에 병원균의 결합을 억제하는 점막 면역 반응 (mucosal immune response)에 매우 효과적인 것으로 알려져 있다. 또한, 식물경구백신은 항원을 과실이나 곡류와 같은 식용 부분에 발현시킴으로

J. W. Youm · J. H. Jeon · H. Joung · H. S. Kim (✉)  
한국생명공학연구원 식물시스템공학연구센터  
(Plant Systems Engineering Research Center, KRIBB, 111  
Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea)  
e-mail: hyuns@kribb.re.kr

서 식물 세포벽이 백신 항원을 충분히 보호하여 항원이 손상되지 않고 면역원의 상태로 장 관련 림프조직에 도달할 수 있게 한다 (Carter and Langridge 2002).

이러한 장점들과는 달리 아직도 불충분한 발현양의 문제, 면역관용의 우려 제기 및 제어된 공간이 아닌 곳에서의 재배일 경우 대부분의 유전자변형작물들이 가지는 환경 위해성에 대한 검정 등과 같은 해결해야 할 문제들이 극복되지 못하고 있다. 또한, 연구 초기의 식물경구백신이라는 개념은 어떠한 가공 과정도 거치지 않고 항원의 발현 대상 기관 그 자체를 백신으로 취하는 것이었으나 항원의 양을 결정짓기 위한 표준화가 어렵다는 점 등의 이유로 최근에는 순수분리정제를 비롯한 단순 일차 가공을 포함하는 개념으로 좁혀지고 있는 실정이다.

본 논문에서는 지금까지 발표된 식물-유래 백신용 연구 내용들을 발현-항원별로 분류, 발현-대상 식물체별 분류, 발현율을 높이기 위한 각종 벡터들의 세부 내용, 면역 반응 향상을 위한 어쥬번트들의 효과, 끝으로 일부 연구진들에 의하여 진행된 임상실험들을 조사하여 실용화에 얼마나 가까이 다가와 있는지를 가능해 볼 수 있는 기회를 제공하고자 하였으며, 나아가 연구개발 현황들을 분석함으로써 앞으로의 전망과 기대치에 대하여 논의해 보고자 하였다.

## 식물유래 재조합항원

현재 식물체에서 안정적인 발현이 확인되어 개발이 진행 중인 식물유래 경구백신의 종류와 그 진행의 정도를 살펴보면 다음과 같다 (Table 1). Arntzen 등 (2003)의 보고에 의하면 2003년까지 약 45 여종의 항원들이 식물체에 도입되어졌으며, 그 이후로도 더 넓은 범위의 질병으로 확대되어왔다. 본 review 에서는 그 들 중 가장 많이 연구가 되어있는 항원을 정리하였다.

### CTB (cholera toxin B subunit)

콜레라는 설사병을 유발하는 *V. cholera* 에 의한 수인성 질병으로 해마다 전세계적으로 550만 명이 감염되며, 주로 아시아, 아프리카 등 최빈국에서 12만 명이 목숨을 잃는 질병이다. 콜레라는 점막백신으로 감자, 토마토 등 다양한 작물에서 시도되었는데 (Jani et al. 2002), 감자에서 총 수용성 단백질 (TSP)의 0.3% (Arakawa et al. 1997), 담배에서 0.095% (Wang et al. 2001), 토마토의 잎에서 0.02%, 과육에서 0.04% (Jani et al. 2002)씩 각각 발현되는 것으로 보고되었다. 또한, 콜레라 항원이 발현된 감자를 먹인 쥐에서 콜레라균에 특이적으로 반응하는 항체가 생성됨을 확인하였다 (Arakawa et al. 1998). Nochi 등 (2007)은 콜레

라 독소 B를 생산하는 쌀을 만들어 면역반응을 확인하였는데, 형질전환 벼-유래의 CTB는 위산의 분해에도 안정하며 실온에서 장기간 보관해도 활성이 유지되어 백신으로서의 사용이 가능함을 보여주었다. 식물에서 콜레라 항원을 발현시킬 때 높은 분자량을 나타내는 경향이 있는데, 이는 식물의 경우에 특정 효소들로 인해 특이적인 당쇄화 (glycosylation) 과정을 거치면서 일어나는 현상으로 밝혀졌다 (Warzecha et al. 2007). 식물에서 일어나는 당쇄화 과정은 식물경구백신 생산과 관련해 좀 더 연구가 이루어져야 하는 부분이다.

### LTB (heat labile enterotoxin B subunit)

대장균 장독소 (ETEC)는 한개 이상의 독소를 생산해 내는 수양성 질병이다. 이들 중 하나가 고분자량인 heat labile toxin (LT)인데, 이것은 콜레라 독소 (CT)와 매우 유사하다. LTB역시 CTB와 마찬가지로 장의 상피세포 표면에 존재하는 GM-1 강글리오사이드에 B subunit 펜타머의 특수 상호작용에 의해 결합하며 면역원으로서 뿐만 아니라 공공 투여 항원을 위한 면역보조제로서의 기능도 함께 수행한다.

Haq 등 (1995)은 대장균의 LTB를 감자와 담배에서 생산해, 총 수용성 단백질의 0.02%까지 발현됨을 관찰하였으며, 이들 단백질이 장내 GM-1 강글리오사이드에 결합하는 것으로 보아 생리적 상태인 11.6 kDa의 펜타머 형성이 원활하게 일어날 수 있음을 보여 주었다. Mason 등 (1998)은 LTB의 발현율을 높이기 위하여 식물에서 많이 사용되는 코돈 (plant optimized codon)으로 변화시키고, RNA안정성 증가를 위하여 시퀀스를 제거 시키는 등의 다양한 시도를 통해 항원단백질의 발현을 증가시켰으며, Chikwamba 등 (2002)은 종자특이발현 (seed specific) 프로모터를 사용해 옥수수에서 형질전환시켜 박테리아 유래 LTB와 유사하게 GM-1 강글리오사이드에 결합해 안정적인 항체형성을 확인하였다. LTB와 CTB의 재조합 다중체는 동물 (Mason et al. 1998)과 사람 (Tacket et al. 1998)에게 경구투여 하였을 때 정상적인 면역반응이 유도된다고 보고 된 바 있다.

