

تولید واکسن‌های گیاهی و آزمایش‌های انجام شده در این مورد به عنوان راهبردی مؤثر جهت مقابله با بیماری‌های عفونی از جمله کووید ۱۹

آزاده نیک‌نژاد، علی‌رضا شفیعی‌زاده اسفندآبادی و فاطمه عبدالهی سروستانی

دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: آزاده نیک‌نژاد، niknejad@khu.ac.ir

چکیده. ظهور ویروس‌های جدید، همواره تهدیدی برای سلامتی افراد جهان بوده است که جدیدترین نمونه آن سویه‌های جدید ویروس کرونا (SARS-CoV-2) و سندروم حاد تنفسی ناشی از آن (ARDS) است. وضعیت کنونی، اهمیت تولید سریع واکسن‌های پایدار ارزان قیمت را که به تجهیزات خنک‌کننده به منظور نگهداری و حمل و نقل نیاز ندارند، بیش از پیش نشان می‌دهد. با این حال در کشورهای در حال توسعه، بیشتر واکسن‌ها هنوز به دلیل هزینه‌های واردات و نیازهای نگهداری و حمل و نقل در دسترس نیستند. بنابراین مهم است که واکسن برای کشورهای در حال توسعه مقرون به صرفه باشد تا واکسیناسیون در مقیاسی وسیع صورت گیرد. واکسن‌های گیاهی نسبت به سایر انواع واکسن و روش‌های تولیدی مقرون به صرفه‌تر هستند و می‌توانند در مقادیر زیاد تولید شوند. علاوه بر این واکسن‌های گیاهی مزایای دیگری هم دارند که در این مقاله به آنها پرداخته می‌شود. با این حال با توجه به اینکه یک محصول دارویی گیاهی قرار است به صورت نیمه فرآوری شده (مانند پوره سیب‌زمینی یا رب گوجه‌فرنگی) به‌عنوان واکسن مصرف شود، مهم است که بررسی‌های نظارتی خاصی که برای واکسن‌های تزریقی اعمال می‌شود، برای این محصولات نیز اعمال شود تا عوارض مصرف آنها از نظر بالینی بررسی شود. مقاله مروری حاضر به بررسی فرصت‌ها و چالش‌های تولید واکسن‌های گیاهی به منظور مقابله با بیماری‌هایی مانند کووید ۱۹ می‌پردازد.

واژه‌های کلیدی. بیماری کووید-۱۹، سندروم حاد تنفسی ۲، کشاورزی مولکولی، گیاه تراریخته، واکسن خوراکی

Plant-based vaccines production and conducted experiments in this case, as an effective strategy to combat infectious diseases, such as Coronavirus disease (COVID-19)

Azadeh Niknejad, Alireza Shafizadeh EsfandAbadi & Fatemeh Abdollahi Sarvestani

Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Correspondent author: Azadeh Niknejad, niknejad@khu.ac.ir

Abstract. The emergence of new viruses has always been a threat to the health of people around the world, the latest example of it is the new strains of the coronavirus (SARS-CoV-2) and the resulting acute respiratory distress syndrome (ARDS). The current situation underscores the importance of rapidly producing low-cost stable vaccines that do not require refrigeration equipment for storage and transportation. However, most vaccines are not yet available in developing countries due to import costs and storage and transportation needs. Therefore, the vaccine must be affordable for developing countries so that vaccination can be carried out on a large scale. Herbal vaccines are more cost-effective than other types of vaccines and production methods and can be produced in large quantities. In addition, herbal vaccines have other benefits that are discussed in this article. However, given that an herbal medicinal product is to be used as a vaccine in a semi-processed form (such as mashed potatoes or tomato paste), specific regulatory reviews must apply to injectable vaccines. Products should also be applied to evaluate their side effects clinically. The current review article investigates the opportunities and challenges of producing plant-based vaccines to deal with diseases like Coronavirus disease (COVID-19).

Key words. Coronavirus disease (COVID-19), Molecular farming, Oral vaccine, SARS-CoV-2 virus, Transgenic plant

مقدمه

در حال حاضر، جهان جمعیتی حدود بیش از ۷/۹ میلیارد نفر دارد و اکثریت افراد نیازمند راه‌حلی مقرون به صرفه از نظر بهداشت و سلامت هستند (Zaer & Kolivand, 2019). از آنجایی که بیشتر واکسن‌ها در کشورهای توسعه نیافته تولید نمی‌شوند، عرضه آنها به این کشورها گران، کند و اغلب به سختی انجام می‌شود (Hefferon, 2014). در نتیجه بدون در نظر گرفتن کمک سایر کشورهای پیشرفته‌تر، اغلب بیشتر واکسن‌ها در این کشورها به دلیل هزینه‌های واردات و نیاز به نگهداری در یخچال و حمل و نقل در دمای پایین به نسبت گران هستند. این منجر به حذف واکسن‌هایی می‌شود که برای ایمن‌سازی عموم مردم ضروری هستند. بنابراین مهم است که واکسن برای کشورهای در حال توسعه مقرون به صرفه باشد تا واکسیناسیون در مقیاسی وسیع صورت گیرد (Shahid & Daniell, 2016). لذا نیاز به روش‌های جایگزین تولید واکسن وجود دارد (Hefferon, 2014). در این شرایط واکسن‌های گیاهی خوراکی پتانسیل خوبی به خصوص برای مصرف در کشورهای جهان سوم دارد زیرا هزینه‌های حمل و نقل آنها کمتر است و توزیع واکسن نیاز به پرسنل و شرایط تزریقی استریل ندارد (Zaer & Kolivand, 2019).

استراتژی‌های تولید واکسن‌های گیاهی

بسیاری از واکسن‌های گیاهی خوراکی به‌عنوان تقویت کننده سیستم‌های ایمنی استفاده می‌شوند. امروزه برای تولید واکسن‌های گیاهی برای این منظور از سیستم‌ها و روش‌های مختلفی استفاده می‌شود (Chan et al., 2016) (جدول ۱). با توجه به اینکه روش‌های متعددی به منظور تولید واکسن گیاهی وجود دارد، درباره اینکه کدام روش بیان به منظور تولید واکسن گیاهی بهتر است، باید در نظر گرفت که کدام گونه گیاهی و سیستم بیان بهترین تناسب را در هر شرایطی دارد (Hefferon, 2014). موضوع کلیدی در مورد واکسن‌های گیاهی امکان خوراکی بودن واکسن است. در این مورد، زمانی که واکسن به صورت خوراکی مصرف می‌شود، انتظار می‌رود آنتی‌ژن‌ها از طریق Bioencapsulation، در برابر اسیدها و آنزیم‌های معده محافظت شوند، زیرا آنزیم‌های گوارشی انسان قادر به شکستن پیوندهای گلیکوزیدی در کربوهیدرات‌های تشکیل دهنده دیواره سلولی گیاهی نیستند. با این حال، زمانی که سلول‌های گیاهی سالم حاوی واکسن به روده می‌رسند، میکروب‌های معمولی، دیواره سلولی را هضم کرده و آنتی‌ژن‌ها را آزاد می‌کنند و باعث ایجاد پاسخ ایمنی می‌شوند. همچنین هنگامی که آنتی‌ژن‌ها با اجزای مخاطی مناسب (مانند زیرواحد B توکسین وبا) ترکیب

می‌شوند، به‌طور موثرتری به سیستم ایمنی ارائه می‌شوند. در میان میزبان‌های گیاهی ثابت شده است که سیب زمینی تراریخته یک سیستم بیانی عالی است که می‌تواند به منظور تولید واکسن گیاهی خوراکی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین به منظور تولید واکسن گیاهی خوراکی، از گوجه فرنگی اصلاح ژنتیکی شده برای تولید واکسن هاری استفاده شده است (Monreal-Escalante et al., 2022). اگر چه بسیاری از میزبان‌های گیاهی برای تولید بیولوژیک مورد بررسی قرار گرفته‌اند، اما در حال حاضر *Nicotiana benthamiana* به‌عنوان میزبان اصلی شناخته شده است (LeBlanc et al., 2020).

روش‌های فعلی بیان برای پروتئین‌های نوترکیب که از سلول‌های گیاهی به‌عنوان میزبان استفاده می‌کنند به سه دسته کلی تقسیم‌بندی می‌شوند که شامل تراریخته شدن پایدار هسته سلول‌های گیاهی یا کلروپلاست و تراریخته شدن موقت گیاهان است که در ادامه به توضیح هر یک از آنها پرداخته می‌شود (Rosales-Mendoza et al., 2020) (جدول ۲).

تولید واکسن گیاهی با استفاده از تراریخته کردن و بیان پایدار آنتی‌ژن در گیاه

برای سال‌های متمادی، ژنوم هسته‌ای هدف اصلی مطالعات انتقال ژن گیاهی بوده است که باعث شده است تا تولید آنتی‌ژن‌های واکسن نوترکیب با تراریخته کردن هسته در گیاهان به نسبت به آسانی انجام شود. این روش به نسبت به زمان بیشتری برای تولید رده‌های تولیدکننده آنتی‌ژن نیاز دارد. با این وجود، این روش از نظر هزینه، سهولت حمل و نقل و ایمنی‌زایی مناسب است و همین موارد باعث شده است که امکان توسعه واکسن‌های گیاهی خوراکی با استفاده از این روش فراهم شود. با استفاده از این روش انواعی از واکسن‌های گیاهی علیه وبا و برخی دیگر از بیماری‌های روده‌ای و ویروسی و البته علیه بیماری‌های مشترک بین انسان و دام مانند سل، سارس، لیستریوزیس و مالاریا تولید شده است (Meriç et al., 2021; Shahid & Daniell, 2016) (جدول ۳).

تولید واکسن گیاهی با استفاده از تراریخته کردن و بیان موقت آنتی‌ژن در گیاه

بیان موقت ژن جایگزینی سریع و قابل دست‌ورزی برای گیاهان تغییر ژنتیکی داده شده است. در ابتدا، بیان موقت در گیاه با استفاده از روش *Agroinfiltration* برای ارزیابی میزان بیان پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان مختلف به منظور انتخاب بهترین رده‌های گیاهی تراریخته انجام می‌شد. برای این منظور، سوسپانسیون *Agrobacterium* به سمت پشته برگ‌ها نفوذ می‌کند (شکل ۱).

جدول ۱- فهرست گزینه‌های بیان در سیستم‌های گیاهی (Niknejad, 2018).

