



Derleme Makalesi / Review Article, 3(2): 13 - 29, 2022

<https://dergipark.org.tr/en/pub/batd/article/915189>

DOI: 10.53445/batd.915189

Geliş Tarihi: 13 Nisan 2021, Kabul Tarihi: 04 Şubat 2022, Yayın Tarihi: 29 Nisan 2022

Received: 13 April 2021, Accepted: 04 February 2022, Published: 29 April 2022

## Covid-19 Pandemisi ile Mücadelede Biyoteknolojik Yaklaşım: Bitki Biyoteknolojisi, Kullanımı ve Önemi

Adem ZORLU 

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 34668, İstanbul, Türkiye

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Adem ZORLU, e-posta: drademzorlu@gmail.com

### ÖZET

Yeni tip koronavirüs (2019-nCoV) ilk olarak Aralık 2019'da tanımlanan yeni bir patojendir. 11 Mart 2020 de Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından pandemi ilan edilmiştir. Tüm dünyayı etkisi altına alan bu salgınla mücadelede bitki biyoteknolojisi bize yardımcı olabilir. Bu kapsamda bitkilerin biyoteknolojik uygulamaları üzerine çalışan araştırmacılar, bilgi ve altyapılarını, yeni teşhis reaktifleri ve terapötikler geliştirmek ve üretmek için bir araç olarak kullanarak bu kritik dönemde önemli bir rol oynayabilirler. Bitkiler bize Covid-19 ile mücadelemizde üç farklı alanda büyük katkı sağlayabilir: Enfekte ve iyileşmiş bireyleri tanımlamak için teşhis reaktifleri, enfeksiyonu önlemek için aşılarda ve semptomları tedavi etmek için antiviral ilaçlar olarak. Bununla birlikte bitkiler kullanılarak elde edilecek ürünlerin uygun maliyeti sayesinde tüm dünyada kullanımı hızla yayılabilecektir. Ayrıca moleküler tarım, antikor, aşı, hormon ve enzimler içeren oldukça değerli rekombinant proteinlerin üretimi için bitki türlerinin konakçı olarak kullanılmasını içeren biyoteknolojisi uygulaması olarak kullanılabilir. Bitkilerden üretilmiş antijenler ve antikorlar da teşhis için uygun araçlar olabilir; antijenik determinantları ve özgüllüğünü koruyarak düşük maliyetli proteinler sağlanabilir. Bitkilerdeki geçici ekspresyon, bakteri hücrelerine ve memeli hücrelerine dayanan geleneksel platformlardan daha hızlıdır, çünkü nihai ürünü üreten sabit hücre çizgileri oluşturma zorunluluğu yoktur veya ölçeklenebilirlik nedeniyle ölçeklendirilmiş işlemlerin geliştirilmesine de gerek yoktur. Bu nedenle geçici ekspresyon, birkaç hafta içinde klinik test için malzeme sağlanmasına izin verir ve klinik sınıf materyalin büyük ölçekli üretimi, minimum yatırımla mümkündür. Bu derlemede Covid-19 ile mücadelede bitki biyoteknolojisinin bize kazandırdıkları ve önümüzdeki süreçte bu teknolojinin nasıl kullanılabileceği anlatılmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Covid-19, Bitki Biyoteknolojisi, Moleküler Tarım



# Biotechnological Approach in Fighting Covid-19 Pandemic: Plant Biotechnology, Its Use and Importance

## ABSTRACT

New type coronavirus (2019-nCoV) is a new pathogen first described in December 2019. Pandemic was declared by the World Health Organization (WHO) on March 11, 2020. Plant biotechnology can help us to fight this epidemic, which affects the whole world. In this context, researchers working on the biotechnological applications of plants can play an important role in this critical period, using their knowledge and infrastructure as a tool to develop and produce new diagnostic reagents and therapeutics. Plants can make a big contribution to us in our fight against Covid-19 in three different areas: Diagnostic reagents to identify infected and healed individuals, vaccines to prevent infection and antiviral drugs to treat symptoms. In addition, thanks to the affordable cost of the products to be obtained using plants, its use will be spread rapidly all over the world. Also, molecular agriculture, it can be used as a biotechnology application involving the use of plant species as hosts for the production of highly valuable recombinant proteins containing antibodies, vaccines, hormones and enzymes. Plant-made antigens and antibodies may also be suitable tools for diagnosis; low-cost proteins can be provided by preserving antigenic determinants and specificity. Transient expression in plants is faster than traditional platforms based on bacterial cells and mammalian cells because there is no obligation to create fixed cell lines that produce the final product or scaled processes need to be developed due to scalability. Therefore, transient expression allows for material testing for clinical testing within a few weeks, and large-scale production of clinical grade material is possible with minimal investment. In this review, it is explained what plant biotechnology has brought us to fight Covid-19 and how this technology can be used in the upcoming period.

**Key Words:** Covid-19, Plant Biotechnology, Molecular Agriculture

## GİRİŞ

Yeni tip koronavirüs (2019-nCoV/ Covid 19/ SARS-CoV-2), Çin'in Wuhan şehrinde, ilk olarak Aralık 2019'da tanımlanan yeni bir patojendir. Çin ve diğer ülkelerde vaka sayısının artmasıyla Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2019-nCoV salgınını 30 Ocak 2020 tarihinde uluslararası endişe veren küresel sağlık acil durumu ilan etti. 11 Mart 2020 de DSÖ tarafından pandemi ilan edildi ve 20 Haziran 2020 tarihi itibarıyla enfekte olmuş kişi sayısı 9 milyonu aştı. Bu virüs, insanlarda ciddi

solunum yolu hastalıklarına ve pnömoni benzeri enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu virüs suşu daha önceden bilinmemektedir ve ilk kez insanlara bulaştığı bildirilmiştir. Virüsün hızla yayılmasını önlemek adına birçok ülke sınır güvenliği önlemlerini sıkılaştırdı, semptom gösteren insanları araştırdı ve yayılmasını kontrol etmek için acil adımlar attı. Bu önlemlerin amacı enfeksiyonun yayılmasını geciktirmek, böylece hastane yatak kapasitesi, sahada çalışan sağlık personeli ve sağlık kaynakları üzerinde akut baskıyı azaltmaktır.



Enfeksiyon oranını yavaşlatmak ve böylece herhangi bir zamanda toplam akut vaka sayısını azaltmak, ulusal sağlık sisteminin çökmemesine yardımcı olacaktır. Uygulanan bu önleme prosedürleri ayrıca araştırmacılara Covid-19 taşıyıcılarını tanımlamak için etkili test analizleri, semptomların şiddetini azaltan ve enfeksiyonları daha hızlı çözen tedavi yöntemleri ve popülasyonda enfeksiyon etkenine maruz kalmamış kesimi korumak adına aşı geliştirilmesi için daha fazla zaman kazandırmaktadır.