### HBV (hepatitis B surface antigen)

현재 사용되는 B형 간염 재조합 백신은 효모로부터 HBV 감염 입자와 유사한 17 nm 크기의 입자를 생산하여 백신으로 사용하는데 (Wampler et al. 1985), 식물경구백신은 이와 유사한 입자를 식물체에 발현시켜 재조합 단백질로 사용한다. 이를 위해 초기 연구에서 Mason 등 (1992)이 담배에서 HBV 항원의 표면 항원 유전자 (HBsAg)를 도입해 항원 단백질의 생산 및 식물에서 발현된 항원단백

**Table 1** Target species for the plant-derived vaccines

| Pathogen   | Antigen vaccines                 | Plant   | References  |
|--|----------------------------------|---|---|
| <i>V. cholerae</i>                               | CTB                              | Potato, Tobacco, Tomato, lettuce, Rice, Peanut              | Arakawa et al. 1997, 1998; Yu and Langridge 2001; Jani et al. 2004; Kim et al. 2006; Li et al. 2006; Oszvald et al. 2008; Matoba et al. 2009; Nozoye et al. 2009  |
| <i>E. coli</i>                                   | LTB                              | Potato, Maize, Tomato, Tobacco, Soybean, Carrot             | Mason et al. 1998; Lauterslager et al. 2001; Chikwamba et al. 2002; Walmsley et al. 2003; Rigano et al. 2004; Tacket et al. 2004; Karaman et al. 2006; Moravec et al. 2007  |
| Hepatitis B virus                                | HBV                              | Tobacco, Potato, Lettuce, Banana, Tomato, Cherry, tomatillo | Mason et al. 1992; Thanavala et al. 1995, 2005; Richter et al. 2000; Kong et al. 2001; Gao et al. 2003; Joung et al. 2004; Huang et al. 2005; Kumar et al. 2005; Youm et al. 2007; Guetard et al. 2008; Thanavala et al. 2010 |
| Norwalk virus (NV)                               | Norwalk virus capsid protein     | Potato, Tomato  | Mason et al. 1996; Tacket et al. 2000; Zhang et al. 2006; Santi et al. 2008   |
| Rota virus                                       | Capsid of rotavirus glycoprotein | Potato, Alfalfa   | O'Brien et al. 2000; Wu et al. 2003; Yu and Langridge 2003; Li et al. 2006; Choi et al. 2006  |
| Human papillomaviruses (HPV)                     | Cervical cancer                  | Arabidopsis, Tobacco, Potato                                | Biemelt et al. 2003; Warzecha et al. 2003; Varsani et al. 2003; Liu et al. 2005; Kohl et al. 2007   |
| Transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) | Glycoprotein S                   | Arabidopsis, Tobacco  | Gomez et al. 1998, 2000; Tuboly et al. 2000   |
| Foot-and-mouth disease (FMDV)                    | VP1                              | Arabidopsis, Alfalfa, potato, tobacco                       | Carrillo et al. 1998; Wigdorovitz et al. 1999; Lentz et al. 2010  |
| Rabies virus                                     | RGP                              | Tomato, Tobacco   | McGarvey et al. 1995; Ashraf et al. 2005  |
| Measles virus                                    | Measles                          | Tobacco, Carrot   | Huang et al. 2001; Marquet-Blouin et al. 2003; Webster et al. 2005, 2006  |
| Coronavirus spike glycoprotein epitope           | Human SARS                       | Tobacco, Tomato   | Li et al. 2006; Pogrebnyak et al. 2006  |
| Vaccinia virus                                   | Smallpox                         | Tobacco, Collard  | Golovkin et al. 2007; Portocarrero et al. 2008  |
| Human immunodeficiency virus (HIV)               | AIDS                             | Tobacco, Arabidopsis  | Ramirez et al. 2007   |
| Avian influenza virus                            | Avian flu                        | Avian flu   | Spitsin et al. 2009; Shoji et al. 2009  |
| Human beta-amyloid (A $\beta$ )                  | Alzheimer's                      | Potato, Tomato, Tobacco                                     | Kim et al. 2003; Youm et al. 2005, 2010   |

질이 HBV에 감염된 사람의 혈청에 의하여 인식됨을 확인하였고, 이후 생산된 항원을 동물에 주사하여 항체반응과 T 세포 (T cell) 면역반응이 정상적으로 유도됨을 보고하였다 (Thanavala et al. 1995). Youm 등 (2007)은 다른 연구와 달리 감자에 preS2를 포함하는 HBV 중간 단백질 (middle protein)을 도입해 HBV에 대한 항체 형성 유도가

더 원활히 유지됨을 밝힌 바 있다. 그 이후로도 꾸준하게 감자 (Joung et al. 2004; Youm et al. 2007), 토마토 (Gao et al. 2003), 바나나 (Kumar et al. 2005) 등 여러 작물에서 시도되어 안정적인 발현 및 백신으로서의 사용가능성이 이미 입증되었다 (Richter et al. 2000; Thanavala et al. 2005; Shchelkunov et al. 2006; Kumar et al. 2007).

## Rota 및 Norwalk 바이러스 capsid 단백질

바이러스성 설사병의 주된 원인 바이러스로 알려진 로타 바이러스와 Norwalk 바이러스는 식물경구백신 연구 초기부터 꾸준히 개발이 이루어진 항원이다. Mason 등 (1996)은 Norwalk 바이러스의 capsid 유전자를 담배와 감자에 형질전환 시켜 각각 0.23%, 0.37%의 TSP를 얻어냈는데, 이 capsid 단백질은 담배잎과 감자괴경에서 면역 반응에 관여하는 38 nm의 rNV (Norwalk virus like particle) 입자를 형성하였다. 이를 쥐에게 먹여 면역반응을 조사한 결과 혈청 IgG 항체가 안정적으로 만들어짐을 확인하였다.

로타바이러스 역시 어린 아이나 동물에게서 유발되는 설사병으로 외부 capsid 단백질의 주요 부위인 VP7을 감자에서 발현시켜, 오랜 기간의 기내-계대배양을 통해서도 재조합 항원성분이 그대로 유지됨은 물론이고, 항체-유도 면역반응 역시 원활함을 쥐실험을 통해 검증하였다 (Li et al. 2006).

## HPV (human papillomavirus)

자궁경부암은 전세계 여성에서 두 번째로 빈번히 발생하는 암으로, 해마다 50만 명에게 발병하며, 유방암과 폐암에 이어 세 번째로 주된 사망원인이 되는 암이다 (Kling and Zeichner 2010). 자궁경부암의 원인은 human papillomavirus 즉 인유두종 바이러스 감염에 의한 것인데, 거의 80% 이상의 경우가 이 바이러스가 원인이 되어 발병한다. Warzecha 등 (2003)은 HPV의 11과 16번 계통의 L1 단백질을 감자에서 발현시켜 면역에 중요한 기능을 하는 VLPs (virus like particles)가 정상적으로 만들어 진다는 것을 보고하였다. 다른 연구그룹에서는 감자 이외에도 담배에서 발현시킨 HPV 항원유전자를 쥐에게 먹인 결과 T 세포 반응이 일어나 면역반응이 제대로 유도됨을 확인한 바 있다 (Liu et al. 2005; Fernández-San et al. 2008).