Table 1. List of expression options in plant systems (Niknejad, 2018)

| گزینه‌های موجود جهت بیان در سیستم‌های گیاهی |
|---|
| انواع گیاهان میزبان |
| تک‌لپه‌ای / دولپه‌ای |
| خوراکی / غیرخوراکی |
| انواع روش‌های تراریخته کردن گیاه |
| از نظر ساختار زیستی ناقل (ویروسی / باکتریایی) |
| از نظر فیزیکی (مباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی، الکتروپوریشن، Agrobacterium infiltration (نفوذ با استفاده از تزریق و یا خلأ) |
| روش‌های بیان |
| پایدار / موقت (گذرا) |
| بیان پایه به میزان یکسان در تمام بافت‌های گیاه / بیان بیشتر در بافتی خاص از گیاه |
| محل بیان |
| کل پیکره گیاه |
| بافتی خاص از گیاه |
| بیان با استفاده از کشت رده سلولی خاص گیاهی |
| محل بیان و تجمع در سلول |
| سیتوپلاسم / آپوپلاست |
| پلاست‌ها |
| سایر اندامک‌ها |

وزن بافت گیاهی است (Mardanov et al., 2017). اما از این بین مزیت اصلی این روش تولید سریع واکسن است. تولید سریع واکسن با استفاده از این روش نه تنها برای تولید داروهای شخصی‌سازی شده بلکه به منظور مقابله با تهدیدات همه‌گیر امکان‌پذیر است.

پیشرفت‌هایی در روش بیان موقت در سال‌های اخیر گزارش شده است که امکان بیان میزان بی‌سابقه پروتئین را طی ۱ تا ۲ هفته فراهم می‌کند (Wang & Ma, 2012). با استفاده از سیستم‌های بیان موقت که بالاترین بازده بیان پروتئین را دارند می‌توان واکسن‌های خوراکی و تزریقی تولید کرد. این روش در حال حاضر در مقیاس صنعتی برای تولید واکسن‌های VLP به‌کار گرفته شده است (Shahid & Daniell, 2016). واکسن‌های گیاهی که با استفاده از این روش تولید شده‌اند در جدول ۴ آورده شده است (Meriç et al., 2021).

تولید واکسن گیاهی با استفاده از تغییر ژنتیکی کلروپلاست کاربرد اصلی استفاده از واکسن‌های گیاهی به منظور تقویت‌کننده تولید واکسن برای مقابله با ویروس‌های مختلف و به طور خاص ویروس فلج اطفال بوده است. یک روش تولید واکسن خوراکی برای مقابله با این ویروس‌ها، تولید آنتی‌ژن آن در کلروپلاست کاهوی خوراکی بود. تغییر ژنتیکی کلروپلاست اولین تغییر ژنتیکی یک سلول گیاهی بود.

گیاهی که بیشتر برای این آزمایش‌ها استفاده می‌شود *N. benthamiana* است، اما *Nicotiana tabacum* و همچنین گیاهان دیگری مانند *Arabidopsis thaliana*، گوجه فرنگی یا کاهو نیز می‌توانند استفاده شوند. علاوه بر انتخاب گونه‌های گیاهی، مرحله نمو و وضعیت فیزیولوژیکی گیاهانی که ژن به آنها وارد شده می‌تواند تأثیر عمده‌ای بر سطح بیان پروتئین‌های هدف داشته باشد. هنگامی که تزریق *Agrobacterium* به همراه یک مهارکننده سرکوب‌کننده بیان ژن پس از رونویسی (Post-transcriptional gene silencing) مانند HcPro و ویروس Y سیب‌زمینی انجام می‌شود، میزان بیان افزایش می‌یابد. به دلیل میزان و سرعت تولید بیشتر بیان پروتئین، این روش با روش نفوذ در بافت گیاهی با استفاده از خلأ توسعه داده شده است (Wang & Ma, 2012).

روش‌های بیان موقت با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* و یا ویروس‌های گیاهی، با هیبریدهایی که مزایای هر دو را دارند، منجر به توجه دوباره به واکسن‌های گیاهی شده است. زیرا بیان موقت در گیاهان می‌تواند بسیار سریع‌تر از تخمیر یا روش‌های مبتنی بر تخم مرغ که برای تولید واکسن آنفلوانزا از آنها استفاده می‌شود، به همه‌گیری‌های در حال ظهور یا بیوتوررسم پاسخ دهد. مزایای این روش سهولت دست‌ورزی، سرعت بیشتر، هزینه کم و به‌طور معمول بیان بیشتر پروتئین نسبت به گیاهان تراریخته به ازای

جدول ۲- روش‌های بیان پروتئین در گیاهان برای تولید واکسن گیاهی و سوابق آزمایش بر MERS و SARS (Rosales-Mendoza et al., 2020).

Table 2. Description of the expression approaches for the production of plant-based vaccines and precedents for MERS/SARS-CoV-1 vaccines (Rosales-Mendoza et al., 2020).

| روش | مزایا | معایب | آنتی‌ژن هدف | سابقه بیان پروتئین‌های MERS/SARS |
|----------------------------------|--|--|-----------------------------------|--|
| تاریخته کردن پایدار ژنوم هسته‌ای | بیان قابل توارث آنتی‌ژن؛ تولید بانک بذریه؛ اصلاحات پس از ترجمه انجام می‌شود؛ برای گونه‌های مختلف روش‌های متفاوتی وجود دارد که بسته به نوع گونه می‌توان از روش خاصی استفاده کرد و بنابراین از نظر روش‌های موجود تنوع وجود دارد. | ورود غیراختصاصی ژن به داخل ژنوم؛ انتقال افقی ژن امکان‌پذیر است؛ بیان ژن تحت‌تأثیر عوامل خاموش‌کننده یا مکان ژنی است؛ تاریخته کردن زمان زیادی می‌برد. | پروتئین S؛ واکسن‌های چند اپی‌توپی | بخش انتهایی آمینو پروتئین SARS-CoV-1 S (S1) در گوجه‌فرنگی و گیاهان تنباکوی کم نیکوتین که با استفاده از این روش تاریخته شده بودند بیان شد که باعث القای پاسخ‌های IgG و IgA در موش شد. |
| تاریخته کردن موقت ژنوم هسته‌ای | تولید سریع؛ بهره‌وری بالا؛ در مقیاس صنعتی اجرا می‌شود. | بانک بذر نمی‌تواند ایجاد شود؛ برای از بین بردن ترکیبات و بقایای سمی میزبان و آگروباکتریوم نیاز به خالص‌سازی آنتی‌ژن دارد. | پروتئین S واکسن‌های چند اپی‌توپی | یک پروتئین نوترکیب ناشی از GFP و اسیدهای آمینه ۱ تا ۶۵۸ از پروتئین SARS-CoV-1 S (S1:GFP) به‌طور موقت در برگ‌های تنباکوی تاریخته شده با استفاده از این روش بیان شد. پروتئین SARS-CoV-1 N به‌طور موقت در <i>Nicotiana benthamiana</i> بیان شد، که در موش‌ها سطوح بالایی از IgG1 و IgG2a و افزایش IFN- γ و IL-10 در سلول‌های طحال را القا کرد. |
| فناوری تاریخته کردن پلاست‌ها | بهره‌وری بالا؛ بیان چندژنی امکان‌پذیر است؛ ایمنی زیستی بهبود یافته زیرا ژنوم تاریخته در این روش فقط از طریق گیاه مادر به ارث می‌رسد بنابراین کنترل آن راحت‌تر است؛ امکان ایجاد نوترکیبی هدفمند و وارد کردن ژن مورد نظر به صورت اختصاصی؛ تحت تأثیر عوامل خاموش‌کننده یا مکان ژنی قرار نمی‌گیرد. | تغییرات پیچیده پس از ترجمه انجام نمی‌شود؛ روش‌های تاریخته کردن برای چند گونه موجود است و تولید رده‌های مختلف با استفاده از این روش‌ها زمان زیادی می‌برد. | واکسن‌های چند اپی‌توپی | و پروتئین GFP یک پروتئین نوترکیب از SARS-CoV-1 S (S1:GFP) در گیاهان تنباکوی دارای پلاست‌های تاریخته بیان شد. |
| | | | | به‌طور موقت در گیاهان SARS-CoV-1 S (S1:GFP) بیان شدند. <i>N. benthamiana</i> موقت در خاصیت آنتی‌ژنی داشت. N پروتئین |

ویروس‌های گیاهی توانایی‌های مختلفی دارند. از یک طرف، می‌توانند باعث خاموشی ژنی خاص شوند و از سوی دیگر، مکانیسم‌هایی را ایجاد می‌کنند که خاموشی ژن خاصی را سرکوب می‌کنند و باعث تجمع میزبان زیادی پروتئین ویروسی در گیاهان آلوده شده می‌شوند که از آن برای دستکاری ویروس‌های گیاهی برای کشاورزی مولکولی در گیاهان استفاده می‌شود. در مقایسه با سایر روش‌های تاریخته کردن که اغلب یازدهمی و میزان بیان ناشی از آن‌ها کم است و نیاز به انجام فرآیندهای زمان‌بر است، روش بیان با استفاده از ویروس‌های گیاهی مزیت‌هایی از جمله سهولت و سرعت دارند و در برخی از روش‌ها که با استفاده از وکتورهای ویروسی به تولید واکسن‌های گیاهی می‌پردازند، از بدست آوردن توالی DNA یک پاتوژن ویروسی تا تولید زیرواحدهای آنتی‌ژنی واکسن علیه آن فقط به چند هفته زمان نیاز دارند (Wang & Ma, 2012). در واقع بیان موقت با استفاده از وکتورهای ویروسی از بهترین و سریع‌ترین روش‌های

این تغییرات ژنتیکی ابتدا با استفاده از روش‌های بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی انجام می‌شود. در حال حاضر، تولید آنتی‌ژن در کلروپلاست مزایایی از جمله تولید پروتئین نوترکیب بیشتر دارد که به تعداد کمی‌های ژنوم کلروپلاست در گیاه بستگی دارد. بنابراین، کلروپلاست می‌تواند برای تولید پروتئین برای واکسن‌های Subunit استفاده شود. اما کلروپلاست، قادر به انجام اصلاحات پس از ترجمه نیست. بنابراین، این روش از این نظر برای تولید واکسن‌ها دارای نقطه ضعف است (Monreal-Escalante et al., 2022). امروزه با تغییر ژنتیکی کلروپلاست، می‌توان واکسن‌هایی علیه بیماری‌های ویروسی مانند فلج اطفال، نقص ایمنی انسانی (HIV)، ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) و همچنین بسیاری از عفونت‌ها و بیماری‌های باکتریایی مسری و کشنده مانند وبا، سل، طاعون و سیاه زخم تولید کرد (جدول ۵) (Meriç et al., 2021).

استفاده از وکتورهای ویروسی به منظور تولید واکسن‌های گیاهی

جدول ۳- واکنش‌های گیاهی ساخته شده توسط سیستم تراریخته کردن هسته‌ای/ بیان پایدار (Meriç et al., 2021).