Çeşitli bulaşıcı hastalıklarla ilişkili mortalite son yıllarda azalmıştır ve dünyanın birçok yerinde küresel yaşam beklentisi artmış olsa da bulaşıcı hastalık tehditleri halen en büyük küresel zorluklardan ve endişelerden biri olmaya devam etmektedir. Küresel sağlık sistemi, insanlarda ortaya çıkan ve yeniden ortaya çıkabilecek hastalıklara karşı etkili bir koruma sağlayan, farklı bölgesel veya küresel düzeylerde faaliyet gösteren, özel ve kamu sağlığı sektörü de dahil olmak üzere sıkı bir sistem geliştiren birçok organizasyon ağından oluşmaktadır.(Bloom & Cadarette, 2019)

SARS-CoV-2 virüsünün neden olduğu Covid-19 salgını, insanın yaşam tarzı, ekonomik, sosyal ve küresel ilişkileri üzerine dramatik bir etkiye sahiptir. Ölüm oranı yaklaşık %0.02 olan H1N1 salgını ile karşılaştırıldığında, Covid-19 daha yüksek ölüm oranına (%3) ve daha yüksek bulaşıcılığa

(üç aylık dönem içinde üç ülkeden 200 ülkeye ve binlerce farklı bölgeye yayılmıştır) sahiptir. Bu durum bize yeni aşılardan, antikorların, ilaç üretimlerinin ve onaylanma süreçlerinin hızlandırılmasının gerektiğini belirtmektedir. Önümüzdeki dönemde karşılaşılabileceğimiz daha büyük endişe, bu salgının gelişmekte olan ve düşük gelirli ülkelerdeki etkisidir. Aşı geliştirme aciliyeti göz önüne alındığında, Uluslararası ilaç koalisyonu düzenleme makamları, Covid-19 aşı geliştirmesi üzerine ilk küresel düzenleyici çalıştayının bir derlemesini yayınlamıştır. Buradaki kilit noktalar, test aşısı ile hastalık artışı riskini içeren klinik öncesi veri gereksinimlerini içermektedir (International Coalition of Medicines Regulatory Authorities, 2020). İkinci özellik ise SARS'a karşı aday aşılardan emsalleri göz önüne alındığında, hangi fenomenlerin gözlemlendiğidir. Bu durum, istenmeyen bağışıklık yanıtlarını tetikleyen epitoplardan kaçınarak rasyonel aşı tasarımına duyulan ihtiyacı vurgulamaktadır (Wang et al., 2016). Sars aşısı adaylarını değerlendirmek için geliştirilen modeller; fareler, gelincikler ve maymunlara dayanan modeller içerir, klinik öncesi değerlendirmeler yapmak için değerli bir başlangıç noktası olacaktır (Gretebeck & Subbarao, 2015).

Antikor aracılı tedavi (pasif immünizasyon) durumunda, ilginç bir gerçek, SARS-CoV-1 virüsünün SARS-CoV-2 virüsü



ile çapraz reaktivitesidir, hali hazırda geliştirilen bu biyolojik maddelerin Covid-19 ile savaşmak için sahaya girebileceğini düşündürmektedir (Tian et al., 2020). Bu nedenle, SARS-CoV-1 virüsüne karşı monoklonal antikörlerin mevcudiyeti, Covid-19 'un tedavi potansiyelini incelemek için değerli bir kaynaktır.

Bitkilerin biyoteknolojik uygulamaları üzerine çalışan araştırmacılar, bilgi ve altyapılarını, yeni teşhis reaktifleri ve terapötikler geliştirmek ve üretmek için bir araç olarak kullanılarak bu kritik dönemde önemli bir rol oynayabilirler. Gerçekten de bitkiler, bu reaktiflerin hücre tabanlı sistemlerde aylarca hatta yıllarca sürebilecek bir zaman zarfında alınabilecek sonuçlarını, bitki platformu ile haftalarla belirtilen bir süre zarfı içinde üretilebilir. Bitkiler bize Covid-19 ile mücadelemizde üç farklı alanda büyük katkı sağlayabilir: Enfekte ve iyileşmiş bireyleri tanımlamak için teşhis reaktifleri, enfeksiyonu önlemek için aşılarda ve semptomları tedavi etmek için antiviral ilaçlar. Bununla birlikte bitkiler kullanılarak elde edilecek ürünlerin uygun maliyeti sayesinde tüm dünyada kullanımı hızla yayılabilecektir.

### 1.Yeni Tip Koronavirüs 2019-nCoV

Koronavirüsler, koronaviridae ailesine, koronavirinae alt familyasına aittir. Dört cins koronavirüs mevcuttur ikisi memelileri enfekte

eden Alpha-coronavirüs ve Beta-coronavirüs dür, Gamma-coronavirüs kuş türlerini enfekte eder ve Delta-coronavirüs de hem memeli hem de kuş türlerini enfekte eder. Koronavirüs pozitif iplikçikli yaklaşık 26 ile 33 kb'lik tek sarmallı RNA genomuna sahip geniş zarflı bir virüstür, kuşlar, insanlar, develer, yarasalar, fareler, köpekler ve kediler arasında yayılım gösterir (Lu et al., 2020). Genom sarmal bir kapsid ve zarf ile çevrilidir, spike proteini, zarfta koronal bir görünüm veren bir taç şeklinde büyük çıkıntılar oluşturur. Latince corona kelimesi taç anlamına gelir (Li, 2016; Weiss & Leibowitz, 2011). İnsan koronavirüsleri, soğuk algınlığı, pnömoni ve bronşiolit dahil olmak üzere değişen şiddetli solunum yolu enfeksiyonlarına ve bağırsak enfeksiyonlarına sebep olduğu bilinen büyük bir koronavirüs grubudur. HCoV-229E, DC43, NL63 ve HKU1 gibi insan koronavirüsleri genellikle insanlarda hafif enfeksiyonlara neden olur. Bununla birlikte Beta-coronavirüslerin başlangıcı, 2003 yılında Çin'in Guangdong eyaletinde şiddetli akut solunum sendromu-koronavirüs (SARS-CoV) salgınıyla başladı daha sonra 2012'de orta doğu solunum yolu sendromu-koronavirüs (MERS-CoV) salgını görüldü. Her iki virüsünde (SARS-CoV-1 ve SARS-CoV-2) yarasalardan kaynaklandığı ve daha sonra insanlara bulaştığı düşünülmektedir (Cui et al., 2019). Son yıllarda mutasyon, yüksek nükleotid ikame oranları,



yeni bir konakta enfeksiyon oluşturma yeteneği ve türler arası bulaşma nedeniyle hızlı bir gelişim göstermiştir.

Aralık 2019'da Çin, SARS'a benzer, geçici olarak 2019 yeni koronavirüs (2019-nCoV) adı verilen yeni Beta-coronavirüsün neden olduğu doğrulanan birçok viral pnömoni benzeri hastalık vakası tespit etti (2019-nCoV). O zamandan beri yeni koronavirüs salgını dünya çapında dikkat çekti. Hastalığın potansiyel nedeni hala bilinmemekle birlikte, ilk raporlar virüsün muhtemelen zoonotik kökenli olduğunu tahmin ediyordu.

2019-nCoV, yeni koronavirüs enfekte pnömoni (NCIP) olarak adlandırılan, insanlarda ciddi solunum yolu enfeksiyonu için nedensel ajandır. nCoV, yüksek patojenik SARS-CoV ve MERS-CoV virüslerinden sonra insanlarda ölümcül solunum hastalıklarına neden olduğu bilinen üçüncü koronavirüstür.

## 2.Moleküler Tarım: Olgun Bir Teknoloji

Moleküler tarım; antikor, aşı, hormon ve enzimler içeren oldukça değerli rekombinant proteinlerin üretimi için bitki türlerinin konakçı olarak kullanılmasını içeren biyoteknoloji uygulamasıdır (Fischer & Buyel, 2020). Otuz yıl önce rapor edilen tesis bazlı üretim alanındaki ilk çalışmalar, düşük protein verimi ve istikrarsız ürün imalinden dolayı ürün üretiminde zayıf vermiştir. Bitki genetik mühendisliği, yaklaşımları iyileştirilmiştir ve

günümüzde kg bitki yaprağı başına 5 gr protein verimi sağlayan sofistike ekspresyon platformları mevcuttur (Gleba et al., 2005). Örneğin, cGMP işlemleri altında *Nicotiana benthamiana* tütün bitkileri büyütülebilir ve geçici proteine maruz bırakılabilir, bu da hedef proteinin etkin ekspresyonunu tetikler. Birkaç gün içinde, bitki yaprağı biyokütlesi toplanır ve hedef biyofarmasötikler saflaştırmak için işlenir. Enjekte edilebilir formülasyonlar, kolaylıkla ölçeklendirilebilen bu tip platformlarda elde edilir (Margolin et al., 2019; Marsian et al., 2017). Diğer platformlar, hücre kültürleri süspansiyonlarıyla biyoreaktörleri kullanarak bitki biyokütlesinin üremesine dayanmaktadır (Choi et al., 2016; Mor, 2015). Ayrıca üretim süreçlerinin iyileştirilmesi düzenleyici kurumlarının gerekliliklerinin kalitesini ve yerine getirilmesini olumlu etkilemiştir; ICH (Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu-Uluslararası İnsan Kullanımı için İlaçların Teknik Gereksinimlerinin Uyumlaştırılması Konseyi) yönergelerine uyum üretim süreçleri için önem taşımaktadır. (Bashandy et al., 2015; Buyel et al., 2013).