## 베타아밀로이드 (A $\beta$ )

식물-유래 항원의 연구는 점막·관련 전염성 질병 대상에서 점차 그 범위를 넓혀 비전염성 질환도 포함되어졌다. 그 대표적인 것으로 암·관련 백신과 치매·관련 백신이다. 퇴행성 신경질환인 알츠하이머병은 불용성 섬유단백질인 베타아밀로이드 (A $\beta$ )가 뇌에 축적돼 플라크가 형성되면서 신경세포가 죽어서 발생하는 것으로 알려져 있으며, 베타아밀로이드 축적을 막으면 알츠하이머 병을 예방하거나 발병을 늦추는 것으로 예상된다. 이를 위해 백신으로 면역체계를 활성화해 베타아밀로이드 축적을 막는 방법을 연구하고 있다 (Hardy and Selkoe 2002). 베타아밀로이드가 감자에서 안정적으로 발현되는 Kim 등

(2003)의 연구를 시작으로 치매-모델 쥐 실험을 통해 항체 형성과 더불어 뇌 속의 플라크가 감소함을 확인하였다 (Youm et al. 2005). 인간 베타아밀로이드 유전자를 발현시킨 토마토를 15개월 된 생쥐에 먹인 뒤 면역반응을 관찰한 결과, 토마토-추출액을 먹인 쥐에서 항체 형성 반응이 확인되었다 (Youm et al. 2008). 그 밖에도 베타아밀로이드의 형성을 매개하는 BACE-1 (beta-site APP-cleaving enzyme 1)을 엽록체 형질전환 시스템을 이용해 담배에 형질전환 해 발현율을 높인 실험에서 TSP발현이 2.0%까지 높아짐을 확인 하였으며, 토마토, 감자에서와 마찬가지로 쥐를 이용한 면역실험에서도 백신으로서의 효과가 입증되었다 (Youm et al. 2010).

따라서, 식물체 발현양을 높이고 투여량에 대한 연구가 좀더 진행된다면 형질전환 식물을 이용한 치매 백신에 활용할 수 있을 것으로 기대되고 있다.

## TGEV (transmissible gastroenteritis virus), Rabies virus

TGEV는 돼지의 설사병을 일으키는 주요한 바이러스인 전염성 위장염 바이러스로 coronaviridae에 속하며 소장 용모 상피세포에서 증식하여 심한 수양성 설사를 유발한다. 식물경구백신의 우선적인 초점은 인간 병원균에 있지만, 국가생산성과 관계된 돼지설사병 (Gomez et al. 1998), 광견병 (McGarvey et al. 1995) 등과 같은 동물 병원균에도 매우 효과적으로 이용될 수 있다.

## 대상식물

식물유래 재조합백신의 연구초기에는 담배와 감자가 주로 사용되었으나, 최근에는 토마토, 바나나, 멜론 그리고 당근 등 과일이나 채소를 통하여 요리하지 않고 바로 식용으로 섭취할 수 있는 식물 백신의 개발이 이루어지고 있다 (Table 2). 하지만, 식용이 가능하지 않은 식물의 경우 백신 항원 추출과 정제를 통하여 백신으로서의 이용이 가능하다. 식물체의 종류와 항원단백질이 발현되는 특정 조직의 선택은 매우 중요하므로 대개는 백신의 사용 용도와 적용범위에 따라 결정된다 (Stevens et al. 2000; Stoger et al. 2005).

## 담배

담배는 형질전환이 용이하고 게놈 염기서열이 비교적 잘 알려져 있기 때문에 다른 식물체보다 선호된다. 초기 재조합 항원의 발현이 많이 이용되었다. 하지만, 상용화될 경우 식용이 가능하지 않으므로 추출 정제 과정을 거쳐야 하는 단점이 있다.

**Table 2** Selection of plants for recombinant antigen

| Plant/tissue                     | Antigenic protein | References  |
|----------------------------------|-------------------|---|
| Tobacco/leaf                     | HBV               | Mason et al. 1992;<br>Thanavala et al. 1995;<br>Varsani et al. 2003   |
|                                  | Norwalk virus     | Liu et al. 2005; Zhang et al. 2006  |
|                                  | HPV               | Mason et al. 1996;<br>Varsani et al. 2003; Liu et al. 2005  |
| Potato/leaf, tuber, hairy root   | CTB               | Arakawa et al. 1997   |
|                                  | LTB               | Mason et al. 1998; Lauterslager et al. 2001; Tacket et al. 2004   |
|                                  | Norwalk virus     | Mason et al. 1996; Tacket et al. 2000   |
|                                  | Rota virus        | Yu and Langridge 2003   |
|                                  | HBV               | Richter et al. 2000; Kong et al. 2001; Joung et al. 2004; Kumar et al. 2006; Youm et al. 2007                                       |
| Tomato/leaf, fruit               | CTB               | Jani et al. 2002; Jiang et al. 2007   |
|                                  | HBV               | Shchelkunov et al. 2006; Luo et al. 2007  |
|                                  | Norwalk virus     | Zhang et al. 2006   |
|                                  | Rabies virus      | MaGarvey et al. 1995  |
|                                  | AIDS              | Ramirez et al. 2007   |
| Cherry tomatillo/leaf            | HBV               | Gao et al. 2003   |
| Lettuce/leaf                     | CTB               | Kim et al. 2006   |
|                                  | HBV               | Kapusta et al. 2001   |
| Carrot/leaf, root                | LTB               | Rosales-Mendoza et al. 2007   |
|                                  | Measles           | Marquet-Blouin et al. 2003  |
| Banana/fruit                     | HBV               | Kumar et al. 2005   |
| Arabidopsis/leaf                 | LTB               | Rigano et al. 2004  |
|                                  | HPV               | Kohl et al. 2007  |
| Alfalfa/leaf                     | Rota virus        | Dong et al. 2005  |
|                                  | FMDV              | Wigdorovitz et al. 1999   |
| Rice/seed                        | CTB               | Nochi et al. 2007;<br>Oszvald et al. 2008; Nozoye et al. 2009   |
|                                  |                   |   |
| Maize/seed                       | LTB               | Streatfield et al. 2001; Chikwamba et al. 2002; Lamphear et al. 2002;<br>Tacket et al. 2004; Karaman et al. 2006; Beyer et al. 2007 |
|                                  |                   |   |
| Soybean/seed                     | LTB               | Moravec et al. 2007   |
| Siberian ginseng/somatic embryos | LTB               | Kang et al. 2006  |
| Collard/leaf                     | Smallpox and SARS | Pogrebnyak et al. 2005  |

## 감자

주요 작물중 하나이면서 형질전환이 용이하고, 괴경특이적 (tuber specific) 발현 프로모터를 이용한 발현율 증대도 가능하며, 수확 후 동결건조 및 세대간 변이가 적은 장점이 있다. 재조합 단백질 발현에 많이 이용되지만, 몇몇 품종을 제외한 감자 자체를 삶아야 한다는 점에서 단백질 안정성이 염려된다.

## 토마토

항원유전자를 토마토 과육과 같은 식용부위에 발현시킴으로서 식물 세포벽이 백신 항원을 충분히 보호하여 항원이 손상되지 않고 면역원 상태로 장에 도달할 수 있

게 한다. 과육 발현 특이적 프로모터 (E8 promoter)로 발현율을 높이는 시도가 진행중이며, 수확 후 다른 전처리 없이 바로 먹을 수 있는 이점이 있어 식물경구백신 연구에 많이 이용된다. 반면에 과육단백질 함량이 매우 낮고, 기내에서는 과육발현이 어려운 단점이 있다.