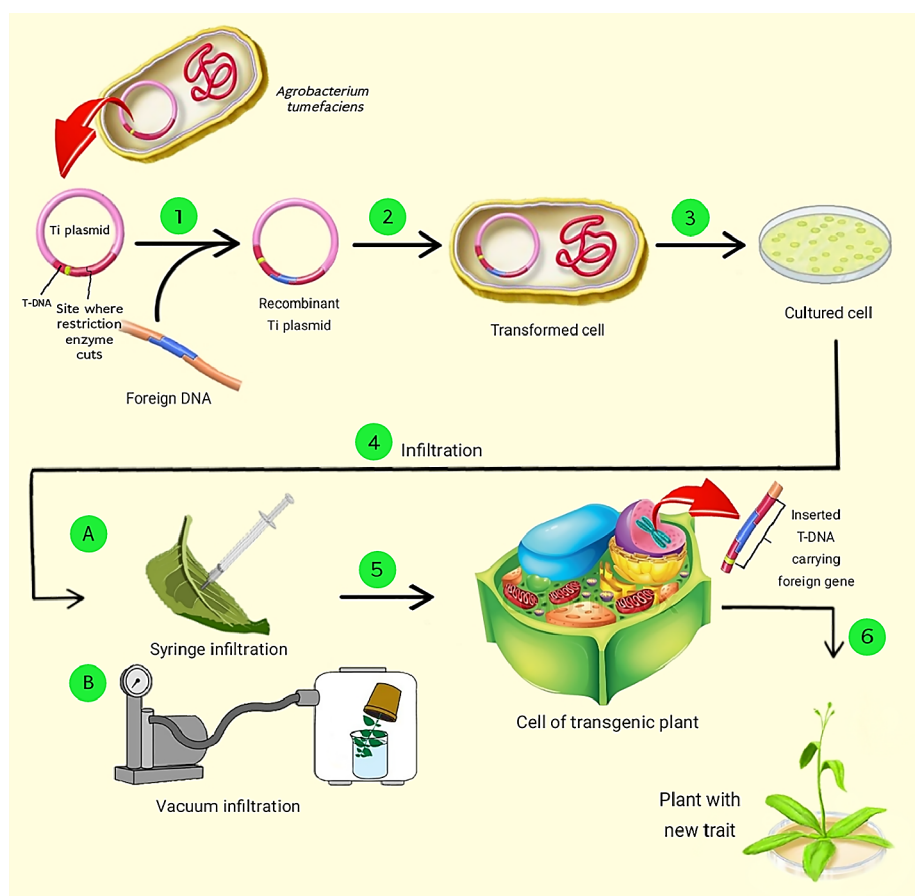
Table 3. Plant-based vaccines developed by nuclear transformation/ stable expression system (Meriç et al., 2021).

| گیاه | پاتوژن (بیماری) | آنتی‌ژن | روش انتقال | درصد کل پروتئین محلول یا میکروگرم آنتی‌ژن به ازای هر گرم زیست توده تازه | ادجوانت (داروی کمکی) | روش ایمن سازی | ارگانیزم هدف | پاسخ ایمنی |
|---|---|-------------------------------|--|--|--|--|--------------|-------------------------------------|
| <i>Lactuca sativa</i> | ویروس هپاتیت B | آنتی‌ژن سطحی کوچک (S- HBsAg) | راه‌انداز ۳۵S ویروس موزاییک گل کلم (Cam V 35S) با واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | ۲۲-۶۳ میکروگرم به ازای هر گرم وزن توده تازه | ژل آلومینیوم هیدروکسید | قرص خوراکی یا تزریق عضلانی (در مجموع ۲۰۰ نانوگرم) | انسان | IgA |
| <i>Physcomitrella patens</i> | ویروس نقص ایمنی انسان یا HIV (ایدز) | Gp120 و متصل Gp41 poly-HIV | PEG با واسطه پروتوپلاست | ۳/۷ میکروگرم به ازای هر گرم وزن توده تازه | ادجوانت کامل و ناقص Freund | تزریق زیرجلدی (۳۴ نانوگرم) | انسان | IgG |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (سل) | پروتئین ترکیبی TBAG-ELP | راه‌انداز ۳۵S ویروس موزاییک گل کلم (Cam V 35S) با واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | ۴٪ کل پروتئین-های محلول | ادجوانت کامل و ناقص Freund | داخل صفاقی (برای موش ۱۰ میکروگرم، برای خوکچه ۳۶۰ میکروگرم) | انسان | IgG |
| <i>Lactuca sativa</i> | ویروس سرخک | هماگلوتینین ویروس سرخک (MV-H) | با واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | در دسترس نیست | فقط در صورت استفاده داخل بینی با ادجوانت (ساپونین خام) | داخل بینی (۴۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در کل پروتئین محلول) داخل صفاقی (۴۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در کل پروتئین محلول) تزریق عضلانی (۵۰ میکروگرم تک دوز) | انسان (بچه) | IgG |
| <i>Solanum tuberosum</i> | IBV (برونشیت عفونی) | پروتئین اسپایک (S) | راه‌انداز ۳۵S ویروس موزاییک گل کلم (Cam V 35S) با واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | ۲/۵ میکروگرم به ازای هر گرم وزن غده تازه | بدون داروی کمکی | خوراکی (۳۵ گرم) عضلانی (۳۵ گرم عصاره) | طیور | chIL-2 |
| <i>Solanum tuberosum/ Lycopersicon esculentum</i> | Norwalk virus | پروتئین کپسید نوترکیب rNV | تقویت کننده دوگانه راه‌انداز ۳۵S با واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | ۱۲۰ میکروگرم به ازای هر گرم وزن توده تازه ۱۵۰ میکروگرم به ازای هر گرم وزن توده تازه | بدون داروی کمکی | خوراکی (۵ گرم وزن خشک) | انسان | لقای تولید در IgG سرم و IgA در روده |
| <i>Zea mays</i> | ویروس هاری | پروتئین G | راه‌انداز یوبیکوتین ذرت/ تراریخته کردن با استفاده از روش بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | ۲۵ میکروگرم به ازای هر گرم وزن توده تازه | بدون داروی کمکی | خوراکی (۰/۵ میلی‌گرم در ۵ دانه ذرت) | انسان و سگ | اطلاعاتی در این مورد در دسترس نیست. |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> | پروتئین LT B entero | راه‌انداز ۳۵S ویروس موزاییک گل کلم (Cam V 35S) با واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | ۵/۲۹ میکروگرم به ازای هر گرم وزن توده تازه | ادجوانت کامل یا ناقص Freund | زیرجلدی (۱۰ میلی-گرم) | انسان | لقای تولید در IgG و IgA مخاطی |

جدول ۴- واکسن‌های گیاهی ساخته شده توسط سیستم بیان موقت (Meriç et al., 2021).

Table 4. Plant-based vaccines developed by a transient expression system. (Meriç et al., 2021).

| گیاه | پاتوژن (بیماری) | آنتی‌ژن | روش انتقال ژن | محلول یا میکروگرم آنتی‌ژن به ازای هر گرم زیست توده تازه | ادجوانت | روش ایمن سازی | ارگان‌بسم هدف | پاسخ ایمنی |
|------------------------------|--|--|--|---|----------------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| <i>Nicotiana benthamiana</i> | HPV-16 (سرطان دهانه رحم) | E7 متصل به E7SH16 | به واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | ۶-۰/۴ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن توده تازه | ادجوانت ناقص Freund | زیرجلدی (۵ میکروگرم) | انسان | کاهش اندازه تومور و ترشح IgG |
| <i>Nicotiana benthamiana</i> | ویروس هپاتیت B | HBsAg | ناقلان ویروسی با MagnICON / واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | ۰/۶۴ میلی‌گرم به ازای هر گرم وزن توده تازه | ژل آلومینیوم هیدروکسید | داخل صفاقی (۳۴۶ mIU/mL در هفته) | انسان | پاسخ ضد HBsAg |
| <i>Nicotiana benthamiana</i> | HIV (ایدز) | Subtype C Envelope gp140 | به واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | ۶/۲-۴/۹ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن توده تازه | ژل آلومینیوم هیدروکسید | عضلانی (۵۰ میکروگرم) | انسان | در دسترس نیست |
| <i>Nicotiana benthamiana</i> | ویروس فلج اطفال نوع ۳ | پروتئین کپسیدی VP1 | به واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن توده تازه | - | صفاقی / عضلانی | انسان | - |
| <i>Nicotiana benthamiana</i> | IBDV (بیماری عفونی) | پروتئین ساختاری VP2 | به واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | ۱٪ کل پروتئین محلول | ادجوانت کامل و ناقص Freund | میکروگرم از پروتئین ساختاری (VP2) | طیور | در دسترس نیست |
| <i>Nicotiana benthamiana</i> | ویروس بیماری پا و دهان | ترکیب پیش‌ساز پروتئین P1-2A و پروتئاز 3C | به واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | ۳-۴ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم توده تازه | Montanide ISA 50 | تزریق داخل صفاقی (۵۰۰ نانوگرم) | حیوانات تولید کننده گوشت | در دسترس نیست |
| <i>Nicotiana benthamiana</i> | <i>Plasmodium falciparum</i> (مالاریا) | پلاسمودیوم Pf38 ترکیب شده با پروتئین فلورسانس قرمز | راه‌انداز 35S ویروس موزاییک گل کلم / با واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | ۴-۱۲ میکروگرم به ازای هر گرم توده تازه | Gerbu MM | تزریق داخل صفاقی (۱۷ میکروگرم) | انسان | ترشح IgG |



شکل ۱- روش انجام Agroinfiltration با استفاده از *Agrobacterium*: (۱) وارد کردن ژن موردنظر به درون پلاسمید Ti؛ (۲) وارد کردن پلاسمید Ti نو ترکیب به باکتری؛ (۳) رشد سلول‌های باکتریایی در محیط کشت؛ (۴) انجام Agroinfiltration به روش (A) نفوذ *Agrobacterium* از طریق تزریق مستقیم سوسپانسیون حاوی *Agrobacterium* به پشت برگ و یا (B) نفوذپذیری با استفاده از خلأ؛ (۵) وارد شدن T-DNA حاوی ژن موردنظر به سلول گیاهی، (۶) کشت سلول‌های گیاهی و تولید گیاه تراریخته حاوی ژن موردنظر (Modified from Chincinska, 2021; Rivera et al., 2012).

Figure 1. Agroinfiltration method using *Agrobacterium*: gene insertion into the Ti plasmid (1); recombinant Ti plasmid insertion into the bacterium (2); bacterial cell growth in the medium (3); Agroinfiltration by infiltration of *Agrobacterium* by direct injection of a suspension containing *Agrobacterium* into the back of the leaf (4A); or permeability using a vacuum (4B); insertion of T-DNA containing the gene into the plant cell (5), culture of plant cells and production of a transgenic plant containing the gene (6) (Modified from Chincinska, 2021; Rivera et al., 2012).