Bu anlamda bazı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar, ABD FDA tarafından belirtilen ilaçlar için mevcut iyi üretim uygulamaları (cGMP) ilkelerine göre ölçeklendirmeye eğilimli süreçlerin uygulanmasını sağlamıştır. Bugün bitki yapımı biyofarmasötikler gerçek olmuştur. Şu anda bir



ürün pazara girmiş bulunmaktadır, bu ilaç Gaucher hastalığı için replasman tedavisi olarak reçete edilen taligluserase alfadır (biyoreaktörlerden elde edilen havuçtan yapılan bir enzim) (Fischer & Buyel, 2020). Diğer bitkisel biyofarmasötik ürünlerde onaylanmaya yakındır, örneğin Medicacago Inc. (Mitsubishi Tanabe Pharma) tarafından üretilen influenza aşılarını değerlendirmek için klinik çalışmalar devam etmektedir (Pillet et al., 2019). Ayrıca Zmapp (bitki yapımı monoklonal antikor kokteyli) 2014 yılında Ebola salgını sırasında dikkatleri üzerine çekmiştir. Hastaları tedavi etmek için ilaç kullanıma çıkmadan önce iki hasta üzerinde uygulanmıştır (Tully et al., 2015).

Bugün gliko-mühendislik yaklaşımları, hedef antikorların fonksiyonel aktivitesinin ve güvenliğinin optimize edilmesine izin verecek spesifik antikor glikoformlarını sağlamak için mevcuttur. Ayrıca, fonksiyonel tek zincirli antikorlarda bitki sistemlerinde üretilir; viral nötralizasyon için daha basit moleküller sağlar (Rosales-Mendoza, 2020). Bitki yapımı antijenler ve antikorlar da teşhis için uygun araçlar olabilir; antijenik determinantları ve özgüllüğünü koruyarak düşük maliyetli proteinler sağlanabilir (Rybicki, 2020; Vaquero et al., 1999).

Bununla beraber, bu avantajlar genellikle biyolojik imalat endüstrisinde kullanılan ana üretim platformlarının yerini alacak kadar ikna

edici olmamıştır. Bu yerleşik platformlar, esas olarak bu sistemler için var olan sağlam düzenleyici çerçeve ve ilgili üretim teknolojilerine yapılan endüstri yatırımı nedeniyle *E. coli* bakterisi ve birkaç başka mikrobiyotadan ve çeşitli memeli hücre hatlarından yararlanılmaktadır. Bununla birlikte, bitkiler, uygun glikan konfigürasyonları (taligluserase alfa gibi) (Mor, 2015) biyolojik metodlarla üretebilirler. Bitkilerin diğer bir avantajı büyük ölçekte üretime izin vermeleridir (HIV mikrobisidleri için gerektiği gibi) (Capell et al., 2020; E. Vamvaka et al., 2014) ve mevcut durumla en alakalı geçici ekspresyon sistemleri kullanıldığında, ani ve öngörülmeyle talebi karşılamak için çok hızlı bir şekilde ölçeklendirilebilirler. (Whaley et al., 2011).

### 3.Kullanım Alanları

#### 3.1.Teşhis Reaktifleri

Covid-19'un hızla yayılması, teşhis kitleri için ani ve büyük bir talep yaratmıştır, bu da ilgili reaktiflerde kritik bir eksiklik ve bunları üretme yollarını ortaya çıkarmıştır. İki ana teşhis reaktifi gereklidir, biri virüsün kendisini tespit etmek ve böylece hastalığın enfekte olmuş popülasyonunu ve potansiyel yayıcılarını tanımlamaktır, diğeri virüse karşı antikorları tespit etmek ve böylece şu anda enfekte olmuş ve aynı zamanda iyileşen ve (potansiyel olarak) bağışıklık popülasyonunu tanımlamaktır.





Virüs saptaması için tahliller virüs genomik RNA'sının saptanmasına dayananlar ve virüs proteinin saptanmasına dayananlar olarak iki kategoriye ayrılır. RNA bazlı analiz, SARS-CoV-2 dizisinin GenBank'ta (NCBI referans dizisi: NC\_045512.2) bulunmasından kısa süre önce geliştirilmiştir. Çünkü virüs RT-PCR ile tespit edildi ve tek spesifik test bileşenleri primerler, sentezlenmesi kolaydır. Bununla beraber bu test ile ilgili problem farklı test laboratuvarında standardizasyona izin verecek evrensel bir pozitif kontrolün olmamasıdır.

George Lomonosoff ve Hadrien Peyret liderliğindeki John Innes Centre'de (<https://www.jic.ac.uk/> - JIC, Norwich, İngiltere) bir grup, Börülce mozaik virüsünden (BMV-CPMV-Cowpea mosaic virus) türetilen virüs benzeri partiküllere (VLP: virus like particle) dayanan Covid-19 için bir teşhis kontrol reaktifi geliştirmiştir. VLP'ler ana virüsle aynı yapıya sahiptir, ancak doğal genomundan yoksundur bu nedenle çoğalamazlar. İlk olarak şap hastalığı virüsünün (King et al., 2007) patlak vermesi ile bu yaklaşım geliştirilmiştir, JIC grubu, tespit edilen tüm SARS-CoV-2 genom bölgelerini içeren yapay RNA'yı paketledi ve bitkilerden CPMV'den türetilmiş VLP'leri Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından üretilen test kitleri ile birleştirdi. VLP'ler, RT-PCR deneylerinde bir pozitif kontrol RNA kaynağı olarak

kullanılabilen termostabil, tekrarlanabilir ve ölçeklenebilir standart reaktiflerdir.

Olgun SARS-CoV-2 partikülü, Zarf (E), Membran (M), Nükleokapsid (N) ve Başak (Spike, S) proteinleri olarak bilinen dört yapısal protein içerir, ancak S proteini reseptör bağlama alanı (RBA) açısından en önemli olanıdır.

Bütün SARS-CoV-2 preparatlarının izole edilmiş veya rekombinant S proteini, RBA'nın farelere enjeksiyonu, hibridoma (Hibridoma teknolojisi, aynı antikordan çok sayıda üretmek) için bir yöntemdir. Bu işlem, bir fareye bağışıklık tepkisini provoke eden bir antijen enjekte ederek başlar. Bir tür beyaz kan hücresi, B hücresi, enjekte edilen antijene bağlanan antikorlar üretir.) klonları üretmek için kullanılabilir veya S proteininin RBA faj antikor görüntüleme kütüphaneleri veya benzer platformları taramak için kullanılabilir. Sonuçta bu, S proteini için yüksek afiniteye sahip antikor sekanslarını verir ve bu antikorların büyütülmüş üretimi, enzime bağlı immünsorban testi (ELISA) gibi daha hızlı ve daha uygun formatlar kullanılarak kitlerin virüs tespiti için stoklanmasına izin verir (Banker, 2001; Capell et al., 2020).

Rekombinant virüs proteinlerinde olduğu gibi bitkilerdeki geçici antikor ekspresyonu kısa vadede üretimi artırmak için hızlı bir şekilde ölçeklenebilir bir ekspresyon platformu



sağlar: transgenik bitkiler, daha uzun süreli yüksek hacimli bir tedarik ihtiyacı karşılar.

