

Recibido: 15.05.2020 | Aceptado: 11.10.2020

Palabras clave: Antígenos, plantas, proteínas, vacunas, virus.

# Nanovacunas de nueva generación: VLP producidas en plantas

BRANDON BAYARDO DELGADO  
CARLOS ANGULO

GRUPO DE INMUNOLOGÍA Y VACUNOLOGÍA, CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S. C.

ELIZABETH MONREAL ESCALANTE

*emonreal@cibnor.mx*

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE-Conacyt



Los virus son pequeños fragmentos de material genético, denominado genoma viral (ya sea DNA o RNA), encapsulados —la mayoría— en una envoltura de origen proteico llamada cápside; no se catalogan como seres vivos porque necesitan infectar diferentes tipos celulares en un organismo vivo —bacterias, células vegetales o animales— para poder reproducirse, por lo que son considerados los agentes infecciosos más abundantes del planeta y poseen un tamaño pequeño de entre 20 y 250 nanómetros (nm); para darnos una idea de su tamaño hay que considerar que un nanómetro es la milmillonésima parte de un metro ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ).

A través de la expresión de una o más proteínas de la cápside del virus es posible su autoensamble —ya sea naturalmente o mediante manipulación genética— formando contenedores no infecciosos carentes de material genético, llamadas partículas tipo virus o virus-like particles (VLP, por sus siglas en inglés), cuyo tamaño se encuentra en la escala nanométrica. Algunas ventajas que vuelven atractivo el estudio de las nanopartículas derivadas de virus es que representan nanomateriales naturales que son biocompatibles y biodegradables.

#### Nanopartículas derivadas y vacunas

El uso de las nanopartículas derivadas puede extenderse a la producción de proteínas recombinantes —obtenidas de un gen clonado de una especie o de una línea celular distinta a la original— de interés biofarmacéutico y al desarrollo de vacunas de subunidades —diseñadas con componentes de virus o bacterias, que desencadenan la respuesta inmunitaria del individuo al que se le administra, sin riesgo de padecer la enfermedad o de efectos adversos—.

Además, las VLP —por ser derivados orgánicos— pueden resolver problemas asociados con la solubilidad —capacidad para disolverse al mezclarse con un líquido—, biodisponibilidad —grado y velocidad con que accede a la circulación y alcanza su lugar de acción—, inmunocompatibilidad (capacidad del sistema inmune para aceptar o rechazar una sustancia o tejido) y citotoxicidad —propiedad de dañar a otras

células— que presentan otros nanomateriales que actualmente se utilizan (Saini *et al.*, 2006).

La generación de vacunas basadas en VLP comprende —primero— la expresión de las proteínas estructurales que sirve de armazón para ensamblarla. Este proceso puede ocurrir *in vivo* —en un organismo vivo— de manera similar al ensamblaje viral, pero también puede ocurrir *in vitro* —en laboratorio— (ya sea espontáneamente o inducido por cambios en el pH y la salinidad) después de la purificación de la proteína que la forma.

En muchos casos, la proteína que forma la VLP es el antígeno —sustancia que puede causar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, la producción de anticuerpos— de la vacuna misma; así, la inoculación se obtiene de manera directa. En otros, la VLP de un virus específico se usa como armazón para mostrar antígenos no relacionados con el patógeno objetivo, para lo que existen dos metodologías básicas: 1) a través de fusión genética y 2) por acoplamiento químico.

El sitio para la inserción de la secuencia química —DNA que contiene secuencias de dos especies diferentes— de interés en la célula hospedera debe seleccionarse adecuadamente para evitar alteraciones en las propiedades de ensamblaje de la proteína de la cápside —que envuelven el material genético de un virus— y permitir la visualización del antígeno; en algunos casos, existen limitaciones en su longitud y esto debe considerarse durante el diseño de las VLP.

# Nanovacunas de nueva generación: VLP producidas en plantas

Bayardo Delgado, E., Angulo, C. y Escalante Monreal, E. (2020) *Universitarios Potosinos*, 254. UASLP.



Los virus son pequeños fragmentos de material genético, denominado genoma viral (ya sea DNA o RNA), la mayoría encapsulados en una envoltura de origen proteico llamada cápside; a través de la expresión de una o más proteínas de la cápside del virus es posible autoensamblarlas —ya sea naturalmente o mediante manipulación genética— formando contenedores no infecciosos carentes de material genético, llamadas partículas tipo virus o virus-like particles (VLP, por sus siglas en inglés), cuyo tamaño es de escala nanométrica.