روش‌های بیان با استفاده از ویروس گیاهی به واسطه استفاده از روش Agroinfiltration اغلب به‌عنوان روشی جایگزین برای افزایش میزان بیان آنتی‌ژن‌های واکسن در گیاهانی ترجیح داده می‌شود که به‌طور طبیعی میزان بیان پروتئین در آنها کم است و یا این میزان در روش‌های دیگر تراریخته‌سازی کم است (Hefferon, 2014).

واکسن‌های گیاهی با استفاده از روش بیان ویروسی علیه پاتوژن‌های ویروسی، باکتریایی یا انگلی عامل بیماری (که واکسن پیشگیرانه نامیده می‌شود) و بیماری مانند سرطان (به نام واکسن درمانی) در انسان و حیوان تولید شده‌اند (Wang & Ma, 2012).

موجود به‌منظور بیان پروتئین‌هایی مانند آنتی‌ژن‌های واکسن در گیاه هستند که برای تولید در مقیاس وسیع عمل می‌کنند (Niknejad, 2018). در این روش از ناقل‌های بیانی ویروس گیاهی به‌عنوان وسیله‌ای برای تولید پروتئین‌های درمانی مانند واکسن‌ها و سایر پروتئین‌های نو ترکیب مدنظر در گیاهان استفاده می‌شود. در طول چند دهه گذشته، برخی از ویروس‌های گیاهی برای بیان انواع پروتئین‌های دارویی بهینه شده‌اند و در حال حاضر، مجموعه وسیعی از انواع وکتورهای ویروسی در دسترس است و تا به امروز برخی از این پروتئین‌های نو ترکیب تولید شده تحت آزمایش‌های پیش‌بالینی یا بالینی هستند (Wang & Ma, 2012; Chen et al., 2017).

جدول ۵- واکسن‌های گیاهی ساخته شده با استفاده از تراریخته کردن کلروپلاست (Meriç et al., 2021).

Table 5. Plant-based vaccines were developed by chloroplast transformation (Meriç et al., 2021).

| روش انتقال ژن | روش ایمن‌سازی | گیاه | درصد کل پروتئین محلول یا میکروگرم آنتی ژن به ازای هر گرم زیست توده تازه | بیماری یا پاتوژن | آنتی‌ژن |
|---------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---|---|---|
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | خوراکی (ORV) | <i>Nicotiana tabacum</i> | - | ویروس فلج اطفال | پروتئین وبروسی ۱ |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | خوراکی (ORV) | <i>Nicotiana tabacum</i> | ۱۶ میکروگرم بر گرم وزن توده تازه | HIV | پروتئین چند اپی‌توبی gp41 و gp120 |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | خوراکی (ORV) | <i>Nicotiana tabacum</i> | ESAT-6 و ۷۵٪ برای Mtb72F و ۱۲٪ برای | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Mtb72F و ESAT-6 |
| پلی اتیلن گلیکول (PEG) | - | <i>Nicotiana benthamiana</i> | - | <i>Mycobacterium leprae</i> و <i>Mycobacterium avium</i> | MMPI به همراه لنفوتوکسین بتا (LTB) |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | خوراکی (ORV) | <i>Nicotiana tabacum</i> | - | HIV | پلی پپتید C4V3 |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | - | <i>Nicotiana tabacum</i> | ۲٪ | ویروس پاپیلوما‌ی انسانی | پروتئین کپسیدی L1 متصل شده به LTB |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | خوراکی (ORV) | <i>Lactuca sativa</i> | - | Dengue virus | پلی پروتئین سروتیب دنگی-۳ (prM/E) |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | زیر جلدی (SQV) یا خوراکی (ORV) | <i>Nicotiana tabacum</i> | ۱۰/۱۱٪ و ۱۳/۱۷٪ | <i>Vibrio cholera</i> (وبا- (مالاریا) <i>Plasmodium</i> | Cholera toxin-B AMA1 MSP1 |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | زیر جلدی (SQV) یا خوراکی (ORV) | <i>Lactuca sativa</i> | ۶/۱٪ و ۷/۳٪ | <i>Vibrio cholera</i> (وبا- (مالاریا) <i>Plasmodium</i> | Cholera toxin-B AMA1 MSP1 |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | خوراکی (ORV) | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | ۰/۷٪ | <i>Staphylococcus aureus</i> | دمین متصل به فیبرونکتین CTB + D2 |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | تلقیح و آغشتن (مایه کوبی) | <i>Nicotiana tabacum</i> | ۵۱٪ | ویروس بیماری پا و دهان (FMDV) | VP1 |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | - | <i>Nicotiana benthamiana</i> | ۶/۷۵٪ | HIV | HIV-1 Pr55 ^{gag} polyprotein |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | خوراکی (ORV) | <i>Nicotiana tabacum</i> | ۲/۳٪ | اسهال ناشی از ETEC | labile toxin B subunit heat-stable toxin (LTB-ST) |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | - | <i>Nicotiana tabacum</i> | ۰/۷٪ و ۰/۵٪ | ویروس پاپیلوما‌ی انسانی | E7CP HPV و پروتئین E7 |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | خوراکی (ORV) | <i>Nicotiana tabacum</i> | ۰/۸٪ | <i>Corynebacterium diphtheria</i> , <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Clostridium tetani</i> | multi-epitope DPT fusion protein |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | خوراکی (ORV) | <i>Nicotiana tabacum</i> | ۱۴/۸٪ | <i>Yersinia pestis</i> (طاعون) | F1-V |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | عضلانی (با استفاده از کلروپلاست) | <i>N. benthamiana</i> | ۴ میکروگرم به ازای هر گرم وزن توده تازه | HIV | HIV-1 Pr55Gag, p24 و p17/p24 |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | تزریق داخل صفاقی | <i>Nicotiana tabacum</i> | ۲۴٪ | ویروس پاپیلوما‌ی انسانی | L1 پروتئین کپسید |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | - | <i>Nicotiana tabacum</i> | ۱/۵٪ | ویروس پاپیلوما‌ی انسانی | L1 پروتئین کپسید |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | زیر جلدی و داخل معده | <i>Nicotiana tabacum</i> | ۲-۷٪ | ویروس تب خوکی (CSFV) | پروتئین ساختاری E2 |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | دهانی و داخل بینی (IN) | <i>Nicotiana tabacum</i> | ۱۰٪ | <i>Clostridium tetani</i> (کزاز) | TetC |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | خوراکی (ORV) | <i>Nicotiana tabacum</i> | ۰/۲٪ | سندرم حاد تنفسی ویروس کرونا | Spike SARS-CoV Protein |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | - | <i>Nicotiana tabacum</i> | ۱/۷٪ و ۲/۷٪ | <i>Bacillus anthracis</i> (سیاه زخم) | آنتی ژن محافظ (PA) |
| بمباران ذره‌ای با استفاده از تفنگ ژنی | - | <i>Nicotiana tabacum</i> | ۳٪ | روتاویروس | VP6 |

کاهش مقدار دوز واکسن و هزینه‌های تولید واکسن می‌شود (Hefferon, 2014). این استراتژی تولید VLP گیاهی برای مبارزه با بیماری‌های عفونی در مقیاس صنعتی مفید بوده است (Balke & Zeltins, 2019; Maharjan & Choe, 2021).

انواع واکسن‌های گیاهی آزمایش شده به منظور مقابله با بیماری‌ها

واکسن‌های گیاهی را بر اساس کاربرد می‌توان به دو دسته تقسیم کرد: واکسن‌هایی که برای مصارف دامپزشکی طراحی شده‌اند و واکسن‌هایی که برای مصارف پزشکی طراحی شده‌اند. ۱. مصارف پزشکی

از روش بیان موقت برای تولید واکسن گیاهی به منظور مقابله با ویروس‌های Norwalk و هاری، انواعی از آنفلوانزا، هپاتیت، پاپیلوما، ایدز، ابولا و مالاریا و برخی بیماری‌های باکتریایی استفاده شده‌است. ۶ ماه یا بیشتر برای تولید مقادیر کافی واکسن آنفلوانزا با استفاده از تخم‌مرغ برای پاسخگویی به تقاضای جهانی نیاز است، اما دستیابی به همین واکسن در گیاهان طی چند هفته قابل دستیابی است. همچنین محققان شرکت Medicago کانادا و Fraunhofer CMB در Newark, Delaware، در تولید واکسن علیه یک سویه ویروس آنفلوانزا با استفاده از این روش به موفقیت چشمگیر تولید واکسن در حد گرم طی ۱ ماه پس از جداسازی توالی هم‌گلوکوتینین دست یافتند (Lobato et al., 2021; Wang & Ma, 2012). استراتژی‌های جدید تولید واکسن‌های گیاهی ارائه شده توسط بیوتکنولوژی گیاهی برای مبارزه با بیماری‌های اپی-دمیک و پاندمیک مانند آنفلوانزای A, H1N1، آنفلوانزای H5N1، طاعون، ابولا، زیکا، SARS-CoV و SARS-CoV-2 در حال گسترش هستند. واکسن‌های گیاهی توسعه‌یافته برای بیماری‌های دنیاگیر و همه‌گیر در جدول ۶ آورده شده است (Meriç et al., 2021).

واکسن‌های گیاهی نه تنها برای مقابله با پاتوژن‌های خارجی بلکه برای مقابله با سرطان هم تولید شده‌اند. برای مثال در سرطان لنفوم سلول‌های B یک ایمونوگلوبولین سطحی منحصر به فرد بیان می‌کنند که یک نشانگر اختصاصی تومور است و واکسیناسیون بیماران با این ایمونوگلوبولین اغلب به یک نتیجه بالینی مفید می‌رسد. این واکسن‌ها در برابر قرارگیری در معرض لنفوم کشنده، ایمنی ایجاد می‌کنند. در اینجا مزیت استفاده از گیاهان مصرف

ذرات شبه ویروسی (VLPs) به‌عنوان یک نوع ساختار واکسن گیاهی و مقایسه آن با سایر ساختارهای واکسن‌های گیاهی یکی از روش‌های تولید واکسن‌های گیاهی، طراحی و تولید ذرات ویروس مانند (VLPs) در گیاهان است (Balke & Zeltins, 2019; Maharjan & Choe, 2021). VLPها نوعی نانوذره ویروسی (VNP) غیرعفونی بوده و حاوی ژنوم ویروسی نیستند (Steele et al., 2017). بنابراین، از VLPها می‌توان به‌عنوان واکسن استفاده کرد (Shoeb & Hefferon, 2019). VLPها به خوبی می‌توانند در گیاهان بیان شوند (Rybicki, 2010). این فرآیند در حال حاضر با استفاده از دو روش مختلف در گیاهان انجام می‌شود:

- ۱- تولید پروتئین‌های آنتی‌ژنی خاص به روش بیان دائمی توسط سلول‌های گیاهی مهندسی ژنتیکی شده و
- ۲- بیان موقت پروتئین‌های آنتی‌ژنی خاص با استفاده از *Agrobacterium sap* نو ترکیب که با استفاده از خلأ یا روش‌های مشابه وارد برگ‌های گیاه میزبان می‌شوند (Hefferon, 2014).