Moleküler çiftçiliğin tarihi, 30 yıldan daha uzun bir süre önce Nature dergisinde yayınlanan ve tütün (*Nicotiana tabacum*) (Hiatt et al., 1989) bitkisinden elde edilen antikörlerini tanımlanması ile başladı, tütün hala antikör üretimi için en sık en büyük kullanım alanına sahip ekspresyon stratejisi ve konakçı türler/platform açısından çeşitliliği olan ürün sınıfı olmaya devam ediyor. Bitkilerde SARS-CoV-2 antikörlerinin üretimi için kapsamlı bilgidenden yararlanılabilir ve bitkiden türetilmiş antikörlerin stabil ve fonksiyonel olmasını ve yüksek verimde üretilmesini sağlamak için bu bilgilerden faydalanılır.

SARS-CoV-2 dizisinin yayınlanması teşhis reaktifleri olarak rekombinant viral proteinlerin üretilmesi için gerekli bilgileri sağladı. Bu tür proteinlerin mevcudiyeti, iyileşen hastalarda serum antikörlerini özellikle S proteinine karşı antikörleri tespit etmek için tahlillerin derhal geliştirilmesine izin verir. Bitkiler kitlerin test merkezlerine dağıtılmak üzere üretilmesi ve stoklanabilmesi için bu proteinleri muazzam ölçekte birkaç hafta içinde üretmek için araçlar sağlar. Buna karşılık, aynı reaktifleri ifade eden hücre dizilerinin kurulması ve üretim kapasitesinin gerekli seviyelere çıkması yıllar alacaktır.

### 3.2. Aşılar

Aşı geliştirmeye yönelik geleneksel bir yaklaşım, inaktive edilmiş veya zayıflatılmış SARS-CoV-2 suşlarına dayanacaktır, ancak bu yaklaşımların yeterli malzeme üretmesi uzun zaman almaktadır ve aşıların, yeniden kazanılmış virülans riski de dahil olmak üzere bir çok dezavantajı ve yan etkisi vardır (Du et al., 2009; Regla-Nava et al., 2015).

Daha hızlı ve daha güvenilir bir alternatif, tek tek proteinlere dayanan alt ünite aşılarının üretilmesidir; bunlar uygun bir adjuvanla birincil takviye programında bireysel SARS-CoV-2 antijenleri veya SARS-CoV'un birden fazla kopyasına sahip VLP'ler olarak sunulabilir. Her iki stratejide Covid-19 salgınıyla mücadele etmek için bir araç olarak geliştirilmektedir. SARS-CoV-2'nin dört yapısal proteininin tümü potansiyel olarak nötralize edici antikörler ve CD4+/CD8+ T hücresi tepkileri ortaya çıkarabilir (Shang et al., 2020). Bununla birlikte, orijinal SARS-CoV suşu üzerinde yapılan araştırmalar, N proteininin CoV aileleri arasında (yaygın soğuk algınlığı şeklinde sık karşılaştığımız olanlar dahil) yüksek oranda korunduğu için uygun olmadığını gösterdi. N'ye karşı üretilen antikörler koruyucu bağışıklık sağlamazken, M ve E proteinleri sadece zayıf koruyucu yanıtlar ortaya çıkarır (Gralinski & Menachery, 2020).

Alışılmadık şekilde koronavirüsler arasında, SARS-CoV-2 S proteini proteolitik





olarak bir S1 alt birimine (685 aminoasit) ve bir S2 alt birime (membranı kapsayan-588 aminoasit) bölünür: ikincisi CoV aileleri arasında yüksek oranda korunur (%99). Aksine S1 diğer insan CoV suşlarına sadece %70 özdeşlik gösterir ve farklılıklar RBA'da yoğunlaşır bu da hücre yüzeyindeki anjiotensin dönüştürücü enzim 2'ye (ACE2) bağlanarak virüsün girişini kolaylaştırır (Wan et al., 2020).

Virüs girişini, nötralize edici antikor tepkilerini veya antikora bağlı hücre aracılı sitotoksisite (ADcc)/çapraz sunumun sağladığı koruyucu hücresel bağışıklığı, engellemek enjeksiyonu kontrol etmek için başarılı bir stratejidir ve orijinal SARS-CoV için aşı adaylarının çoğu, bu nedenle S proteinini hedefler (Du et al., 2009). Tütün içinde geçici ekspresyonla üretilen mevsimsel veya pandemik influenza suşları içinde dahil olmak üzere birçok alt birim aşı adayı bitkilerde üretilmiştir. Aşılar hemaglutinin ve nöraminadaz sekanslarını aldıktan sonraki üç hafta içinde ve *Agrobacterium tumefaciens* ile agroinfiltrasyonla verilen Tütün mozaik virüsüne dayanan dekonstriksiyon vektörler kullanılarak üretilmiştir (bu teknolojik yaklaşımın temeli 20 yıl önce gerçekleştirildi) (Pandey et al., 2010; Vaquero et al., 1999). Bir kg yaprak başına 200 mg'a kadar protein üretilmiştir (Shoji et al., 2012).

İnsanlarda ve bitkilerdeki karmaşık glikanların farklı yapısının bitki bazlı bir

SARS-CoV-2 aşısının etkinliğinde bir fark yaratıp yaratmadığı belirsizdir, ancak yüksek mannoz glikanlarının yapısı daha yüksek ökaryotlarda tamamen korunmaktadır, en azından bu epitoplar kararlı olacaktır. Bitkilerde elde edilen bir koronavirüs S proteininin önceki tek raporu, domuzun S1 ektodomainiydi (ektodomain, hücre dışı boşluğa uzanan bir membran proteininin alanıdır).

Ektodomainler genellikle proteinlerin yüzeylerle temasını başlatan ve sinyal iletimine yol açan kısımlarıdır. SARS-CoV'de, başak (spike) proteininin ektodoma, enfeksiyon sırasında hücrelere bağlanmasından ve hücrelere girmesinden sorumludur ve transgenik *Arabidopsis thaliana* (fare kulağı teresi) üretimi sürecinden eksprese edilen geçirgen gastroenterit korona virüsüyü (TGEV) (Gómez et al., 1998).

Bu rekombinant antijen, farelerde TGEV spesifik antikorları ortaya çıkardı, bu da immünojenik koronavirüs antijenlerinin bitkilerde üretililebildiğini gösterdi. SARS-CoV-2 antijenlerini aşı olarak gösteren VLP'lerin geliştirilmesinin birçok avantajı vardır, çünkü parçacıklar boyutları nedeniyle antijen sunan hücreler tarafından verimli bir şekilde alınır, adaptif bağışıklık sistemini tetikler ve sıralı proteinli yapılar tehlikeli sinyalleri olarak kabul edilir, güçlü hücresel ve humoral yanıtları uyandırabilir (Lua et al., 2014). Bitki virüsüne



dayanan VLP'ler ek bir güvenlik katmanı sağlar, çünkü doğal partiküller bile insanlarda çoğalamaz ve bitkilerde moleküler tarımla büyük miktarlarda üretilebilir.

Virüs alt birim antijenleri ve VLP'leri, vahşi doğada karşılaşıldığında patojene karşı bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarmak için tasarlanırken, SARS-CoV-2'ye karşı rekombinant antikorların enjeksiyonu, enfeksiyonu yavaşlatmaya yardımcı olabilir ve hastaya hastalığa yakalanmadan önce kendi antikorlarını yükseltmek için vücuda zaman verebilir. Bu strateji yakın tarihli hastalardan alınan serumun hastalık semptomlarının şiddetini azaltabileceği ve iyileşmeyi hızlandırabileceği bulgusuyla desteklemektedir (Duan et al., 2020; Shen et al., 2020). Bu nedenle bitkiler, sadece virüs saptama reaktifleri olarak değil aynı zamanda bir tür pasif immünoterapi biçimi olarak antikorlar üretmek için kullanılabilir. Bu yaklaşımın planı, Mapp Biopharmaceutical (San Diego, CA, ABD) ve ticari kolu LeafBio tarafından 2014 yılında Batı Afrikadaki Zaire Ebolavirüs salgını sırasında kurgulanmıştır. Şirket, hayat kurtarıcı potansiyeli ve herhangi bir alternatifin bulunmaması nedeniyle onaylanan ZMapp olarak bilinen üç nötralize edici antikorlardan oluşan bir kokteyl üretti (Hiatt et al., 2015; Na et al., 2015; Qiu et al., 2014). Büyük dozlarda (hasta başına 10 mg a kadar) antikor gerekti, bu da büyük ölçekte büyütülen transgenik

bitkilerin böyle bir ürünün üretimi için tek ekonomik yol olacağı anlamına geliyordu (Ma et al., 2015). Benzer şekilde, geniş ölçüde nötralize edici HIV'e özgü antikorların büyük ölçekli üretimi için transgenik bitkilerin kullanımı büyük bir potansiyeldir. 2G12 ve 2FS gibi antikorların Transgenik tütün, mısır (*Zea mays*) (Rademacher et al., 2008; Ramessar et al., 2008) ve pirinçten (Evangelia Vamvaka et al., 2016) elde edildiği gösterilmiştir.