El uso de las nanopartículas tipo VLP puede extenderse a la producción de proteínas recombinantes de interés biofarmacéutico y al desarrollo de vacunas de subunidades, que desencadenan la respuesta inmunitaria del individuo al que se le administra, sin riesgo de padecer la enfermedad o de efectos adversos.



La generación de vacunas basadas en VLP comprende, primero, la expresión de una o más proteínas estructurales que sirven de armazón para ensamblar la VLP. Este proceso se realiza en un hospedero genéticamente modificado, que incluye bacterias, levaduras, células de insectos, de vegetales y de mamíferos. Las plantas también se han utilizado como plataformas de expresión de bajo costo para producir de manera eficiente no sólo VLP derivadas de virus vegetales, sino también VLP que se asemejan a virus de mamíferos e incluso virus envueltos.



Nuestro objetivo es describir la importancia de la producción de VLP en plantas como una alternativa en el desarrollo de nanovacunas contra microorganismos que afectan la salud de especies acuáticas y terrestres de interés comercial, así como la salud del ser humano.

## GIV

En este sentido, en el Grupo de Inmunología y Vacunología (GIV) del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (Cibnor) se desarrollan modelos promisorios a base de VLP producidas en plantas y microalgas contra enfermedades infecciosas de animales terrestres y marinos. La finalidad es evaluar su posible aplicación como inmunoestimulantes y nanoportadores contra enfermedades de interés en el sector pecuario y acuícola de la región noroeste del país.

La secuencia quimérica se genera y se expresa en el hospedero apropiado y las VLP resultantes generalmente muestran el antígeno en la superficie. De esta manera, la VLP quimérica sirve como portador de antígenos, lo que ofrece la posibilidad de producir vacunas multivalentes al incluir varios antígenos o sus fragmentos (epítomos) en la proteína quimérica (Kingston *et al.*, 2019).

La expresión de proteínas formadoras de VLP se realiza en un hospedero genéticamente modificado, que incluye bacterias, levaduras, células de insectos, de vegetales y de mamíferos. La elección del hospedero depende básicamente del costo y los requisitos en términos de modificaciones postraduccionales —cambio químico ocurrido después de la síntesis por los ribosomas, que sirven como sitio para la síntesis

de proteínas en la célula—. Así, la glicosilación —adición de carbohidratos a una proteína— que no se lleva a cabo en bacterias, puede afectar la inmunogenicidad —capacidad de un antígeno para inducir una respuesta inmune— de las VLP; por ejemplo, se ha demostrado que la manosilación (cambio químico ocurrido después de la síntesis de proteínas por los ribosomas en la célula) aumenta la absorción de la VLP por las células presentadoras de antígeno (CPA). Las plantas también se han utilizado como plataformas de expresión de bajo costo para producir eficientemente no sólo VLP derivadas de virus vegetales, sino también que se asemejan a virus de mamíferos, incluso virus envueltos —es decir, que tienen una envoltura consistente en una bicapa lipídica proveniente de la membrana de la célula infectada u hospedadora— (Pillet *et al.*, 2018).