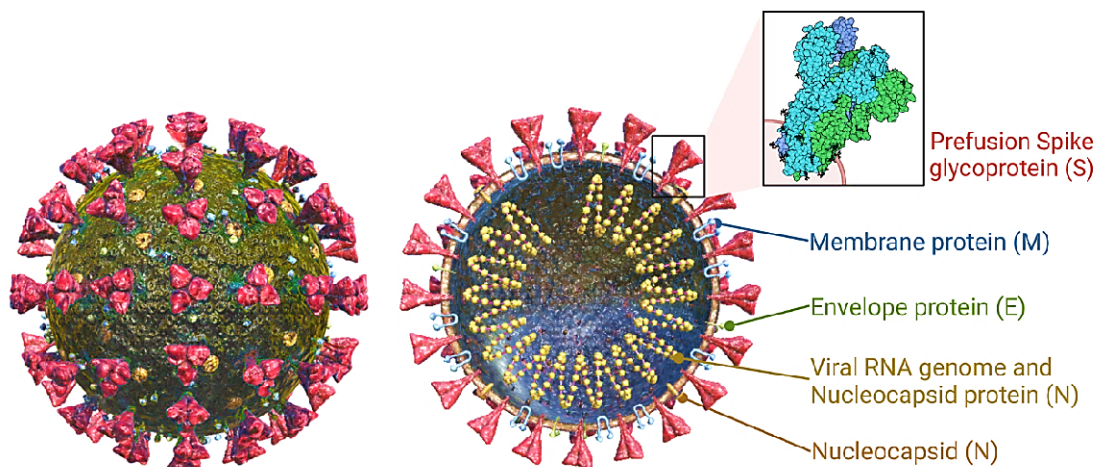
در بسیاری از موارد VLPها از نظر توانایی در ایجاد پاسخ ایمنی، معادل قرارگیری در معرض ویروس زنده بوده‌اند (LeBlanc et al., 2020). به همین دلیل واکسن‌های نسل جدید بر خلاف واکسن‌های سنتی به‌طور مستقیم از ویروس‌ها ساخته نمی‌شوند، بلکه از پپتیدهای ویروسی نو ترکیب یا ذرات شبه ویروس (VLPs) برای تولید آن‌ها استفاده می‌شود. از طرف دیگر واکسن‌های دارای ذرات ویروس مانند (VLPs) نسبت به واکسن‌های پروتئین‌های آنتی‌ژنی منفرد به‌عنوان واکسن‌های Subunit ایمنی‌زایی بیشتری دارند. در واقع واکسن‌های Subunit معمول که حاوی فقط پروتئین‌های آنتی‌ژنی منفرد هستند ایمنی‌زایی پایینی دارند و برای ایمنی‌زایی به استفاده از ادجوانت‌ها و دوزهای بالاتر نیاز دارند (Monreal-Escalante et al., 2022)؛ در مقابل نشان داده شده است که برای برخی از VLPها (به‌عنوان مثال ویروس پاپیلوما‌ی انسانی - HPV) تجویز همزمان یک ادجوانت برای ایجاد پاسخ قوی تولید آنتی‌بادی لازم نیست، بنابراین هزینه واکسن را کاهش می‌دهد (Hefferon, 2014). VLPهای کایمیریک یک مدل جدیدتر چند ظرفیتی هستند؛ یعنی از آنتی‌ژن پاتوژن‌های مختلف تشکیل شده‌اند (Fang et al., 2017; Monreal-Escalante et al., 2022; Rutkowska et al., 2019). چند ظرفیتی بودن آنها غلظتی از آنتی‌ژن را که در آن فعال‌سازی سلول B انجام می‌شود، کاهش می‌دهد. بنابراین با استفاده از اپی‌توپ‌های متعدد می‌توان از VLPها برای افزایش توانایی واکسن استفاده کرد که منجر به

تولید واکسن گیاهی به منظور مقابله با COVID-19

ظهور سویه‌های ویروسی جدید، تهدیدی همیشگی برای سلامت افراد جهان بوده است که جدیدترین نمونه آن سویه جدید ویروس کرونا است. وضعیت کنونی این اپیدمی، اهمیت تولید سریع واکسن‌های پایدار ارزان قیمت را که به خنک‌کننده‌ها به منظور نگهداری و حمل و نقل نیاز ندارند، بیش از پیش نشان می‌دهد (Venkataraman et al., 2021). از طرفی ظهور سندرم حاد تنفسی SARS-CoV-2 استراتژی‌های مختلفی را برای تولید واکسن می‌طلبد (Zieneldien et al., 2021). در اکثر این استراتژی‌های تولید واکسن، نکته کلیدی که در نظر گرفته می‌شود این است که از آنجا که گلیکوپروتئین‌های اسپایک کروناویروس (S) باعث آغاز ورود ویروس به سلول‌ها می‌شوند، هدف اولیه خنثی‌سازی آنتی‌بادی‌ها در نظر گرفته می‌شوند (شکل ۲).

خوراکی آن‌ها به جای تزریق نیست، بلکه تولید سریع آن‌ها است که امکان ساخت واکسن اختصاصی را برای درمان بیماری لنفوم سلول B با استفاده از بیان موقت فراهم می‌کند. حداقل ۱۲ واکسن از این دست در آزمایشات فاز دوم آزمایش شده‌اند (Wang & Ma, 2012).

۲. واکسن‌های گیاهی با کاربردهای دامپزشکی پیشرفت واکسن‌های گیاهی با کاربردهای دامپزشکی آنها علاوه بر کمک به صنعت دامپروری، به مطالعه روی حیوانات مدل نیز کمک می‌کند. واکسن بیماری نیوکاسل برای طیور اولین واکسن گیاهی بود که توسط گیاه تراریخته تولید شد و مورد تأیید قرار گرفت. همچنین واکسن‌های گیاهی در این حوزه به منظور مقابله با پاروویروس سگی و بیماری پا و دهان و بیماری خونریزی خرگوشی تولید شده‌اند (Wang & Ma, 2012).



شکل ۲- ساختار ویروس SARS-CoV-2. ویروس از یک غشای پوششی مرتبط با پروتئین‌های ساختاری تشکیل می‌شود: پروتئین (S) واسطه اتصال به گیرنده‌های سلول میزبان و هدفی حیاتی برای تولید آنتی‌بادی‌هایی است که قادر به خنثی کردن ویروس هستند. دایمر هم‌آگلوتینین استراز (HE) به عنوان یک واسطه قوی برای اتصال و تخریب گیرنده‌های اسید سیالیک در سطح سلول میزبان عمل می‌کند. M یک گلیکوپروتئین غشایی است که برای تولید ویروس مهم است و E پروتئین پوششی است که به پروتئین M می‌چسبد تا پوشش ویروسی را تشکیل دهد. ساختار ویروس همچنین شامل پروتئین نوکلئوکپسید N است که همراه با RNA ژنومی، نوکلئوکپسید را تولید می‌کند (Rosales-Mendoza et al., 2020).

Figure 2. Structure of the SARS-CoV-2 virus. The virus is formed by an envelope membrane associated with the following structural proteins: spike protein (S), which mediates binding to the host cell receptors and is considered a critical target for the induction of antibodies capable of neutralizing the virus; hemagglutinin-esterase dimer (HE), which acts as a potent mediator of attachment and destruction of sialic acid receptors on the host cell surface; a membrane glycoprotein (M), which is important to generate the virus; and the envelope protein (E), which adheres to the M protein to form the viral envelope. The viral structure also comprises a nucleocapsid protein (N) that produces the nucleocapsid along with the RNA genome (Rosales-Mendoza et al., 2020).

جدول ۶- واکسن‌های گیاهی که برای مقابله با بیماری‌های دنیاگیر و همه‌گیر ساخته شده‌اند (Meriç et al., 2021).

Table 6. Plant-based vaccines were developed for pandemic and epidemic diseases (Meriç et al., 2021).

| میزان شیوع از نظر منطقه جغرافیایی | گیاه | پاتوژن/ بیماری | آنتی‌ژن | روش انتقال ژن | درصد کل پروتئین محلول یا میکروگرم آنتی ژن به ازای هر گرم زیست توده تازه | ادجوانت | روش ایمن‌سازی | پاسخ ایمنی |
|-----------------------------------|--|--------------------------------|--|---|--|---|--|---|
| همه‌گیر | <i>Oryza sativa</i> | <i>Vibrio cholerae</i> وبا | زیر واحد B سم وبا | با واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | اطلاعاتی در این مورد در دسترس نیست. | - | خوراکی / میلی گرم دانه ۱۵۰ | IgG و IgA مخاطی |
| همه‌گیر | <i>Nicotiana benthamiana</i> | SARS-CoV | پروتئین نوکلئوکسید SARS-CoV (rN) | با واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | ۱۷-۰/۸ کل پروتئین محلول | ادجوانت کامل/ ناقص Freund | داخل صفاقی / میلی گرم برگ تنباکو تازه ۵۰ | ترشح IgG1,2 / افزایش IFN-γ و IL-10 / بی تغییر در IL-2,4 تحریک پاسخ سلول-های CD4+ و CD8+ |
| دنیاگیر | <i>Nicotiana benthamiana</i> | Influenza A H1N1 | پروتئین محلول H1/H1-VLP | با واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | اطلاعاتی در این مورد در دسترس نیست. | - | - | - |
| همه‌گیر | <i>Nicotiana benthamiana</i> | Influenza A H5N1 | آکتودومین پروتئین ۲ ماتریکس (M2e) متصل به ناحیه غنی از پرولین انتهای آمینی متعلق به پروتئین ذرت Zein (@Zera) | با واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | ۱۲۵-۲۰۵ میلی-گرم به ازای هر کیلوگرم وزن توده تازه | - | عضلانی به میزان ۴/۵ میکروگرم | IgG |
| همه‌گیر | <i>Nicotiana tabacum/Lycopersicon esculentum</i> | <i>Yersinia pestis</i> / طاعون | پروتئین اصلی کپسولی F1-V آنتی‌ژن | با واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | <i>Nicotiana tabacum</i> -۱٪ وزن توده تازه <i>Lycopersicon esculentum</i> -۴٪ وزن خشک ۱۰٪ | <i>Nicotiana tabacum</i> آلومینیوم هیدروکسید <i>Lycopersicon esculentum</i> سم وبا | <i>Nicotiana tabacum</i> جلدی (۱۰) میکروگرم خالص شده) <i>Lycopersicon esculentum</i> خوراکی (۲ گرم میوه گوجه فرنگی) | IgG1 و IgG2a سرمی و IgA مخاطی |
| همه‌گیر | <i>Nicotiana benthamiana</i> | <i>Flavivirus</i> (YF) تب زرد | پروتئین پوششی ویروس YF (YFE) متصل به آنزیم باکتریایی لیکناز (YFE-) (LicKM) | با واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | اطلاعاتی در این مورد در دسترس نیست. | ژل آلومینیوم هیدروکسید | عضلانی ۵ μg x3/ 5 μg x 2/ 30 μg x 3 | IgG و افزایش IFN-γ |
| همه‌گیر | <i>Nicotiana tabacum</i> | ویروس ابولا (EBOV) | پروتئین پوششی VP40 | با واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | ۲/۶ میکروگرم به ازای هر گرم وزن توده تازه | ادجوانت کامل/ ناقص Freund | خوراکی (۲۵) نانوگرم / زیر جلدی (۱۲۵) نانوگرم | IgM و IgG و IgA روده |
| همه‌گیر | <i>Nicotiana benthamiana</i> | ویروس زیکا (ZIKV) | پروتئین پوششی (E) | با واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | ۱۶۰ میکروگرم به ازای هر گرم وزن توده تازه | ژل آلومینیوم هیدروکسید | زیر جلدی / میلی گرم ۵۰ | IgG1 و IgG2، افزایش IFN-γ، IL-4 و IL-6 |
| دنیاگیر | <i>Nicotiana benthamiana</i> | SARS-CoV-2 | آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی اسپایک CR3022 | با واسطه <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | ۱۳۰ میکروگرم به ازای هر گرم توده تازه | - | - | - |