Alman hükümeti, Fraunhofer IME'ye insan dışı-bir birinci evre klinik araştırmasında test için tütünde 2G12 üretimi için iyi üretim uygulaması (GMP) lisansı verdi, ve benzer bir model, SARS-CoV-2 ye karşı antikorları nötralize etmek için kullanılabilir (Evangelia Vamvaka et al., 2018). Ayrıca pirincin son zamanlarda aktif bileşenlerin önceden formüle edilmiş kokteyllerinin maliyetini azaltabilecek iki antiviral lektinle birlikte 2G2 üretiminin bir aracı olarak çok yönlü olduğu kanıtlanmıştır. Virüsü doğrudan nötralize eden antikorların üretimine ek olarak, bitkilerin en şiddetli ve ölümcül vakaların çoğunda SARS-CoV-2 enfeksiyonu takip eden sitokin fırtınasını inhibe eden büyük miktarlarda terapötik antikor üretmek için de kullanılabilir. Covid-19 tedavisi için tekrar kullanılabilen iki antikor, her ikisi de interlökin-6 reseptörüne (IL-6R) bağlanan ve romatoid artrit tedavisi için endike olan sarilumab/Kevzara ve tocilizumab/Actemra'dır. Her ikisi de Covid-19



için klinik denemelerden geçmektedir (<httpswww.longislandpress.com20200321northwell-health-initiates-clinical-trials-of-2-covid-19-drugs>, [httpswww.swissinfo.chengcovid-19\\_who-and-roche-launch-trials-of-potential-coronavirus-treatments45630498](httpswww.swissinfo.chengcovid-19_who-and-roche-launch-trials-of-potential-coronavirus-treatments45630498)).

Etkili bir aşı uygun fiyatlı olmalıdır, ayrıca üretim platformu da uygun maliyetle üretimi desteklemelidir bu bilgiler temelinde hızlı bir şekilde uygun aşı adayları üretilmelidir. Mevcut ekspresyon sistemlerinin rekombinant protein üretimi için avantajları ve dezavantajları Tablo 1'de gösterilmiştir. Günümüzde bitki ekspresyon sistemi, özellikle aşuların en çok ihtiyaç duyulduğu kaynak, fakir ülkelerde küresel aşılama programını kolaylaştırarak, aşı adaylarının üretimini uygun maliyetle hızlı bir şekilde yapma potansiyeline sahip diğer geleneksel sistemlere göre birçok avantaj sunmaktadır (Shanmugaraj BM & Ramalingam S., 2014). Son yıllarda bitkiler daha çok biyofarmasötiklerin ve virüs benzeri parçacıkların (VLP-virus like particle) üretimine odaklanmaktadır. Bitki yapımı aşuların üretimi için kullanılan teknolojiler kararlı nükleer ekspresyon, ekspresyon ve kloroplast ekspresyonudur. Verim, kalite, zaman ve maliyet gibi birçok hayati faktöre dayanarak, biyofarmasötik üretimi için uygun teknoloji seçilebilir.

Bitki ekspresyon stratejilerindeki son gelişmeler özellikle geçici ekspresyon

sistemi veya viral vektörlerin geliştirilmesi, çeşitli biyofarmasötik proteinlerin üretimi için umut verici bir sistem olan bu bitki konak sistemini yapan protein veriminde büyük bir artışla sonuçlanmıştır (Paul & Ma, 2011). Son 20 yıldaki bazı raporlar üretilen biyofarmasötiklerin memeli hücresi bazlı proteinler kadar etkili olduğunu ve aynı zamanda güçlü nötürleştirici antikolar ortaya çıkardığını veya belirli patojen veya enfeksiyona karşı terapötik etkiler gösterdiğini kanıtlamak için yeterli kanıtlara sahiptir (Margolin et al., 2019; Rattanapisit et al., 2019).

Bitki yapımı biyofarmasötikler, ortaya çıkan bulaşıcı hastalıklara karşı korunmak için etkili ve uygun maliyetli stratejiler sağladığından, bitki ekspresyon sistemleri 2019 nCoV'a karşı aşuların geliştirilmesi için kullanılabilir. Bitkilerdeki geçici ekspresyon, kısa sürede daha fazla protein ürettiği için hızlı tepki aşuları üretmek gerektiğinde biyofarmasötik protein üretimi için uyarlanabilir. 2019 nCoV a karşı bitki bazlı biyofarmasötik üretim, potansiyel epitoplara tanımlanmasını ve zarf bölgesinde mevcut olan tam uzunlukta viral yüzey proteinlerinin üretimini veya immünojenik bölgeyi veya kiremik proteinleri eksprese eden alt birim aşuların üretimini içerecektir.



**Tablo 1.** Farklı terapötik protein üretim platformlarının avantajları ve dezavantajları.

Ekspresyon Sistemi	Avantajları	Dezavantajları
<b>Bakteri Hücreleri</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kullanımı kolay</li><li>• Düşük maliyet</li><li>• Yüksek ekspresyon verimi</li><li>• Ölçek büyütme kolaylığı</li><li>• Kısa geri dönüş süresi</li><li>• Belirlenmiş düzenleme prosedürleri ve onam makamları</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Yanlış katlama</li><li>• Protein fonksiyonunu etkileyebilecek translasyon sonrası değişikliklerin olmaması</li><li>• Endotoksin birikim</li></ul>
<b>Memeli Hücreleri</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Uygun katlanma ve otomatik post-translasyonel modifikasyon</li><li>• Mevcut düzenleyici,onay verici prosedürler sistemi</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Yüksek üretim maliyeti</li><li>• Pahalı besiyeri ve kültür ortamlarına ihtiyaç duyulması</li></ul>
<b>Maya</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hızlı büyüme ve ölçeklenebilirlik</li><li>• Kullanımı kolay</li><li>• Basit ve ucuz besiyeri,kültür koşullarında üretim</li><li>• Post-translasyonel modifikasyon (rekombinant proteinlerle)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kalın ve sert hücre duvarları nedeniyle hücre bozulmasında zorluk</li><li>• Proteinlerin hiperglikozilasyonu</li></ul>
<b>Böcek Hücreleri</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Yüksek ekspresyon seviyeleri</li><li>• Salgılanan,membran ve hücre içi proteinler de dahil olmak üzere kompleks proteinler üretebilme</li><li>• Uygun katlanma ve post-translasyonel modifikasyon</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Yüksek üretim maliyeti ve uzun üretim zaman süresi</li><li>• Pahalı besiyeri ve kültür ortamlarına ihtiyaç duyulması</li></ul>
<b>Bitki</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hızlı ve uygun fiyatlı</li><li>• Optimize edilmiş büyüme koşulları</li><li>• Patojen ve bakteriyel toksin kontaminantları içermez</li><li>• Ekonomik</li><li>• Post-translasyonel modifikasyonu bir parça memeli sistemine benzer</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mevzuata uygunluk (Belirlenmiş düzenleme prosedürleri ve onam makamlarının eksikliği sebebiyle)</li><li>• Sınırlı glikosilasyon kapasitesi</li></ul>



### 3.3. Antiviraller

Antiviral ilaçlar viral replikasyon döngüsünü inhibe eder ve bu nedenle enfeksiyonu yavaşlatır ve bağışıklık sistemine yanıt vermek için daha fazla zaman verir. Birçok antiviral ilaç, sentetik veya yarı sentetik prosesler kullanılarak verimli bir şekilde üretilen küçük kimyasal varlıklardır. Bitki bazlı üretime geçişin faydalı ve pratik olması muhtemel değildir. Bununla birlikte, bazı proteinler, bitkilerde karbonhidrat bağlayıcı proteinler (lektinler) dahil olmak üzere antiviraller olarak da kullanılabilir.