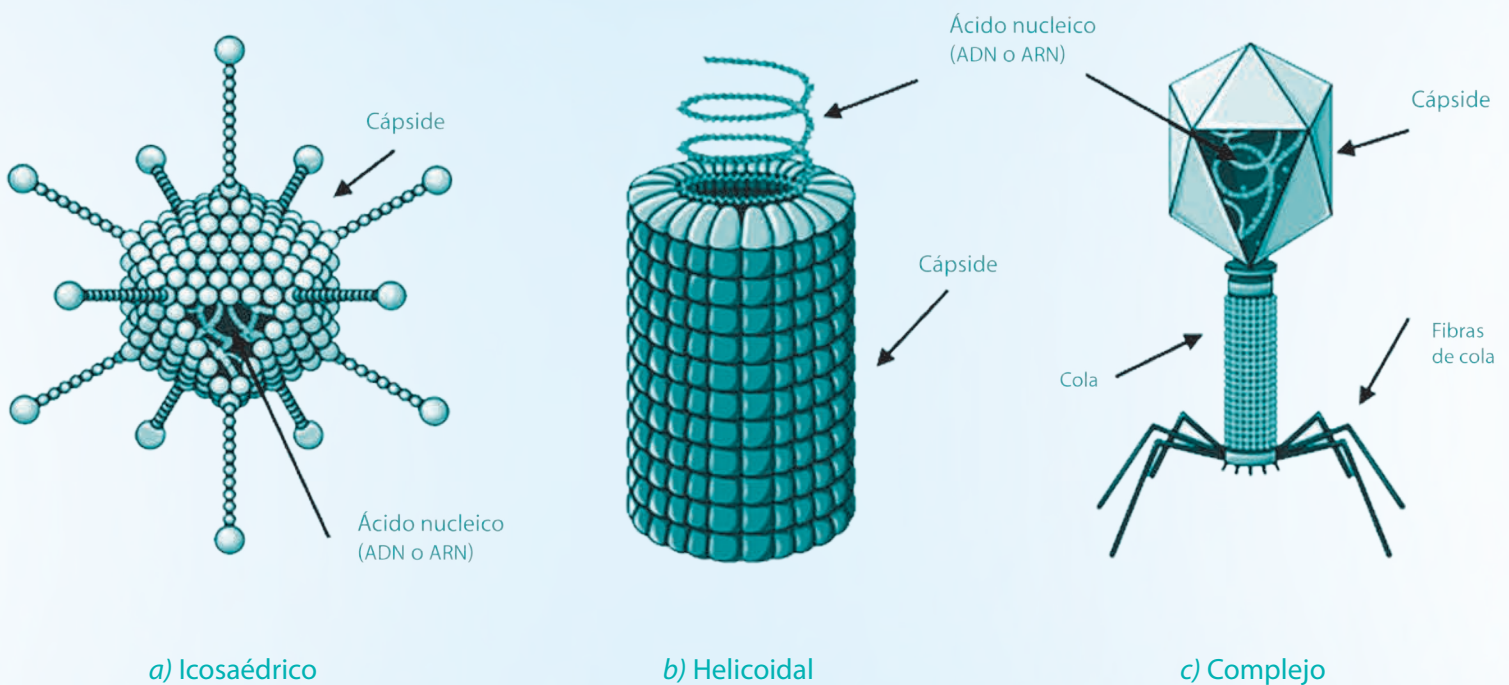


Figura 2.  
Esquema general de la clasificación morfológica de los virus

Al enfocar la aplicación de las VLP hacia la producción y funcionalidad como vacuna, es imprescindible tener en cuenta que éste es un material biológico preparado que —al ser aplicado— puede generar inmunidad (protección) contra una enfermedad al estimular la producción de anticuerpos. A menudo se hace a partir de distintos estados del patógeno que provoca la enfermedad, formas vivas atenuadas —que bajo condiciones ambientales perdió o atenuó sus actividades patógenas—, inactivadas o muertas del microbio; aunque también se utilizan sólo las toxinas o proteínas de superficie (WHO, 2020). Es como cuando a un piloto de carreras le presentan un mapa de la pista que correrá, con sus curvas, rectas, subidas y bajadas, para que cuando maneje sobre la pista, ya tenga una idea sobre ella y pueda conducir de forma óptima, con una menor probabilidad de sufrir un accidente.

De acuerdo con lo expuesto, el objetivo de este artículo se enfoca en describir la importancia de la producción de VLP en plantas como una alternativa en el desarrollo de nanovacunas contra microorganismos que afectan la salud de especies acuáticas y terrestres de interés comercial, así como la salud del ser humano.

### Nanovacunas tipo VLP, alcances y retos

Como hemos mencionado, las nanovacunas de VLP han sido producidas en diferentes plataformas. Actualmente, existen distintos casos de éxito entre los que destacan aquellas aprobadas para su uso en humanos y que se han producido en células eucariotas, como la vacuna contra el virus del papiloma humano (VPH), de la cual existen tres modelos profilácticos —que previenen enfermedades— autorizados por la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos de América y distribuidos comercialmente: la bivalente Cervarix (vacuna VPH-2), la tetravalente Gardasil (vacuna VPH-4) y la nonavalente Gardasil 9 (vacuna VPH-9). Otro caso de éxito es la vacuna de influenza (Flublok) producida en células de insecto y aprobada por la FDA para su uso en personas mayores de 18 años.