جدول ۷- فهرست واکسن‌های گیاهی علیه SARS-CoV-2 (از ۱۳ اوت ۲۰۲۱) (Shanmugaraj et al., 2021).

Table 7. List of vaccine candidates against SARS-CoV/CoV-2 produced in plants (updated 13 August 2021) (Shanmugaraj et al., 2021).

| وضعیت | ایمنی‌زایی | فرمولاسیون و روش | گیاه میزبان | آنتی‌ژن موجود در واکسن |
|--|--|---|------------------------------------|---|
| مطالعه پیش‌بالینی | افزایش چشمگیر تیتراژ آنتی‌بادی اختصاصی علیه SARS-CoV پس از تزریق به موش | ۳ دوز با دو هفته فاصله بین هر دو دوز به صورت گوارشی | بیان پایدار در گوجه فرنگی | پروتئین SARS-CoV S1 |
| مطالعه پیش‌بالینی | قادر به القای ایمنی هومورال و سلول‌های تولیدکننده سیتوکین علیه SARS-CoV-2 در موش | فرموله شده همراه با ادجوانت Freund و تزریق درون صفاقی ۴ دوز با فاصله دو هفته‌ای | <i>N. benthamiana</i> بیان موقت در | SARS-CoV پروتئین نوکلئوکپسیدی |
| در مرحله تحقیقاتی | اطلاعاتی در این مورد موجود نیست. | اطلاعاتی در این مورد در دسترس نیست. | <i>N. benthamiana</i> بیان موقت در | SARS-CoV S1 متصل به پروتئین GFP |
| در مرحله تحقیقاتی | اطلاعاتی در این مورد موجود نیست. | اطلاعاتی در این مورد در دسترس نیست. | <i>N. benthamiana</i> بیان موقت در | SARS-Cov N پروتئین‌های نو ترکیب و SARS-CoV M |
| در مرحله تحقیقاتی | اطلاعاتی در این مورد موجود نیست. | اطلاعاتی در این مورد در دسترس نیست. | <i>N. benthamiana</i> بیان موقت در | SARS-CoV-2 N پروتئین نو ترکیب |
| در مرحله تحقیقاتی | اطلاعاتی در این مورد موجود نیست. | اطلاعاتی در این مورد در دسترس نیست. | <i>N. benthamiana</i> بیان موقت در | SARS-CoV-2 پروتئین نو ترکیب RBD |
| در مرحله I/II ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04473690 | قادر به القای ایمنی اختصاصی علیه SARS-CoV-2 در آزمایشات پیش‌بالینی | فرموله شده با ادجوانت CpG و تزریق عضلانی در روزهای اول و ۲۲ | <i>N. benthamiana</i> بیان موقت در | واکسن KBP-201 COVID-19 واکسن بر مبنای SARS-CoV-2 RBD تولید شده توسط شرکت Kentucky BioProcessing (Owenboro, KY, USA) |
| مطالعات پیش‌بالینی | قادر به تحریک پاسخ ایمنی اختصاصی و آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده علیه SARS-CoV-2 در موش | تزریق عضلانی در روزهای اول و ۲۱ | <i>N. benthamiana</i> بیان موقت در | واکسن IBIO-200: واکسن بر مبنای SARS-CoV-2 VLP توسعه داده شده توسط شرکت iBio (Bryan, TX, USA) |
| مطالعات پیش‌بالینی | قادر به تحریک پاسخ ایمنی اختصاصی و آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده علیه SARS-CoV-2 در موش به میزانی بیش از IBIO-200 | فرموله شده با ادجوانت LicKM TM و به صورت تزریق عضلانی در روزهای اول و ۲۱ | <i>N. benthamiana</i> بیان موقت در | واکسن IBIO-201: واکسن subunit توسعه داده شده بر مبنای SARS-CoV-2 Spike توسط شرکت iBio (Bryan, TX, USA) |
| مطالعات پیش‌بالینی | قادر به القای پاسخ قوی و اختصاصی سلول‌های T خاطره | اطلاعاتی در این مورد در دسترس نیست. | <i>N. benthamiana</i> بیان موقت در | واکسن IBIO-202: واکسن subunit SARS-CoV-2 توسعه داده شده توسط شرکت iBio (Bryan, TX, USA) |
| در مرحله II/III ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04636697 | قادر به القای پاسخ آنتی‌بادی در داوطلبان با دو دوز تزریق | تزریق عضلانی با ۲۱ روز فاصله | <i>N. benthamiana</i> بیان موقت در | واکسن مبتنی بر SARS-CoV-2 VLP توسعه داده شده توسط شرکت Medicago (Quebec, QC, Canada) |
| مطالعات پیش‌بالینی | قادر به القای اختصاصی IgG و پاسخ‌های خنثی‌کننده و ایمنی سلولی در موش و نخستی‌های غیرانسانی | فرموله شده با ادجوانت آلوم و تزریق عضلانی در روزهای اول و ۲۱ | <i>N. benthamiana</i> بیان موقت در | واکسن subunit به نام Baiya SARS-CoV-2 Vax 1 توسعه داده شده توسط شرکت انحصاری Phytopharm (Bangkok, Thailand) |

توسعه واکسن‌های گیاهی COVID-19، آزمایش اثربخشی آن‌ها در آزمایش‌های بالینی بزرگ برای تأیید ایمنی و در عین حال نظارت بر تولید آنها باشد (Rosales-Mendoza et al., 2020). برخی مشکلات اصلی که قبل از اینکه واکسن‌های خوراکی به واقعیت تبدیل شوند، باید برطرف شوند عبارتند از:

۱- میوه‌های تراریخته یا بافت برگی ممکن است عمر کوتاهی داشته باشند یا نیازمند استخراج و فرآیند خالص‌سازی آنتی‌ژن باشند. این موضوع یکی از مهم‌ترین چالش‌های تولید واکسن‌های گیاهی است. در حالی‌که بیان در دانه غلات و حبوبات، هم تاخوردگی صحیح پروتئین را به دلیل حضور چابرون‌ها و ایزومرهای دی‌سولفید سبب می‌شود و هم این اجازه را می‌دهد که برای مدت طولانی ذخیره شوند که باعث کاهش نیاز به ذخیره‌سازی در سرما می‌شود (Zaer & Kolivand, 2019).

۲- نمی‌توان پروتئین‌های دارویی را در محصولات غذایی تولید و آنها را مصرف کرد، زیرا خطر آلودگی مواد غذایی وجود دارد. بنابراین بیان پروتئین کایمیک باید طوری تنظیم شود که از ورود ناخواسته ژن به سایر گونه‌های گیاهی یا زنجیره غذایی مصرف‌کنندگان جلوگیری کند. البته مهارکننده‌های فیزیکی در محصولات تراریخته مثل انتقال ژن به کلروپلاست، تکثیر روشی، مهار گرده افشانی و استراتژی‌های ساده و طبیعی در حبوبات و دانه غلات، از ورود ژن تراریخته جلوگیری می‌کند (Wang & Ma, 2012; Zaer & Kolivand, 2019).

۳- محصولات تراریخته به‌طور مستقیم و غیرمستقیم بر مسائل مربوط به ایمنی زیست‌محیطی، اخلاقی و اجتماعی تأثیرگذار هستند؛ بنابراین لازم است استانداردهای و نظارت لازم صورت بگیرد (Zaer & Kolivand, 2019).

۴- یکی از بحث‌های اصلی تولید واکسن‌های گیاهی این است که به دلیل تنوع میزان بیان بین گیاهان، بین بافت‌های مختلف گیاه و یا بیان متغیر در همان گیاه بسته به شرایط فیزیولوژیکی هر گیاه و یا حتی شرایط متغیر محیطی، نیاز است محصولات خالص‌شده و با کیفیت به جای محصولات گیاهی خام که دوز دقیق مواد دارویی در آنها معلوم نیست، مصرف شوند. این موضوع باعث می‌شود که تعیین و تولید دوز مناسب واکسن‌های گیاهی در مقیاس انبوه منجر به روبرو شدن با همان چالش‌های تخلیص، حمل و نقل، هزینه، آزمایشات پیش‌بالینی و بالینی و ... که در تولید سایر واکسن‌ها هم وجود دارد، شود (Wang & Ma, 2012).