Lektinlerin, virüs yüzeyinde bulunan glikan yapılarını bloke ederek çok çeşitli virüsleri bağladığı ve inaktive ettiği bilinmektedir (Mazalovska & Kouokam, 2018). Örneğin, griffithsin, griffithsia cinsinin kırmızı algleri tarafından üretilen 121-amino asitli lektindir. HIV (Mori et al., 2005), Zaire ebolavirüsü ve müteakip ortadoğu solunum sendromu salgını (MERS-CoV), orijinal SARS salgınından sorumlu (SARS-CoV) koronavirüslerde dahil olmak üzere şu anda aşı bulunmayan birden fazla virüse karşı giriş inhibitörü görevi görür. Griffithsin bu virüslere karşı güçlü bir aktiviteye sahiptir, ancak geniş ve etkili bir terapötik pencere sunan insan hücrelerine karşı düşük toksisiteye sahiptir. Griffithsin'in SARS-CoV'yi inaktive edip etmediği henüz net değildir, ancak SARS-CoV ve SARS-CoV-2'nin yüzeye maruz kalan S

proteini, bazı korunmuş ve belirsiz glikan pozisyonları ile yüksek oranda korunmaktadır (Millet et al., 2016; O'Keefe et al., 2010).

Bu nedenle çapraz reaksiyon çok olasıdır. Benzer şekilde cytovirin, HIV, Zaire Ebola virüsü, Marburg virüsü ve SARS-CoV dahil olmak üzere çoklu virüslere karşı aktif olan siyanobakteri seytonema varumdan 95-aminoasit lektinidir (Keyaerts et al., 2007). 33 ek bitki üzerine yapılan bir çalışmada 20 adayın SARS-CoV a karşı orta nanomolar aralıkta ESCO değeri olduğunu ve 100 mg/mL ye kadar konsantrasyonlarda toksisite olmadığı gösterilmiştir. Mannoza bağlayıcı lektinler tipik olarak SARS-CoV a karşı en güçlü aktiviteyi gösterdi, bu da yüksek mannozlu glikanların etkili hedefler olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, galaktoz, N-asetilgalaktoza, glikoz ve N-asetil-glukosamine özgü lektinler, EC50 değerleri daha geniş bir aralıkta değişmesine rağmen, antiviral etkiler gösterdi. İlginç bir şekilde, lektinle, viral replikasyon döngüsünün ileri farklı aşamasını hedeflediği, kaçış mutantlarının önlenmesi için yerleşik bir mekanizmayı gösterdiği görülmüştür. Bitkiler, griffithsin, siyanovirin-N ve siyanovirin-N füzyon proteinleri dahil olmak üzere bir dizi antiviral lektinlerin yanı sıra griffithsin ve siyanovirin-N'yi eksprese eden transgenik pirinç, üretim süreçleri için kullanılmıştır. Aynı anda tohumlarda, antikor, 2G12 olsun veya olmasın bitkilerdeki geçici ekspresyon antiviral



proteinlere hızlı erişim sağlayacaktır ve işlem birkaç hafta içinde gram miktarları sağlayacak şekilde ölçeklendirilebilir. Daha sonra, daha büyük ölçekli üretim için daha kalıcı bir kaynak sağlamak için transgenik bitkiler kullanılabilir.

## SONUÇ

Bitkilerdeki geçici ekspresyon platformu, SARS-CoV-2 gibi ortaya çıkan patojenlere yanıt olarak teşhis proteinleri, aşı adayları ve antiviral proteinler sağlamak için mükemmel bir platformdur. Viral antijenler veya virüse özgü antikolar gibi teşhis proteinleri, testlerin ve kitlerin bileşenleri olarak hemen kullanılabilirken (değerlendirme ve onay sonrasında), aşular ve terapötikler için geliştirilen bu yol, klinik öncesi ve klinik testlere duyulan ihtiyaçtan çok daha uzundur. Ayrıca farmasötik proteinler GMP (iyi üretim uygulamaları) altında üretilmelidir, bu uygulamalar farmasötik proteinlerin geliştirilme süresini ve maliyetini etkilemektedir.

Buna rağmen, bitkilerdeki geçici ekspresyon, mikroplara ve memeli hücrelerine dayanan geleneksel platformlardan daha hızlıdır, çünkü nihai ürünü üreten sabit hücre çizgileri oluşturma zorunluluğu yoktur veya ölçeklenebilirlik nedeniyle ölçeklendirilmiş işlemlerin geliştirilmesine de gerek yoktur. Bu nedenle geçici ekspresyon, birkaç hafta içinde klinik test için malzeme sağlanmasına izin verir

ve klinik sınıf materyalin büyük ölçekli üretimi, minimum yatırımla mümkündür. Covid-19 un benzersiz zorluğu, talep açısından eşit görülmemiş bir seviyededir, insan nüfusunun çok yüksek orandaki bir kısmının test edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Dünyanın sıfır üretimden çok hızlı ve yüksek miktarda test kitlerine ihtiyacı vardır, gelişmiş ve gelişmekte olan ülke ortamlarında milyarlarca testin yapılma gereksinimi vardır ve transgenik bitkilerle elde edilecek ürünlere bu açıdan önemli bir ihtiyaç vardır. Tütün, baklagiller veya tahıllı bitkileri birçok ortamda yetiştirebilir ve ürünler, antijenler, antikolar veya antiviraller olsun, bu nedenle yerel altyapı gıda için zaten var olan aynı dağıtım ağları ve tahıl tohumları durumunda soğuk zincire ihtiyaç duymadan üretim sağlanır.

HIV profilaksisi bağlamında insani uygulamalar için EU, Pharma-Planta projesinde kurulan bu yaklaşım, SARS-CoV-2 testi için de kullanılarak küresel nüfusunun tüm sektörlerine kaçınılmaz olarak sunulmasını kolaylaştırabilir. Pharma-Planta projesi (<http://www.plantpharma.org/>), moleküler çiftçiliğin uluslararası sınırları üzerindeki düzenleyici yönlerini incelemiştir ve COVID-19 için benzer ilkeler uygulanabilir. Moleküler tarım topluluğu, Covid-19 ile savaşmak için teşhis ve terapötik proteinlerin üretimi için bitki bazlı süreçlerin oluşturulmasında son derece aktiftir. Moleküler çiftçiliğe odaklanan iki AB





konsorsiyumu, bu tür proteinlerin üretimine yardımcı olmak için çabalarını yönlendirmeyi önermektedir. Bunların her ikisi de endüstriyel uygulamalar için bitki tabanlı platformlar geliştiren iki büyük H2020 projesi olan Pharma-Factory ve Newcotianedir. Teşhis kitleri ve terapötik ürünler üreten şirketlere iş birliği, ürünleri üretim hattı boyunca ticarileştirmeye doğru taşımak için çok önemli olacaktır.