## 곡류 (옥수수, 쌀, 콩 등)

곡류의 경우 단백질 생산은 대개 종자에 축적되는데 이것은 건조한 상태로 수확되어서 처리시까지 안정하게 저장할 수 있다. 부피가 적고 냉장을 하지 않아도 최종 목적지로의 배송이 가능하다 (Lamphear et al. 2002). 또한 최소한의 경비로 큰 면적 재배가 가능해 가축의 사료로 이용될 시 매우 경제적이다. 하지만, 콩이나 쌀과 같은

종자 식물은 정제나 보관이 용이한 이점은 있으나 형질 전환이 어렵고, 재배 시 몇몇 종간의 이형교배가 일어날 확률도 있다. 또한, 인간백신으로 이용 시 가열이 필요해 면역원성이 염려되며, 노동력에 비해 수확량이 적은 단점이 있다.

바나나

아이들을 위한 소아용 경구백신 개발에 적합하다. 요리 되지 않은 상태에서 소비되기 때문에 고온 시에 발생하는 단백질의 변성염려가 없고, 특히 저개발 국가의 어린이들에게 치명적인 설사병 치료에 도움을 줄 수 있다. 대량재배시 교잡율이 적고, 한번 재배하면 오랜 기간 (10-12개월) 수확량이 많은 장점이 있다. 하지만, 특이 프로모터에 대한 연구가 미흡해 형질전환 바나나의 생산이 어렵고, 온실 재배 시 많은 공간이 필요하다는 단점이 있다.

식물유래 재조합항원의 가장 이상적인 조건은 익히지 않은 채 섭취하는 것이나 그렇지 못한 담배의 경우에는 백신 항원 추출과 정제 방법을 이용하여 섭취가 가능하다. 최근에는 식물에서 발현뿐 아니라 모상근 (hairy root) 을 이용한 식물세포배양을 통해 안전한 생산 시스템의 도입을 시도하고 있다. 형질전환 식물세포배양은 생물공정 측면에서 고려할 때 배지 가격이 저렴하며, 첨가되는 단백질 성분이 없기 때문에 동물세포에 비해 생산, 정제 비용을 낮출 수 있다는 점에서 경제적이다 (Kumar et al. 2005; Huang and Mcdonald 2009).

식물체 형질전환을 위한 프로모터의 선발

식물유래 재조합 단백질을 생산할 때, 가장 중요하게 고려할 사항이 단백질 발현수준이다. 어떤 프로모터를 선택하느냐에 따라 전사과정의 속도에 영향을 주고, 이는 단백질 발현에 직접적으로 관여하기 때문이다. 식물체 형질전환 시 가장 많이 이용되는 프로모터는 전조직 발현 CaMV (cauliflower mosaic virus) 35S 프로모터나 이를 식물체에 맞도록 약간씩 변형시킨 프로모터들이다 (Kim and Langridge 2003; Mishira et al. 2006; Chaturvedi et al. 2007). 그밖에 octopine이나 mannopine synthase 등 수많은 상시발현 프로모터들이 사용되고 있다 (Kwon et al. 2003; Aviezer et al. 2009). 또한, 식물 바이러스 (TMV, PVX, AIMV)를 일시적으로 발현시킨 벡터를 사용하여 대상 식물체에 감염시켜서 목적하는 항원유전자를 과발현시킬 수 있는데, 이러한 식물 바이러스 벡터 시스템은 단백질 발현에 소요되는 시간을 줄이고, 항원생산이 증가되는 장점이 있다 (McCornick et al. 1999; Marusic et al. 2001; Srinvas et al. 2008). 식물체 발현 바이러스벡터의 선택은 대상 식물체와 그 발현목적에 따라 정해진다 (Table 3).

최근에는 소포체 (ER)발현 특정 시퀀스 (KDEL)를 벡터 내에 임의적으로 삽입함으로써 단백질의 안정성을 높이고 (Sojikul et al. 2003), 식물체 특정조직에 과발현되는 프로모터, 즉 종자발현 (seed specific), 괴경발현 (tuber specific), 과육발현 (fruit specific) 프로모터들을 사용해 항원단백질의 양을 늘린 연구들이 진행되고 있다 (Perrin et al. 2000; Phillip et al. 2001; De Jaeger et al. 2002; Moravec et al. 2007; Jiang et al. 2007; He et al. 2008).

**Table 3** Selection of expression system

| Promoter   | Plant/tissue        | Expression level | Reference  |
|--|---------------------|------------------|--|
| <i>CaMV35S</i>                                       | Tobacco/leaf        | 500 µg/g         | Ma et al. 1998   |
|  | Alfalfa/leaf        | 1.0% TSP         | Khoudi et al. 1999   |
| <i>CaMV35S</i> (TMV leader sequence)                 | Tobacco/leaf        | 1.0 µg/g         | Fischer et al. 1999  |
| <i>CaMV35S</i> (Aalfalfa mosaic virus)               | Tomato/fruit        | Not given        | Sharma et al. 2008   |
| Enhanced <i>CaMV35S</i> (KDEL)                       | Rice/leaf           | 27.0 µg/g        | Stoger et al. 2000   |
|  | Soybean             | 2.4% TSP         | Moravec et al. 2007  |
| Maize ubiquitin (KDEL)                               | Rice/seed           | 32.0 µg/g        | Torres et al. 1999   |
| Tuber specific <i>patatin</i>                        | Potato/tuber        | 0.09% TSP        | Mason et al. 1996;<br>Joung et al. 2004                    |
| Fruit specific E8, 2A11                              | Tomato/fruit        | 0.081% TSP       | Luo et al. 2007;<br>Ramirez et al. 2007;<br>He et al. 2008 |
| <i>Ubiquitin</i> and seed specific <i>glutelin</i>   | Rice/seed           | Not given        | Yang et al. 2007   |
| <i>Ubp3</i> and <i>ethylene forming enzyme (EFE)</i> | Banana /leaf        | 19.92 ng/g       | Kumar et al. 2005  |
| Plastid rRNA operon ( <i>Prn</i> )                   | Tobacco/chloroplast | 4.1% TSP         | Daniell et al. 2001;<br>Rosales-Mendoza et al. 2008        |
| <i>PsbA</i>  | Tobacco/chloroplast | 14.8% TSP        | Arlen et al. 2008  |

**Table 4** Application of mucosal adjuvants in plant derived vaccines

| Origin            | Adjuvant | Antigenic protein | Reference  |
|-------------------|----------|-------------------|--|
| Bacteria products | CTB      | HBV               | Kong et al. 2001;<br>Davoodi-Semiromi et al. 2010                      |
|                   | LTB      | HCV<br>LTB        | Nemchinov et al. 2000<br>Chikwamba et al. 2003;<br>Karaman et al. 2006 |
|                   | CpG ODN  | Rotavirus VP6     | Dong et al. 2005   |
|                   | Saponin  | FMDV              | Xiao et al. 2007   |
| Plant products    |          |                   |  |