بنابراین در اکثر این استراتژی‌های تولید واکسن هدف ارائه این پروتئین به سیستم ایمنی میزبان بوده‌است (Rosales-Mendoza et al., 2020). به همین دلیل گیاهان بستر مناسبی برای تولید واکسن SARS-CoV-2 فراهم می‌کنند (Venkataraman et al., 2021). شیوع COVID-19 منجر به واکنش بسیار مهمی از سوی جامعه کشاورزی مولکولی شد که تا حدی منعکس‌کننده گسترش سریع بیماری و نیاز به پاسخ‌های فوری بود و تا حدی منعکس‌کننده رشد بیان موقت مبتنی بر گیاه به‌عنوان یک روش تولید واکسن در مقیاس بزرگ بود. از زمانی که توالی ویروس SARS-CoV-2 در اوایل سال ۲۰۲۰ در دسترس عموم قرار گرفت، تلاش‌های قابل توجهی توسط جامعه کشاورزی مولکولی گیاهی برای ایجاد واکسن‌های نو ترکیب علیه SARS-CoV-2 انجام شده است (جدول ۷) (Shanmugaraj et al., 2021). سازمان بهداشت جهانی ۱۸۴ واکسن مختلف COVID-19 را در مطالعات پیش‌بالینی فهرست کرده است که از جمله آنها، سه واکسن گیاهی هستند (Maharjan & Choe, 2021). واکسن‌های گیاهی که علیه بیماری COVID-19 نیز ساخته شده‌اند بیشتر مبتنی بر VLP هستند و دو شرکت آنها را به تأیید بالینی رسانده‌اند. Kentucky و Medicago و چندین BioProcessing Inc، در آزمایشات بالینی فاز ۳ و چندین واکسن گیاهی دیگر مبتنی بر زیرواحدهای پروتئینی در مرحله پیش‌بالینی قرار دارند (Venkataraman et al., 2021; Maharjan & Choe, 2021). شرکت کانادایی Medicago در توسعه واکسن گیاهی به منظور مقابله با SARS-CoV-2 پیشگام است که از VLP‌های آنفولانزای گیاهی، برای تولید واکسن SARS-CoV-2 استفاده کرده است. آنها VLP‌های SARS-CoV-2 را با قرار دادن توالی ژنی پروتئین اسپایک SARS-CoV-2 در *Agrobacterium* و آلوده کردن گیاه *benthamiana* به آن تولید کردند. در نتیجه این گیاهان VLP‌های SARS-CoV-2 متشکل از پروتئین اسپایک و غشای لیپیدی گیاهی تولید می‌کردند (Venkataraman et al., 2021). شرکت British American Tobacco با شرکت تابعه بیوتکنولوژی خود در ایالات متحده، Kentucky Bio Processing (KBP) در مرحله نهایی توسعه واکسن گیاهی برای COVID-19 است (Sharma et al., 2021).

چالش‌های واکسن‌های گیاهی

از اولین ایده بیان واکسن‌ها در اندام‌های خوراکی گیاهی مانند موز و سیب زمینی، کارهای زیادی در زمینه تولید پروتئین‌های نو ترکیب در گیاهان انجام شده است. شاید چالش اصلی برای

نظارتی باید دانش خود را در مورد این فناوری نوظهور افزایش دهند و مطابق با آن سازگار شوند. اینکه آیا کشورهای در حال توسعه از مزایای فناوری‌های گیاهی کارآمد و کم‌هزینه در مبارزه با بیماری COVID-19 بهره‌مند خواهند شد، در ماه‌های آینده آشکار خواهد شد (Venkataraman et al., 2021). گیاهان تنباکو، حبوبات، سبزیجات و غلات می‌توانند در بسیاری از محیط‌ها رشد کنند، بنابراین محصولات آنها، می‌تواند با استفاده از زیرساخت‌های محلی تولید شوند که این همان شبکه توزیعی است که در حال حاضر برای غذاها و دانه‌های غلات، بدون نیاز به خنک‌کننده‌ها، وجود دارد. این رویکرد در پروژه EU Pharma-Planta برای برنامه‌های بشردوستانه در زمینه پیشگیری از HIV بنیان‌گذاری شد (Ma et al., 2015). اکنون این فرصت وجود دارد که نه تنها به مهار و ریشه‌کنی همه‌گیری فعلی COVID-19 کمک شود، بلکه راه‌حلی سریع و هدفمند به همه‌گیری‌های آینده ایجاد شود (Iranbakhsh, 2021).

در نهایت می‌توان مزایا و معایب واکسن‌های گیاهی را به صورت جدول ۸ نشان داد.

آینده واکسن‌های گیاهی

واکسن‌های بیوتکنولوژی گیاهی در حال پیشرفت است. نوآوری‌ها در پلتفرم‌های بیوتکنولوژی گیاهی با استفاده از ابزارهای ایمونوفورماتیک، روش‌های مهندسی ژنتیک و استراتژی‌های تولید واکسن نوترکیب با بازده بالا انجام شده است. در مرحله بعد، پیش‌بینی می‌شود که ابزارهای مهندسی ژنتیک را می‌توان برای افزایش بازده بیان پروتئین، با تمرکز بر نانوذرات آلی VLP برای مبارزه با بیماری‌های ویروسی بهبود بخشید و با توجه به اینکه صنعت درگیر چالش‌های کنونی همه‌گیری است و واکسن گیاهی علیه COVID-19 در حال حاضر در دسترس است، سرمایه‌گذاری جدید برای این پلتفرم بیوتکنولوژیکی می‌تواند در سال‌های بعد گسترش یابد (Monreal-Escalante et al., 2022). با توجه به توسعه روزافزون داروهای گیاهی، آژانس‌های

جدول ۸- مزایا و معایب واکسن‌های گیاهی (S J, 2016; Laere et al., 2016; Khan et al., 2019; Jelaska et al., 2022; Franconi et al., 2010; Streatfield, 2005; Stephen J Streatfield et al., 2001; Shahid & Daniell, 2016).

Table 8. Advantages and Disadvantages of Herbal Vaccines (Franconi et al., 2010; Jelaska et al., 2022; Khan et al., 2019; Laere et al., 2016; S J Streatfield, 2005; Stephen J Streatfield et al., 2001; Shahid & Daniell, 2016).

| معایب | مزایا |
|---|--|
| امکان آلودگی به آلودگی‌های گیاهی و خطرات ناشی از انتقال واکسن‌های گیاهی به انسان یا حیوانات وجود دارد که علاوه بر خطرات بالینی مانند واکنش‌های آلرژیک، غیراخلاقی هم هست. | فرآیند تولید واکسن گیاهی نسبت به واکسن‌های سنتی ایمن‌تر است و کمتر به عوامل بیماری‌زای انسانی (از جمله آنتوتوکسین) آلوده می‌شود و نیازی به تصفیه و جداسازی سموم تولید شده توسط واکسن‌های میکروبی نیست. |
| گیاهان موجودات زنده‌ای هستند که در طول زمان تغییر می‌کنند، بنابراین هیچ تضمینی برای ادامه تولید واکسن با همان کیفیت قبل در طول زمان وجود ندارد و به همین دلیل نیاز است محصول مدام از نظر کنترل کیفی پایش شود. | مقرون به صرفه (بدون نیاز به تصفیه و تزریق برای واکسن‌های گیاهی خوراکی مانند واکسن برنج) |
| دوز واکسن‌های گیاهی بسته به پارامترهای مختلف (از جمله تفاوت در بیان)، متفاوت است. (به‌عنوان مثال، میوه‌های با اندازه‌های مختلف دارای دوزهای متفاوت واکسن هستند) | عدم نیاز به یخچال در هنگام حمل و نگهداری واکسن‌های تولید شده |
| محصولاتی مانند سیب‌زمینی به صورت خام مصرف نمی‌شوند و از طرفی پختن غذا ممکن است آنتی‌ژن واکسن موجود در آن را تخریب و تضعیف کند. | مقاوم در برابر هضم آنزیمی (در دستگاه گوارش به دلیل داشتن دیواره سلول‌های گیاهی سالم به روده می‌رسد و بنابراین می‌توان به جای تزریق از آن به صورت خوراکی استفاده کرد) |
| این احتمال وجود دارد که فرد نتواند طعم واکسن خوراکی گیاهی را تحمل کند. | گیاهان پروتئین‌هایی با پیچیدگی‌ها و الگوهای گلیکوزیلاسیون متفاوت با کارایی بالا بیان می‌کنند. |
| انتخاب بهترین گیاه و بهترین روش برای تولید هر نوع واکسن گیاهی به عوامل مختلفی بستگی دارد که بررسی همه این عوامل از دشواری‌های این روش است. | قابلیت تولید در کشورهای جهان سوم |
| این روش برای استفاده همه افراد مناسب نیست. برای مثال این روش برای نوزادان مناسب نیست. | تولید آسان و سریع در مقیاس وسیع صنعتی |
| | تولید واکسن‌های گیاهی به‌طور معمول زمان کمتری نسبت به واکسن‌های مبتنی بر تخم‌مرغ یا کشت سلول پستانداران نیاز دارد. (شرکتی به نام Medicago واکسن‌های گیاهی را طی ۵ تا ۶ هفته تولید می‌کند که در مقایسه با تولید واکسن‌های مبتنی بر سلول پستانداران یا تخم‌مرغ که حدود ۴ تا ۶ ماه طول می‌کشد، قابل توجه است) |
| | قادر به فعال کردن سیستم ایمنی مخاطی و سیستمیک |
| | می‌توان آنتی‌ژن واکسن را برای مدت طولانی در بافت یا دانه گیاه خشک‌شده ذخیره کرد. |

سپاسگزاری

از همکاری خانم دکتر حدادی و آقای دکتر کمال الدینی بسیار سپاسگزاریم.

REFERENCES

- Chan, H.-T., Xiao, Y., Weldon, W.C., Oberste, S.M., Chumakov, K. & Daniell, H.** 2016. Cold chain and virus-free chloroplast-made booster vaccine to confer immunity against different poliovirus serotypes. *Plant Biotechnology Journal* 14: 2190-2200. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/pbi.12575>
- Chincinska, I.A.** 2021. Leaf infiltration in plant science: old method, new possibilities. *Plant Methods* 17: 83. <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00782-x>
- Fang, P.-Y., Gómez Ramos, L.M., Holguin, S.Y., Hsiao, C., Bowman, J.C., Yang, H.-W. & Williams, L.D.** 2017. Functional RNAs: combined assembly and packaging in VLPs. *Nucleic Acids Research* 45: 3519-3527. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1154>
- Franconi, R., Demurtas, O.C. & Massa, S.** 2010. Plant-derived vaccines and other therapeutics produced in contained systems. *Expert Review of Vaccines* 9: 877-892. <https://doi.org/10.1586/erv.10.91>
- Hefferon, K.L.** 2014. Plant-derived pharmaceuticals: principles and applications for developing countries. In K.L. Hefferon, *Plant-derived Pharmaceuticals: Principles and Applications for Developing Countries*. Centre for Agriculture and Bioscience International (CABI). <https://doi.org/10.1079/9781780643434.0000>
- Iranbakhsh, A.** 2021. Potential applications of Plant Biotechnology against SARS-CoV-2. *Iranian Journal of Biology* 4: 89-98.
- Jelaska, S., Mihaljević, S. & Bauer, N.** 2022. Production of Biopharmaceuticals, Antibodies and Edible Vaccines in Transgenic Plants. *Current Studies of Biotechnology - Volume IV. - Immuno-Modulatory Drugs* 121.
- Khan, A., Khan, A., Khan, I., Shehzad, M.A., Ali, W., Muhammad, A. & Akif, M.** 2019. A review on natural way of vaccination: Plant derived edible vaccines. *Journal of Vaccines and Immunology* 5: 18-21.
- Laere, E., Ling, A.P.K., Wong, Y.P., Koh, R. Y., Mohd Lila, M. A. & Hussein, S.** 2016. Plant-based vaccines: production and challenges. *Journal of Botany*.
- LeBlanc, Z., Waterhouse, P. & Bally, J.** 2020. Plant-based vaccines: the way ahead? *Viruses* 13: 5.
- Lobato, M.G., Huang, X., Alvarez, D., He, W., Baysa, C., Zh, C., Armario-Najera, V., maya Blanco Perera, A., ro Cerda Bennasser, P., Saba-Mayora, A., Sobrino-Mengua, G., Va rg heese, A., Abranches, R., Alexand ra Abreu, I., Ba lamurugan, S., lph Bock, R., nesF Buye, J., lau da Cunha, N. B., Dan iell, H., ul Christou, P.** 2021. Plant Biotechnology Journal *agg Contributions of the international plant science community to the fight against human infectious diseases-part 1: epidemic and pandemic diseases. Plant Biotechnology Journal* 19: 1901-1920. <https://doi.org/10.1111/pbl>