Bitki biyoteknolojisi kullanımı üzerine yapılacak çalışmalar, Sadece mevcut Covid-19 salgınının ele alınmasına yardımcı olmakla kalmayıp, aynı zamanda gelecekteki pandemilere hızlı ve hedefli bir yanıt vermeyi sağlayan bir model oluşturma fırsatına sahip olmamızı sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

- Banker, D. D. (2001). Monoclonal antibodies. A review. *Indian Journal of Medical Sciences*, 55(12), 651–654. <https://doi.org/10.2174/1574884712666170809124728>
- Bashandy, H., Jalkanen, S., & Teeri, T. H. (2015). Within leaf variation is the largest source of variation in agroinfiltration of *Nicotiana benthamiana*. *Plant Methods*, 11(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0091-5>
- Bloom, D. E., & Cadarette, D. (2019). Infectious disease threats in the twenty-first century: Strengthening the global response. *Frontiers in Immunology*, 10(MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00549>
- Buyel, J. F., Woo, J. A., Cramer, S. M., & Fischer, R. (2013). The use of quantitative structure-activity relationship models to develop optimized processes for the removal of tobacco host cell proteins during biopharmaceutical production. *Journal of Chromatography A*, 1322, 18–28.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.076>

- Capell, T., Twyman, R. M., Armario-Najera, V., Ma, J. K. C., Schillberg, S., & Christou, P. (2020). Potential Applications of Plant Biotechnology against SARS-CoV-2. *Trends in Plant Science*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.04.009>
- Choi, Y. S., Moon, J. H., Kim, T. G., & Lee, J. Y. (2016). Potent in vitro and in vivo activity of plantibody specific for porphyromonas gingivalis FimA. *Clinical and Vaccine Immunology*, 23(4), 346–352. <https://doi.org/10.1128/CVI.00620-15>
- Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 181–192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- D'Aoust, M. A., Couture, M. M. J., Charland, N., Trépanier, S., Landry, N., Ors, F., & Vézina, L. P. (2010). The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: A rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnology Journal*, 8(5), 607–619. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00496.x>
- Du, L., He, Y., Zhou, Y., Liu, S., Zheng, B. J., & Jiang, S. (2009). The spike protein of SARS-CoV - A target for vaccine and therapeutic development. *Nature Reviews Microbiology*, 7(3), 226–236. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2090>
- Duan, K., Liu, B., Li, C., Zhang, H., Yu, T., Qu, J., Zhou, M., Chen, L., Meng, S., Hu, Y., Peng, C., Yuan, M., Huang, J., Wang, Z., Yu, J., Gao, X., Wang, D., Yu, X., Li, L., ... Yang, X. (2020). Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(17), 9490–9496. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004168117>
- Fischer, R., & Buyel, J. F. (2020). Molecular farming – The slope of enlightenment. *Biotechnology Advances*, 40, 107519. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107519>
- Gleba, Y., Klimyuk, V., & Marillonnet, S. (2005). Magniflection - A new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine*, 23(17–18), 2042–2048. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.006>
- Gómez, N., Carrillo, C., Salinas, J., Parra, F., Borca, M. V., & Escribano, J. M. (1998). Expression of immunogenic glycoprotein S polypeptides from transmissible gastroenteritis coronavirus in transgenic plants. *Virology*, 249(2), 352–358. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9315>



- Gralinski, L. E., & Menachery, V. D. (2020). Return of the the Coronavirus: *Viruses*, *12*(135), 1–8. <https://doi.org/10.3390/v12020135>
- Gretebeck, L. M., & Subbarao, K. (2015). Animal models for SARS and MERS coronaviruses. *Current Opinion in Virology*, *13*, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.06.009>
- Hiatt, A., Cafferkey, R., & Bowdish, K. (1989). Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, *342*(6245), 76–78. <https://doi.org/10.1038/342076a0>
- Hiatt, A., Pauly, M., Whaley, K., Qiu, X., Kobinger, G., & Zeitlin, L. (2015). The emergence of antibody therapies for Ebola. *Human Antibodies*, *23*(3–4), 49–56. <https://doi.org/10.3233/HAB-150284>
- International Coalition of Medicines Regulatory Authorities. (2020). Global regulatory workshop on COVID-19 vaccine development. [Http://Www.Icmra.Info/Drupal/Sites/Default/Files/2020-03/First%20regulatory%20COVID-19%20workshop%20-%20meeting%20report\\_March%202020.Pdf](Http://Www.Icmra.Info/Drupal/Sites/Default/Files/2020-03/First%20regulatory%20COVID-19%20workshop%20-%20meeting%20report_March%202020.Pdf) (Accessed 23/4/20), 18 March.
- Keyaerts, E., Vijgen, L., Pannecouque, C., Van Damme, E., Peumans, W., Egberink, H., Balzarini, J., & Van Ranst, M. (2007). Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle. *Antiviral Research*, *75*(3), 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.03.003>
- King, D. P., Montague, N., Ebert, K., Reid, S. M., Dukes, J. P., Schädlich, L., Belsham, G. J., & Lomonosoff, G. P. (2007). Development of a novel recombinant encapsidated RNA particle: Evaluation as an internal control for diagnostic RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, *146*(1–2), 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.07.002>
- Krokhin, O., Li, Y., Andonov, A., Feldmann, H., Flick, R., Jones, S., Stroher, U., Bastien, N., Dasuri, K. V. N., Cheng, K., Simonsen, J. N., Perreault, H., Wilkins, J., Ens, W., Plummer, F., & Standing, K. G. (2003). Mass spectrometric characterization of proteins from the SARS virus: a preliminary report. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, *2*(5), 346–356. <https://doi.org/10.1074/mcp.M300048-MCP200>
- Li, F. (2016). Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual Review of Virology*, *3*(1), 237–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., ... Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, *395*(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- Lua, L. H. L., Connors, N. K., Sainsbury, F., Chuan, Y. P., Wibowo, N., & Middelberg, A. P. J. (2014). Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnology and Bioengineering*, *111*(3), 425–440. <https://doi.org/10.1002/bit.25159>
- 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*(8), 1106–1120. <https://doi.org/10.1111/pbi.12416>
- Margolin, E., Chapman, R., Meyers, A. E., van Diepen, M. T., Ximba, P., Hermanus, T., Crowther, C., Weber, B., Morris, L., Williamson, A. L., & Rybicki, E. P. (2019). Production and Immunogenicity of Soluble Plant-Produced HIV-1 Subtype C Envelope gp140 Immunogens. *Frontiers in Plant Science*, *10*(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01378>
- Marsian, J., Fox, H., Bahar, M. W., Kotecha, A., Fry, E. E., Stuart, D. I., Macadam, A. J., Rowlands, D. J., & Lomonosoff, G. P. (2017). Plant-made polio type 3 stabilized VLPs-A candidate synthetic polio vaccine. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00090-w>
- Mazalovska, M., & Kouokam, J. C. (2018). Lectins as promising therapeutics for the prevention and treatment of HIV and other potential coinfections. *BioMed Research International*, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/3750646>
- Millet, J. K., Séron, K., Labitt, R. N., Danneels, A., Palmer, K. E., Whittaker, G. R., Dubuisson, J., & Belouzard, S. (2016). Middle East respiratory syndrome coronavirus infection is inhibited by griffithsin. *Antiviral Research*, *133*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.07.011>
- Mor, T. S. (2015). Molecular pharming's foot in the FDA's door: Protalix's trailblazing story. *Biotechnology Letters*, *37*(11), 2147–2150. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1908-z>