## 어쥬번트에 대한 연구

어쥬번트 (adjuvant)는 흔히 백신 보조제, 면역 보강제 또는 항원 보강제로 불리는 물질인데, 백신에 대한 감응반응을 높여 면역시스템에서 항체가 많이 생성될 수 있도록 한다. 어쥬번트는 보통 leukocyte에 존재하는 immune receptor에 결합해 세균에 감염되었다는 것을 인지하며 성분분석 및 활성화되어 내재면역을 증강시킨다 (Lambrecht et al. 2009; Reed et al. 2009). 보통 백신의 경우 보조제 투여를 반드시 요구하지는 않지만, 재조합 백신의 경우, oil, aluminum salts, virosomes 등의 어쥬번트를 함께 투여함으로써 면역이 지속적으로 유지되도록 한다. 식물경구백신에서 널리 이용되는 보조제로는 세균에서 파생된 *V. cholerae* toxin B subunit (CTB)와 *E. coli* heat labile enterotoxin B subunit (LTB) 등의 세균 독소와 같은 화합물과 그들 각각의 toxoid가 특별히 유용한 점막 보조제로 널리 사용된다 (Wu and Russell 1998; Tiwari 2008; Davoodi-Semiromi et al. 2010). 그 중 CTB는 가장 효과적인 점막면역 보조제로 알려져 있지만 독성이 너무 높고 그 자신에 대한 강한 면역 반응을 유도해내는 문제가 있어 좀 더 안정한 보조제의 개발이 필요한 실정이다 (Table 4). 최근들어 인체의 면역력을 높이는 성분으로 알려진 식물체 구성성분인 사포닌이 어쥬번트 가능성이 있음이 연구되고 있는데, 실제 동물실험에 사용해 본 결과 장내 면역시스템에서 백신보조제로서의 역할을 충분히 하는 것으로 나타났다 (Huber et al. 2002; Song and Hu 2009).

보조제는 무엇보다 안전하고 분해가 가능하며 스스로 면역반응을 유도하지 않고 적절한 면역반응을 촉진해야 하므로 재조합 항원의 종류와 시도 대상을 고려해 적절한 선택이 요구된다. 따라서, 경구백신을 개발함에 있어서 최근의 발전과 더불어 정확한 보조제의 개선이 필요하다.

### 임상시도의 예

식물체 재조합 백신이 허가를 받아 시판되고 있는 것은 아직까지는 없다. 하지만, 식물 경구 백신이 향후 수

**Table 5** Examples of plant derived vaccine for clinical trials

| Antigen                      | Plant (dosage)              | Reference             |
|------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| HBV                          | Lettuce (100-200 g FW/dose) | Kapusta et al. 1999   |
|                              | Potato (100-110 g FW/dose)  | Thanavala et al. 2005 |
| scFV                         | Tobacco (0.2-2.0 mg/dose)   | McCormick et al. 2008 |
| Norwalk virus capsid protein | Potato (150 g FW/dose)      | Tacket et al. 2000    |
| LT-B                         | Not given                   | Tacket et al. 1998    |

년 내에 현실화 될 것이라는 것이 지배적인 의견이다. 일부 항원 유전자의 경우 사람을 대상으로 하는 임상시험이 완료되어 조만간 FDA의 승인을 얻어 식물을 이용하여 생산된 백신이 실용화 될 수 있을 거라 전망한다. 현재까지 보고된 임상시험 진행 정도를 살펴보면 설사병 예방을 위해 몇몇 지원자 (volunteer)에게 한하여 50-100 g의 감자를 섭취하게 했던 1차 임상시험이 1997년 시작되었는데, 재조합 항원이 포함된 감자를 생으로 섭취해도 면역반응이 나타난다는 것을 보여주었다 (Tacket et al. 1998; Tacket et al. 2004). B형 간염의 경우, 임상 1 단계로 허가받은 간염 유전자가 발현된 형질전환 감자와 상추를 지원자를 대상으로 먹인 결과 특정 면역글로블린 G가 생성됨이 보고 되었다 (Kapusta et al. 2001; Thanavala et al. 2005). 이 같은 식물 백신 임상시도의 성공적인 보고는 식물유래 재조합 백신의 잠재력을 보여주는 중요한 결과라 하겠다 (Table 5). 최초로 허가된 식물 생산 백신은 담배 세포 배양을 통한 뉴캐슬병 바이러스에 대한 백신이며, 현재 국내에서 식물체를 이용한 재조합 항원의 생산이 허가된 예는 아직까지 없다.

## 결론

식물유래 재조합 경구백신 기술은 재조합 항원단백질을 식물체에서 안정적으로 발현시킴으로서 그에 따른 비용을 절감할 수 있으며, 그 안전성과 효율성 면에서 대체

백신으로서의 가능성이 매우 높은 연구분야라 하겠다. 하지만, 기존의 백신생산시스템에 비해 단백질 발현이나 정제수율이 매우 낮고 치료용 백신의 경우 기술개발 이후에도 상용화까지는 독성시험, 임상시험의 진행 및 생산을 위한 고비용 투자가 요구되는 단점이 있다. 그러나, 성공할 경우의 높은 부가가치를 감안할 때 인류건강 차원에서 지속적인 연구개발 및 투자가 이루어져야 하는 분야이다. 이를 위해 식물체 각각에 대한 강력한 프로모터의 개발이 중점적으로 수행되고, 백신 전달 및 GMO식물의 허용 또는 기술 자체의 안전성과 평가 등의 문제점들이 해결된다면 식물경구백신의 우수성이 조만간 실용화로 이어질 수 있으리라 여겨진다.