به‌طور کلی، واکسن‌های گیاهی بی‌خطر هستند و خواص ایمنی‌زایی آن‌ها با استفاده از سنجش‌های آزمایشگاهی با سلول‌های انسان و موش راضی‌کننده ارزیابی شده است. کارآزمایی‌های انجام‌شده روی داوطلبان، ایمنی‌زایی مناسب را بدون عوارض جانبی جدی نشان داد (جدول ۴) (Rosales-Mendoza et al., 2020).

نتیجه این مطالعه نشان می‌دهد واکسن‌های گیاهی نسبت به سایر انواع واکسن و روش‌های تولیدی مقرون به‌صرفه‌تر هستند و می‌توانند در مقادیر زیاد تولید شوند (Shahid & Daniell, 2016). این امکان وجود دارد که واکسن‌های VLP ارزان گیاهی بتوانند شانس قرار گرفتن در برنامه ایمن‌سازی کشورها را داشته باشند یا حداقل هزینه واکسیناسیون را برای عموم مردم کشورهای توسعه نیافته کاهش دهند (Hefferon, 2014).

همچنین با توجه به امکان خشک کردن انجمادی (Lyophilization) سلول‌های گیاهی بیان‌کننده آنتی‌ژن‌های واکسن یا داروهای زیستی (Bio-drugs)، می‌توان آنها را در دمای محیط برای سال‌ها ذخیره کرد تا اثربخشی داروهای پروتئینی بیان شده حفظ شود. به جز هزینه کمتر، تولید واکسن گیاهی مزایای متعددی نسبت به سایر سیستم‌های تولید واکسن پروکاریوتی و یوکاریوتی دارد. پروتئین‌های تولید شده در گیاه، بسیار شبیه پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در یوکاریوت‌ها هستند. زیرا پروتئین‌ها در گیاهان می‌توانند دچار اصلاحات پس از ترجمه شوند. همچنین واکسن‌های گیاهی به‌طور معمول عاری از سموم و پاتوژن‌هایی هستند که در باکتری‌ها و مخمرها تولید می‌شوند. بنابراین نسبت به واکسن تولیدشده با استفاده از پروکاریوت‌ها و مخمرها ایمن‌تر هستند. همچنین واکسن‌های گیاهی پتانسیل ایجاد پاسخ ایمنی مخاطی و سیستمیک را بدون درد و خطر ناشی از تزریق دارند (Shahid & Daniell, 2016). با توجه به اینکه یک محصول دارویی گیاهی قرار است به صورت نیمه فرآوری‌شده (مانند پوره سیب‌زمینی یا رب گوجه‌فرنگی) به‌عنوان واکسن مصرف شود، مهم است که بررسی‌های نظارتی خاصی که برای واکسن‌های تزریقی اعمال می‌شود، برای این محصولات نیز اعمال شود تا عوارض مصرف آن‌ها از نظر بالینی بررسی شود (Wang & Ma, 2012). در این‌صورت واکسن‌های خوراکی ممکن است بر مشکلات تولید، توزیع و تحویل که در ارتباط با واکسن‌های سنتی است، غلبه کنند. از این‌رو جامعه پزشکی تمایل زیادی به تولید پروتئین‌های نوترکیب انسانی در گیاهان تراریخته نشان می‌دهند (Zaer & Kolivand, 2019). در پایان می‌توان گفت با وجود اینکه سال‌هاست بر روی واکسن‌های گیاهی پژوهش می‌شود، اما هنوز چالش‌های اساسی و مهم خود را دارد که برای گسترش تولید انبوه آن‌ها باید حل شود (Wang & Ma, 2012).

- Ma, J. K.-C., Drossard, J., Lewis, D., Altmann, F., Boyle, J., Christou, P., Cole, T., Dale, P., van Dolleweerd, C.J., Isitt, V., Katinger, D., Lobedan, M., Mertens, H., Paul, M. J., Rademacher, T., Sack, M., Hundleby, P.A.C., Stiegler, G., Stoger, E., ... Fischer, R. 2015. Regulatory approval and a first-in-human phase I clinical trial of a monoclonal antibody produced in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnology Journal* 13: 1106-1120. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/pbi.12416>
- Maharjan, P.M. & Choe, S. 2021. Plant-Based COVID-19 Vaccines: Current Status, Design, and Development Strategies of Candidate Vaccines. *Vaccines* 9: 992. <https://doi.org/10.3390/vaccines9090992>
- Mardanov, E.S., Blokhina, E.A., Tsybalova, L.M., Peyret, H., Lomonosoff, G.P. & Ravin, N.v. 2017. Efficient transient expression of recombinant proteins in plants by the novel pEff vector based on the genome of potato virus X. *Frontiers in Plant Science* 8. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.00247/FULL>
- Meriç, S., Gümüş, T. & Ayan, A. 2021. Plant-based Vaccines: The Future of Preventive Healthcare? In *Botany - Recent Advances and Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.97861>
- Monreal-Escalante, E., Ramos-Vega, A., Angulo, C. & Bañuelos-Hernández, B. 2022. Plant-Based Vaccines: Antigen Design, Diversity, and Strategies for High Level Production. *Vaccines* 10: 100. <https://doi.org/10.3390/vaccines10010100>
- Niknejad, A. 2018. Plant-based expression systems for protein and antimicrobial peptide production. *Nova Biologica Reperta* 5: 262-273. <https://doi.org/10.29252/nbr.5.3.262>
- Rivera, A. L., Gómez-Lim, M., Fernández, F. & Loske, A. M. 2012. Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews* 9: 308-345. <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2012.06.002>
- Rosales-Mendoza, S., Márquez-Escobar, V.A., González-Ortega, O., Nieto-Gómez, R. & Arévalo-Villalobos, J. I. 2020. What Does Plant-Based Vaccine Technology Offer to the Fight against COVID-19? *Vaccines* 8: 183. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020183>
- Rutkowska, D.A., Mokoena, N.B., Tsekoa, T.L., Dibakwane, V.S. & O'Kennedy, M.M. 2019. Plant-produced chimeric virus-like particles - a new generation vaccine against African horse sickness. *BMC Veterinary Research* 15: 432. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2184-2>
- Rybicki, E.P. 2010. Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnology Journal* 8: 620-637. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00507.x>
- Shahid, N. & Daniell, H. 2016. Plant-based oral vaccines against zoonotic and non-zoonotic diseases. *Plant Biotechnology Journal*: 2079-2099. <https://doi.org/10.1111>
- Shanmugaraj, B., Siri wattananon, K., Malla, A. & Phoolcharoen, W. 2021. Potential for Developing Plant-Derived Candidate Vaccines and Biologics against Emerging Coronavirus Infections. *Pathogens* 10: 1051. <https://doi.org/10.3390/pathogens10081051>
- Sharma, S., Suvalka, C., Bharti, Joshi, M. & Bahuguna, A. 2021. Potential inhibitors and plant based technology: An alternative approach to treat coronavirus. *Bioorganic Chemistry* 117: 105460. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105460>
- Shoeb, E. & Hefferon, K. 2019. Future of cancer immunotherapy using plant virus-based nanoparticles. *Future Science OA* 5. <https://doi.org/10.2144/foa-2019-0001>
- Steele, J.F.C., Peyret, H., Saunders, K., Castells-Graells, R., Marsian, J., Meshcheriakova, Y. & Lomonosoff, G.P. 2017. Synthetic plant virology for nanobiotechnology and nanomedicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 9: 1-18. <https://doi.org/10.1002/wnan.1447>
- Streatfield, S.J. 2005. Plant-based vaccines for animal health. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 24: 189-199.
- Streatfield, S.J., Jilka, J.M., Hood, E.E., Turner, D.D., Bailey, M.R., Mayor, J.M., Woodard, S.L., Beifuss, K.K., Horn, M.E., Delaney, D.E., Tizard, I. R. & Howard, J.A. 2001. Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine*, 19: 2742-2748. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00512-0](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00512-0)
- Venkataraman, S., Hefferon, K., Makhzoum, A. & Abouhaidar, M. 2021. Combating human viral diseases: Will plant-based vaccines be the answer? *Vaccines* 9: 761. <https://doi.org/10.3390/vaccines9070761>
- Wang, A. & Ma, S. 2012. Molecular farming in plants: Recent advances and future prospects. In *Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2217-0>
- Zaer, Z. & Kolivand, D. 2019. Application of Plant Viruses as Vectors for the Production of Edible Vaccines in Plants.
- Zieneldien, T., Kim, J., Cao, J. & Cao, C. 2021. Covid-19 vaccines: Current conditions and future prospects. *Biology* 10. <https://doi.org/10.3390/biology10100960>

How to cite this article:

Niknejad, A., Shafizadeh EsfandAbadi, A., Abdollahi Sarvestani, F. 2023. Plant-based vaccines production and conducted experiments in this case, as an effective strategy to combat infectious diseases, such as coronavirus disease (COVID-19). *Nova Biologica Reperta* 10: 17-32. (In Persian).

نیک‌نژاد، آ.، شفیعی‌زاده اسفندآبادی، ع.، عبدالهی سروستانی، ف. ۱۴۰۲. تولید واکسن‌های گیاهی و آزمایش‌های انجام شده در این مورد به عنوان راهبردی مؤثر جهت مقابله با بیماری‌های عفونی از جمله کووید ۱۹. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۱۰: ۱۷-۳۲.