- Mori, T., O'Keefe, B. R., Sowder, R. C., Bringans, S., Gardella, R., Berg, S., Cochran, P., Turpin, J. A., Buckheit, R. W., McMahon, J. B., & Boyd, M. R. (2005). Isolation and characterization of Griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia* sp. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9345–9353. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411122200>
- Na, W., Park, N., Yeom, M., & Song, D. (2015). Ebola outbreak in Western Africa 2014: what is going on with Ebola virus? *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 4(1), 17. <https://doi.org/10.7774/cevr.2015.4.1.17>
- O'Keefe, B. R., Giomarelli, B., Barnard, D. L., Shenoy, S. R., Chan, P. K. S., McMahon, J. B., Palmer, K. E., Barnett, B. W., Meyerholz, D. K., Wohlford-Lenane, C. L., & McCray, P. B. (2010). Broad-Spectrum In Vitro Activity and In Vivo Efficacy of the Antiviral Protein Griffithsin against Emerging Viruses of the Family Coronaviridae. *Journal of Virology*, 84(5), 2511–2521. <https://doi.org/10.1128/jvi.02322-09>
- Pandey, A., Singh, N., Sambhara, S., & Mittal, S. K. (2010). Egg-independent vaccine strategies for highly pathogenic H5N1 influenza viruses. *Human Vaccines*, 6(2), 178–188. <https://doi.org/10.4161/hv.6.2.9899>
- Paul, M., & Ma, J. K. C. (2011). Plant-made pharmaceuticals: Leading products and production platforms. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 58(1), 58–67. <https://doi.org/10.1002/bab.6>
- Pillet, S., Couillard, J., Trépanier, S., Poulin, J. F., Yassine-Diab, B., Guy, B., Ward, B. J., & Landry, N. (2019). Immunogenicity and safety of a quadrivalent plant-derived virus like particle influenza vaccine candidate—Two randomized Phase II clinical trials in 18 to 49 and 50 years old adults. *PLoS ONE*, 14(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216533>
- Qiu, X., Wong, G., Audet, J., Bello, A., Fernando, L., Alimonti, J. B., Fausther-Bovendo, H., Wei, H., Aviles, J., Hiatt, E., Johnson, A., Morton, J., Swope, K., Bohorov, O., Bohorova, N., Goodman, C., Kim, D., Pauly, M. H., Velasco, J., ... Kobinger, G. P. (2014). Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature*, 514(7520), 47–53. <https://doi.org/10.1038/nature13777>
- Rademacher, T., Sack, M., Arcalis, E., Stadlmann, J., Balzer, S., Altmann, F., Quendler, H., Stiegler, G., Kunert, R., Fischer, R., & Stoger, E. (2008). Recombinant antibody 2G12 produced in maize endosperm efficiently neutralizes HIV-1 and contains predominantly single-GlcNAc N-glycans. *Plant Biotechnology Journal*, 6(2), 189–201. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00306.x>
- Ramessar, K., Rademacher, T., Sack, M., Stadlmann, J., Platis, D., Stiegler, G., Labrou, N., Altmann, F., Ma, J., Stöger, E., Capell, T., & Christou, P. (2008). Cost-effective production of a vaginal protein microbicide to prevent HIV transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), 3727–3732. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708841104>
- Rattanapisit, K., Chao, Z., Siri wattananon, K., Huang, Z., & Phoolcharoen, W. (2019). Plant-produced anti-enterovirus 71 (EV71) monoclonal antibody efficiently protects mice against EV71 infection. *Plants*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/plants8120560>
- Regla-Nava, J. A., Nieto-Torres, J. L., Jimenez-Guardeño, J. M., Fernandez-Delgado, R., Fett, C., Castaño-Rodríguez, C., Perlman, S., Enjuanes, L., & DeDiego, M. L. (2015). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronaviruses with Mutations in the E Protein Are Attenuated and Promising Vaccine Candidates. *Journal of Virology*, 89(7), 3870–3887. <https://doi.org/10.1128/jvi.03566-14>
- Rosales-Mendoza, S. (2020). Will plant-made biopharmaceuticals play a role in the fight against COVID-19? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 20(6), 545–548. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1752177>
- Rybicki, E. P. (2020). Plant molecular farming of virus-like nanoparticles as vaccines and reagents. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 12(2), 1–22. <https://doi.org/10.1002/wnan.1587>
- Shang, W., Yang, Y., Rao, Y., & Rao, X. (2020). The outbreak of SARS-CoV-2 pneumonia calls for viral vaccines. *Npj Vaccines*, 5(1), 2–4. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0170-0>
- Shanmugaraj BM, & Ramalingam S. (2014). Plant Expression Platform for the Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins. *Austin J Biotechnol Bioeng*, 1(6), 4–7.
- Shen, C., Wang, Z., Zhao, F., Yang, Y., Li, J., Yuan, J., Wang, F., Li, D., Yang, M., Xing, L., Wei, J., Xiao, H., Yang, Y., Qu, J., Qing, L., Chen, L., Xu, Z., Peng, L., Li, Y., ... Liu, L. (2020). Treatment of 5 Critically Ill Patients with COVID-19 with Convalescent Plasma. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 323(16), 1582–



1589. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.4783>

- Shoji, Y., Farrance, C. E., Bautista, J., Bi, H., Musiychuk, K., Horsey, A., Park, H., Jaje, J., Green, B. J., Shamloul, M., Sharma, S., Chichester, J. A., Mett, V., & Yusibov, V. (2012). A plant-based system for rapid production of influenza vaccine antigens. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 6(3), 204–210. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2011.00295.x>
- Tian, X., Li, C., Huang, A., Xia, S., Lu, S., Shi, Z., Lu, L., Jiang, S., Yang, Z., Wu, Y., & Ying, T. (2020). Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. *Emerging Microbes and Infections*, 9(1), 382–385. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1729069>
- Tully, C. M., Lambe, T., Gilbert, S. C., & Hill, A. V. S. (2015). Emergency Ebola response: A new approach to the rapid design and development of vaccines against emerging diseases. *The Lancet Infectious Diseases*, 15(3), 356–359. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)71071-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)71071-0)
- Vamvaka, E., Twyman, R. M., Christou, P., & Capell, T. (2014). Can plant biotechnology help break the HIV-malaria link? *Biotechnology Advances*, 32(3), 575–582. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.02.004>
- Vamvaka, Evangelia, Farré, G., Molinos-Albert, L. M., Evans, A., Canela-Xandri, A., Twyman, R. M., Carrillo, J., Ordóñez, R. A., Shattock, R. J., O’Keefe, B. R., Clotet, B., Blanco, J., Khush, G. S., Christou, P., & Capell, T. (2018). Unexpected synergistic HIV neutralization by a triple microbicide produced in rice endosperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(33), E7854–E7862. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806022115>
- Vamvaka, Evangelia, Twyman, R. M., Murad, A. M., Melnik, S., Teh, A. Y. H., Arcalis, E., Altmann, F., Stoger, E., Rech, E., Ma, J. K. C., Christou, P., & Capell, T. (2016). Rice endosperm produces an underglycosylated and potent form of the HIV-neutralizing monoclonal antibody 2G12. *Plant Biotechnology Journal*, 14(1), 97–108. <https://doi.org/10.1111/pbi.12360>
- Vankadari, N., & Wilce, J. A. (2020). Emerging WuHan (COVID-19) coronavirus: glycan shield and structure prediction of spike glycoprotein and its interaction with human CD26. *Emerging Microbes and Infections*, 9(1), 601–604. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1739565>
- Vaquero, C., Sack, M., Chandler, J., Drossard, J., Schuster, F., Monecke, M., Schillberg, S., & Fischer, R. (1999). Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 11128–11133. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11128>
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281–292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S., & Li, F. (2020). Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *Journal of Virology*, 94(7). <https://doi.org/10.1128/jvi.00127-20>
- Wang, Q., Zhang, L., Kuwahara, K., Li, L., Liu, Z., Li, T., Zhu, H., Liu, J., Xu, Y., Xie, J., Morioka, H., Sakaguchi, N., Qin, C., & Liu, G. (2016). Immunodominant SARS coronavirus epitopes in humans elicited both enhancing and neutralizing effects on infection in non-human primates. *ACS Infectious Diseases*, 2(5), 361–376. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00006>
- Weiss, S. R., & Leibowitz, J. L. (2011). Coronavirus pathogenesis. In *Advances in Virus Research* (1st ed., Vol. 81). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2>
- Whaley, K. J., Hiatt, A., & Zeitlin, L. (2011). Emerging antibody products and Nicotiana manufacturing. *Human Vaccines*, 7(3), 349–356. <https://doi.org/10.4161/HV.7.3.14266>