## 사 사

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업 및 한국생명공학연구원 기관고유사업의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Arakawa T, Chong DKX, Merritt JL, Langridge WHR (1997) Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Res* 6:403-413
- Arakawa T, Chong DKX, Langridge WHR (1998) Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nat Biotechnol* 16:292-297
- Arlen PA, Singleton M, Adamovicz JJ, Ding Y, Davoodi-Semiromi A, Daniell H (2008) Effective plague vaccination via oral delivery of plant cells expressing F1-V antigens in chloroplasts. *Infect Immun* 76:3640-3650
- Arntzen CJ, Coghlan A, Johnson B, Peacock J, Rodemeyer M (2003) GM crops: science, politics and communication. *Nat Rev Genet* 4:839-843
- Ashraf S, Singh PK, Yadav DK, Shahnawaz M, Mishra S, Sawant SV, Tuli R (2005) High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. *J Biotechnol* 22:1-14
- Aviezer D, Brill-Almon E, Shaaltiel Y, Hashmueli S, Bartfeld D, Mizrachi S, Liberman Y, Freeman A, Zimran A, Galun E (2009) A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme--a preclinical and phase I investigation. *Plos One* 4:e4792
- Beyer AJ, Wang K, Umble AN, Wolt JD, Cunnick JE (2007) Low-dose exposure and immunogenicity of transgenic maize expressing the *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit. *Environ Health Perspect* 115:354-360
- Biemelt S, Sonnewald U, Galmbacher P, Willmitzer L, Müller M (2003) Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J Virology* 77:9211-9220
- Carter JE, Langridge WHR (2002) Plant-based vaccines for protection against infectious and autoimmune diseases. *Crit Rev Plant Sci* 21:93-109
- Chaturvedi CP, Lodhi N, Ansari SA, Tiwari S, Srivastava R, Sawant SV (2007) Mutated TATA-box/TATA binding protein complementation system for regulated transgene expression in tobacco. *Plant J* 50:917-925
- Chikwamba R, Cunnick J, Hathaway D, McMurray J, Mason H, Wang K (2002) A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Transgenic Res* 11:479-493
- Choi NW, Estes MK, Langridge WH (2006) Synthesis of a ricin toxin B subunit-rotavirus VP7 fusion protein in potato. *Mol Biotechnol* 32:117-128
- Daniell H, Lee SB, Panchal T, Wiebe PO (2001) Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Mol Biol* 311:1001-1009
- Davoodi-Semiromi A, Schreiber M, Nalapalli S, Verma D, Singh ND, Banks RK, Chakrabarti D, Daniell H (2010) Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery. *Plant Biotechnol J* 8:223-242
- De Jaeger G, Scheffer S, Jacobs A, Zambre M, Zobell O, Goossens A (2002) Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nat Biotechnol* 20:1265-1268
- Dong JL, Liang BG, Jin YS, Zhang WJ, Wang T (2005) Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology* 1:153-163
- Fernández-San MA, Ortigosa SM, Hervás-Stubbs S, Corral-Martínez P, Seguí-Simarro JM, Gaétan J, Coursaget P, Veramendi J (2008) Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *J Plant Biotech* 6:427-441
- Fischer R, Schumann D, Zimmermann S, Drossard J, Sack M, Schillberg S (1999) Expression and characterization of bispecific single-chain Fv fragments produced in transgenic plants. *Eur J Biochem* 262:810-816
- Gao Y, Ma Y, Li M, Cheng T, Li SW, Zhang J, Xia NS (2003) Oral immunization of animals with transgenic cherry tomatillo expressing HBsAg. *World J Gastroenterol* 9:996-1002
- Golovkin M, Spitsin S, Andrianov V, Smirnov Y, Xiao Y, Pogrebnyak N, Markley K, Brodzik R, Gleba Y, Isaacs SN, Koprowski H (2007) Smallpox subunit vaccine produced in *Planta* confers protection in mice. *PNAS USA* 104:6864-6869
- Gómez N, Carrillo C, Parra F, Salinas J, Borca MV, Escribano M (1998) Expression of immunogenic glycoprotein S polypeptides from transmissible gastroenteritis coronavirus in transgenic plants. *Virology* 249:352-358
- Gómez N, Wigdorovitz A, Castañón S, Gil F, Ordás R, Borca MV (2000) Oral immunogenicity of the plant derived spike protein from swine-transmissible gastroenteritis coronavirus. *Arch*



- Virology 145:1725-1732
- Guertard D, Greco R, Cervantes Gonzalez M, Celli S, Kostrzak A, Langlade-Demoyen P, Sala F, Wain-Hobson S, Sala M (2008) Immunogenicity and tolerance following HIV-1/HBV plant-based oral vaccine administration. *Vaccine* 18:4477-4485
- Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produce in transgenic plants. *Science* 5:714-716
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356
- He ZM, Jiang XL, Qi Y, Lou DQ (2008) Assessment of the utility of the tomato fruit-specific E8 promoter for driving vaccine antigen expression. *Genetica* 133:207-214
- Huang TK, McDonald KA (2009) Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension culture. *Biochemical Engineering J* 45:168-184
- Huang Z, Dry I, Webster D, Strugnell R, Wesselingh S (2001) Plant-derived measles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 28:2163-2171
- Huber M, Baier W, Bessler WG, Heinevetter L (2002) Modulation of the Th1/Th2 bias by lipopeptide and saponin adjuvants in orally immunized mice. *Immunobiology* 205:61-73
- Jani D, Meena LS, Rizwan-ul-Haq QM, Singh Y, Sharma AK, Tyagi AK (2002) Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants. *Transgenic Res* 11:447-454
- Jiang XL, He ZM, Peng ZQ, Qi Y, Chen Q, Yu SY (2007) Cholera toxin B protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune response in mice. *Transgenic Res* 16:169-175
- Joung YH, Youm JW, Jeon JH, Lee BC, Ryu CJ, Hong HJ, Kim HC, Joung H, Kim HS (2004) Expression of the hepatitis B surface S and preS2 antigens in tubers of *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Rep* 22:925-930
- Kang TJ, Loc NH, Jang MO, Jang YS, Kim YS, Seo JE, Yang MS (2003) Expression of the B subunit of E. coli heat-labile enterotoxin in the chloroplasts of plants and its characterization. *Transgenic Res* 12:683-691
- Kapusta J, Modelska A, Pniewski T, Figlerowicz M, Jankowski K, Lisowa O, Plucienniczak A, Koprowski H, Legocki AB (2001) Oral immunization of human with transgenic lettuce expressing hepatitis B surface antigen. *Adv Exp Med Biol* 495:299-303
- Karaman S, Cunnick J, Wang K (2006) Analysis of immune response in young and aged mice vaccinated with corn-derived antigen against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Mol Biotechnol* 32:31-42
- Kim HS, Euym JW, Kim MS, Lee BC, Mook-Jung I, Jeon JH, Joung H (2003) Expression of human amyloid-beta peptide in transgenic potato. *Plant Science* 165:1445-1451
- Kim HS, Euym JW, Kim MS, Lee BC, Mook-Jung I, Jeon JH, Joung H (2003) Expression of human amyloid-beta peptide in transgenic potato. *Plant Science* 165:1445-1451
- Kim TG, Langridge WHR (2003) Assembly of cholera toxin B subunit full-length rotavirus NSP4 fusion protein oligomers in transgenic potato. *Plant Cell Rep* 21:884-890
- Kling M, Zeichner JA (2010) The role of the human papillomavirus (HPV) vaccine in developing countries. *Int J Dermatol* 49:377-379
- Kohl TO, Hitzeroth II, Christensen ND, Rybicki EP (2007) Expression of HPV-11 L1 protein in transgenic *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. *BMC Biotechnol* 12:7-56
- Kong Q, Richter L, Yang YF, Arntzen CJ, Mason HS, Thanavala Y (2001) Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *PNAS USA* 25:11539-11544
- Kumar GBS, Ganapathi TR, Revathi CJ, Srinivas L, Bapat VA (2005) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. *Planta* 222:484-493
- Kumar GBS, Ganapathi TR, Bapat VA (2007) Production of hepatitis B surface antigen in recombinant plant systems: an update. *Biotechnol Prog* 23:532-539
- Kwon JY, Cheon SH, Lee HR, Han JY, Kim DI (2009) Production of biopharmaceuticals in transgenic plant cell suspension cultures. *J Plant Biotechnol* 36:309-319
- Lambrecht BN, Kool M, Willart MA, Hammad H (2009) Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol* 21:23-29
- Lamphear BJ, Streatfield SJ, Jilka JM, Brooks CA, Barker DK, Turner DD, Delaney DE, Garcia M, Wiggins B, Woodard SL, Hood EE, Tizard IR, Lawhorn B, Howard JA (2002) Delivery of subunit vaccines in maize seed. *J Control Release* 13:169-180
- Lauterslager TGM, Florack DEA, van der Wal TJ, Molthoff JW, Langeveld JPM, Bosch D, Boersma WJA, Hilgers LAT (2001) Oral immunisation of naive and primed animals with transgenic potato tubers expressing LT-B. *Vaccine* 19:2749-2755
- Lentz EM, Segretin ME, Morgenfeld MM, Wirth SA, Dus Santos MJ, Mozgovej MV, Wigdorovitz A, Bravo-Almonacid FF (2010) High expression level of a foot and mouth disease virus epitope in tobacco transplastomic plants. *Planta* 231:387-395
- Li JT, Fei L, Mou ZR, Wei J, Tang Y, He HY, Wang L, Wu YZ (2006) Immunogenicity of a plant-derived edible rotavirus subunit vaccine transformed over fifty generations. *Virology* 356:171-178
- Liu HL, Li WS, Lei T, Zheng J, Zhang Z, Yan XF, Wang ZZ, Wang YL, Si LS (2005) Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in transgenic tobacco plants. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 37:153-158
- Lou XM, Yao QH, Zhang Z, Peng RH, Xiong AS, Wang HK (2007) Expression of the human hepatitis B virus large surface antigen gene in transgenic tomato plants. *Clin Vaccine Immunol* 14:464-469
- Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K, Vine ND, Chargelegue D, Yu L, Hein MB, Lehner T (1998) Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med* 4:601-606
- Mason HS, Lam DMK, Arntzen CJ (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *PNAS USA* 89:11745-11749
- Mason HS, Ball JM, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ (1996) Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic

- tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. PNAS USA 93:5335-5340
- Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ (1998) Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. Vaccine 16:1336-1343
- Marquet-Blouin E, Bouche FB, Steinmetz A, Muller CP (2003) Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.)-derived measles virus hemagglutinin. Plant Mol Biol 51:459-469
- Marusic C, Rizza P, Lattanzi L, Mancini C, Spada M, Belardelli F, Benvenuto E, Capone I (2001) Chimeric plant virus particle as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1. J Virol 75:8434-8439
- Matoba N, Kajiura H, Cherni I, Doran JD, Bomsel M, Fujiyama K, Mor TS (2009) Biochemical and immunological characterization of the plant-derived candidate human immunodeficiency virus type 1 mucosal vaccine CTB-MPR. Plant Biotechnol J 7:129-145
- McCornick AA, Kumagai MH, Hanley K, Turpen TH, Hakim I, Grill LK (1999) Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. PNAS USA 96:703-708
- McGarvey PB, Hammond J, Dienelt MM, Hooper DC, Fu ZF, Dietzschold B, Koprowski H, Michaels FH (1995) Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. Biotechnology (NY) 13:1484-1487
- Mishra S, Yadav DK, Tuli R (2006) Ubiquitin fusion enhances cholera toxin B subunit expression in transgenic plants and the plant-expressed protein binds GM1 receptors more efficiently. J Biotechnol 127:95-108
- Moravec T, Schmidt MA, Herman EM, Woodford-Thomas T (2007) Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. Vaccine 19:1647-1657
- Nemchinov LG, Liang TJ, Rifaat MM, Mazyad HM, Hadidi A, Keith JM (2000) Development of a plant-derived subunit vaccine candidate against hepatitis C virus. Arch Virol 145:2557-2573
- Nochi T, Takagi H, Yuki Y, Yang L, Masumura T, Mejima M (2007) Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. PNAS USA 104:10986-10991
- Nozoye T, Takaiwa F, Tsuji N, Yamakawa T, Arakawa T, Hayashi Y, Matsumoto Y (2009) Production of *Ascaris Suum* As14 protein and its fusion protein with cholera toxin B subunit in rice seeds. J Vet Med Sci 71:995-1000
- O'Brien GJ, Bryant CJ, Voogd C, Greenberg HB, Gardner RC, Bellamy AR (2000) Rotavirus VP6 expressed by PVX vectors in *Nicotiana benthamiana* coats PVX rods and also assembles into viruslike particles. Virology 10:444-453
- Oszwald M, Kang TJ, Tomoskozi S, Jenes B, Kim TG, Cha YS, Tamas L, Yang MS (2008) Expression of cholera toxin B subunit in transgenic rice endosperm. Mol Biotechnol 40:261-268
- Perrin Y, Vaquero C, Gerrard I, Sack M, Drossard J, Stoger E (2000) Transgenic pea seeds as bioreactors for the production of a single-chain Fv fragment (scFV) antibody used in cancer diagnosis and therapy. Mole Breed 6:345-352
- Philip R, Darnowski DW, Maughan PJ, Vodkin LO (2001) Processing and localization of bovine  $\beta$ -casein expressed in transgenic soybean seeds under control of a soybean lectin expression cassette. Plant Sci 161:323-335
- Pogrebnyak N, Golovkin M, Andrianov V, Spitsin S, Smirnov Y, Egolf R, Koprowski H (2005) Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine. PNAS USA 21:9062-9067
- Portocarrero C, Markley K, Koprowski H, Spitsin S, Golovkin M (2008) Immunogenic properties of plant-derived recombinant smallpox vaccine candidate pB5. Vaccine 9:5535-5540
- Ramirez YJ, Tasciotti E, Gutierrez-Ortega A, Donayre Torres AJ, Olivera Flores MT, Giacca M, Gómez Lim MA (2007) Fruit-specific expression of the human immunodeficiency virus type 1 tat gene in tomato plants and its immunogenic potential in mice. Clin Vaccine Immunol 14:685-692
- Reed SD, Schulman KA. (2009) Cost Utility of Sequential Adjuvant Trastuzumab for HER2/Neu-Positive Breast Cancer. Value Health 15:637-649
- Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS (2000) Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. Nat Biotechnol 18:1167-1171
- Rigano MM, Alvarez ML, Pinkhasov J, Jin Y, Sala F, Arntzen CJ, Walmsley AM (2004) Production of a fusion protein consisting of the enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit and a tuberculosis antigen in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Rep 22:502-508
- Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, de Jesús Olivera-Flores MT, López-Revilla R, Argüello-Astorga GR, Jiménez-Bremont JF, García-de la Cruz RF, Loyola-Rodríguez JP, Alpuche-Solís AG (2007) Expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin b subunit (LTB) in carrot (*Daucus carota* L.). Plant Cell Rep 26:969-976
- Santi L, Batchelor L, Huang Z, Hjelm B, Kilbourne J, Arntzen CJ, Chen Q, Mason HS (2008) An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles. Vaccine 28:1846-1854
- Sharma MK, Jani D, Thungapathra M, Gautam JK, Meena LS, Singh Y, Ghosh A, Tyagi AK, Sharma AK (2008) Expression of accessory colonization factor subunit A (ACFA) of *Vibrio cholerae* and ACFA fused to cholera toxin B subunit in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). J Biotechnol 20:22-27
- Shchelkunov SN, Salyaev RK, Pozdnyakov SG, Rekoslavskaya NI, Nesterov AE, Ryzhova TS, Sumtsova VM, Pakova NV, Mishutina UO, Kopytina TV, Hammond RW (2006) Immunogenicity of a novel, bivalent, plant-based oral vaccine against hepatitis B and human immunodeficiency viruses. Biotechnol Lett 28:959-967
- Shoji Y, Farrance CE, Bi H, Shamloul M, Green B, Manceva S, Rhee A, Ugulava N, Roy G, Musiychuk K, Chichester JA,

- Mett V, Yusibov V (2009) Immunogenicity of hemagglutinin from A/Bar-headed Goose/Qinghai/1A/05 and A/Anhui/1/05 strains of H5N1 influenza viruses produced in *Nicotiana benthamiana* plants. *Vaccine* 26:3467–3470
- Sojikul P, Buehner N, Mason HS (2003) A plant signal peptide-hepatitis B surface antigen fusion protein with enhanced stability and immunogenicity expressed in plant cells. *PNAS USA* 4:2209–2214
- Song X, Hu S (2009) Adjuvant activities of saponins from traditional Chinese medicinal herbs. *Vaccine* 6:4883–4890
- Spitsin S, Andrianov V, Pogrebnyak N, Smirnov Y, Borisjuk N, Portocarrero C, Veguilla V, Koprowski H, Golovkin M (2009) Immunological assessment of plant-derived avian flu H5/HA1 variants. *Vaccine* 25:1289–1292
- Srinvas L, Sunil Kumar GB, Ganapathi TR, Revathi CJ, Bapat VA (2008) Transient and stable expression of hepatitis B surface antigen in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant Biotech Rep* 2:1–6
- Stevens LH, Stoop GM, Elbers IJ, Molthoff JW, Bakker HA, Lommen A, Bosch D, Jordi W (2000) Effect of climate conditions and plant developmental stage on the stability of antibodies expressed in transgenic tobacco. *Plant Physiol* 124:173–182
- Stoger E, Ma JK, Fischer R, Christou P (2005) Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Curr Opin Biotechnol* 16:167–173
- Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Clements JD, Levine MM, Arntzen CJ (1998) Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in transgenic potato. *Nat Med* 4:607–609
- Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM, Arntzen CJ (2000) Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J Infect Dis* 182:302–305
- Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM, Arntzen CJ (2000) Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J Infect Dis* 182:302–305
- Tacket CO, Pasetti MF, Edelman R, Howard JA, Streatfield S (2004) Immunogenicity of recombinant LT-B delivered orally to humans in transgenic corn. *Vaccine* 22:4385–4389
- Thanavala Y, Yang YF, Lyons P, Mason HS, Arntzen C (1995) Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *PNAS USA* 11:3358–3361
- Thanavala Y, Mahoney M, Pal S, Scott A, Richter L, Natarajan N (2005) Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *PNAS USA* 102:3378–3382
- Thanavala Y, Lugade AA (2010) Oral transgenic plant-based vaccine for hepatitis B. *Immunol Res* 46:4–11
- Tiwari S, Mishra DK, Singh A, Singh PK, Tuli R (2008) Expression of a synthetic cryIEC gene for resistance against *Spodoptera litura* in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Rep* 27:1017–1025
- Torres E, Vaquero C, Nicholson L, Sack M, Stöger E, Drossard J, Christou P, Fischer R, Perrin Y (1999) Rice cell culture as an alternative production system for functional diagnostic and therapeutic antibodies. *Transgenic Res* 8:441–449
- Tuboly T, Nagy E (2001) Construction and characterization of recombinant porcine adenovirus serotype 5 expressing the transmissible gastroenteritis virus spike gene. *J Gen Virol* 82:183–190
- Varsani A, Williamson AL, Rose RC, Jaffer M, Rybicki EP (2003) Expression of Human papillomavirus type 16 major capsid protein in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *Archives of Virology* 148:1771–1786
- Walmsley AM, Alvarez ML, Jin Y, Kirk DD, Lee SM, Pinkhasov J, Rigano MM, Arntzen CJ, Mason HS (2003) Expression of the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as a fusion protein in transgenic tomato. *Plant Cell Rep* 21:1020–1026
- Wampler DE, Lehman ED, Boger J, McAleer WJ, Scolnick EM (1985) Multiple chemical forms of hepatitis B surface antigen produced in yeast. *PNAS USA* 82:6830–6834
- Wang XG, Zhang GH, Liu CX, Zhang YH, Xiao CZ, Fang RX (2001) Purified cholera toxin B subunit from transgenic tobacco plants possesses authentic antigenicity. *Biotechnol Bioeng* 20:490–494
- Warzecha H, Mason HS, Lane C, Tryggvesson A, Rybicki E, Williamson AL, Clements JD, Rose RC (2003) Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *J Virology* 77:8702–8711
- Webster DE, Thomas MC, Huang Z, Wesselingh SL (2005) The development of a plant-based vaccine for measles. *Vaccine* 7:1859–1865
- Webster DE, Smith SD, Pickering RJ, Strugnell RA, Dry IB, Wesselingh SL (2006) Measles virus hemagglutinin protein expressed in transgenic lettuce induces neutralising antibodies in mice following mucosal vaccination. *Vaccine* 24:3538–3544
- Wigdorovitz A, Carrillo C, Dus Santos MJ, Trono K, Peralta A, Gómez MC (1999) Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology* 255:347–353
- Wu HY, Russell MW (1998) Induction of mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine* 16:286–292
- Wu YZ, Li JT, Mou ZR, Fei L, Ni B, Geng M, Jia ZC, Zhou W, Zou LY, Tang Y (2003) Oral immunization with rotavirus VP7 expressed in transgenic potatoes induced high titers of mucosal neutralizing IgA. *Virology* 1:337–342
- Xiao C, Rajput ZI, Hu S (2007) Improvement of a commercial foot-and-mouth disease vaccine by supplement of Quil A. *Vaccine* 15:4795–4800
- Yang ZQ, Liu QQ, Pan ZM, Yu HX, Jiao XA (2007) Expression of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus in transgenic rice and its immunogenicity in mice. *Vaccine* 8:591–598
- Youm JW, Kim H, Han JHL, Jang CH, Ha HJ, Mook-Jung I, Jeon

- JH, Choi CY, Kim YH, Kim HS, Joung H (2005) Transgenic potato expressing A $\beta$  reduce A $\beta$  burden in Alzheimer's disease mouse model. *FEBS Lett* 579:6737-6744
- Youm JW, Won YS, Jeon JH, Ryu CJ, Choi YK, Kim HC, Kim BD, Joung H, Kim HS (2007) Oral immunogenicity of potato-derived HBsAg middle protein in BALB/c mice. *Vaccine* 5:577-584
- Youm JW, Jeon JH, Kim H, Kim YH, Ko K, Joung H, Kim HS (2008) Transgenic tomatoes expressing human beta-amyloid for use as a vaccine against Alzheimer's disease. *Biotechnol Lett* 30:1839-1845
- Youm JW, Jeon JH, Kim H, Min SR, Kim MS, Joung H, Jeong WJ, Kim HS (2010) High-level expression of a human beta-site APP cleaving enzyme in transgenic tobacco chloroplasts and its immunogenicity in mice. *Transgenic Res* 15
- Yu J, Langridge W (2003) Expression of rotavirus capsid protein VP6 in transgenic potato and its oral immunogenicity in mice. *Transgenic Res* 12:163-169
- Zhang X, Buehner NA, Hutson AM, Estes MK, Mason HS (2006) Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein. *Plant Biotechnol J* 4:419-432