Aunque los ejemplos anteriores son efectivos para su uso como nanovacunas, necesitan el paso de purificación de los antígenos, lo que eleva los costos de producción y hacen que estos modelos sean poco alcanzables en países en desarrollo. Por ello, se propone el

uso de nuevas plataformas en las que el proceso de purificación no sea necesario o sea menos costoso y, de esta forma, producir vacunas de bajo costo. En este sentido, uno de los modelos más atractivos son las VLP producidas en células de plantas, que se han utilizado como biofábricas desde hace tres décadas gracias a su capacidad de producir antígenos recombinantes para el desarrollo de vacunas contra diversas enfermedades bacterianas o virales.

Utilizar sistemas vegetales ha brindado múltiples ventajas, como el bajo costo de producción, la proliferación de plantas descendientes que presenten el gen de interés para el antígeno, la oportunidad de administrar la vacunas por vía oral, entre otras, lo que ha hecho que la industria genética y biotecnológica invierta en este sector. En la actualidad, se han utilizado diferentes plantas para la producción de biofármacos recombinantes (es decir, biocompuestos producidos a través de tecnologías del ADN recombinante y estrategias de transformación genética); de esta manera, las vacunas se han producido y almacenado en cereales, legumbres, semillas oleaginosas, frutas, verduras, cultivos celulares y algas, por mencionar algunas (Ahmad *et al.*, 2012). En este contexto, se describen diferentes modelos de nanovacunas tipo VLP producidas en plantas contra enfermedades de interés veterinario.

### Vacunas tipo VLP contra enfermedades de interés veterinario

Estos modelos pueden ejemplificarse de acuerdo con distintos caracteres que han permitido su producción: la técnica de síntesis, análisis, administración, el alcance y perspectivas a partir de los resultados obtenidos.

Gunter *et al.* (2019) desarrollaron una vacuna tipo VLP producida en plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) a través de la expresión transitoria de la proteína de la cápside (CP) del circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) —virus que causa una enfermedad lenta y progresiva con un alto índice de mortalidad mundial que afecta a los cerdos—, por medio de agroinfiltración —proceso que induce la expresión transitoria de genes en una planta o sus hojas para producir una proteína deseada—. Evaluaron la respuesta inmune en un modelo de ratón y confirmaron el autoensamblaje

de la proteína (CP) en VLP, con ello demostraron una elevada respuesta inmune a través de la producción de anticuerpos en un modelo de mamífero.

Otro ejemplo de éxito dentro del ámbito de las patologías porcinas se encuentra en la producción de VLP a través de la expresión de los genes GP5, M y N I, que codifican para proteínas de la cápside del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) en plantas de tabaco (*Nicotiana silvestris*). En ese estudio, las VLP se caracterizaron por técnicas de microscopía, en donde se analizó su morfología y estabilidad fisicoquímica que resultó ser un modelo prometedor para la producción de VLP contra el PRRSV.

La expresión simultánea de múltiples proteínas (heteromultiméricas) dentro de la misma célula vegetal es otro modelo promisorio para la expresión de VLP. En este sentido, Thuenemann *et al.* (2013) desarrollaron un modelo de ensamblaje de VLP del virus de la lengua azul (BTV) como vacuna contra la enfermedad del mismo nombre, que es vírica aguda y afecta al ganado ovino, caprino y bovino. Las VLP fueron expresadas transitoriamente y de manera

simultánea con cuatro proteínas distintas de la cápside del virus en plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*). Además, en ese trabajo demostraron una respuesta inmune protectora a través de un modelo de ratón, este resultado pudo obtenerse en cuestión de días, extrapolando las posibles aplicaciones de una vacuna con estructuras heteromultiméricas —formada por diferentes subunidades y, por lo tanto, codificada por diferentes genes— tipo VLP para uso en humanos.

El virus de la necrosis nerviosa (VNN) es considerado una amenaza para más de 40 especies marinas de interés comercial en la acuicultura. En este sentido, Marsian *et al.* (2019) desarrollaron una vacuna a base de VLP del virus de la necrosis nerviosa del bacalao del Atlántico (ACNNV), a través de la expresión transitoria de la proteína de la cápside del virus en plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*). En el trabajo se caracterizó la formación y el autoensamble de VLP a través de microscopía, así como la respuesta inmune con un desafío infeccioso en células de lubina (*Dicentrarchus labrax*), lo que demostró que este modelo de vacuna producido en plantas es una alternativa promisorio en la acuicultura.

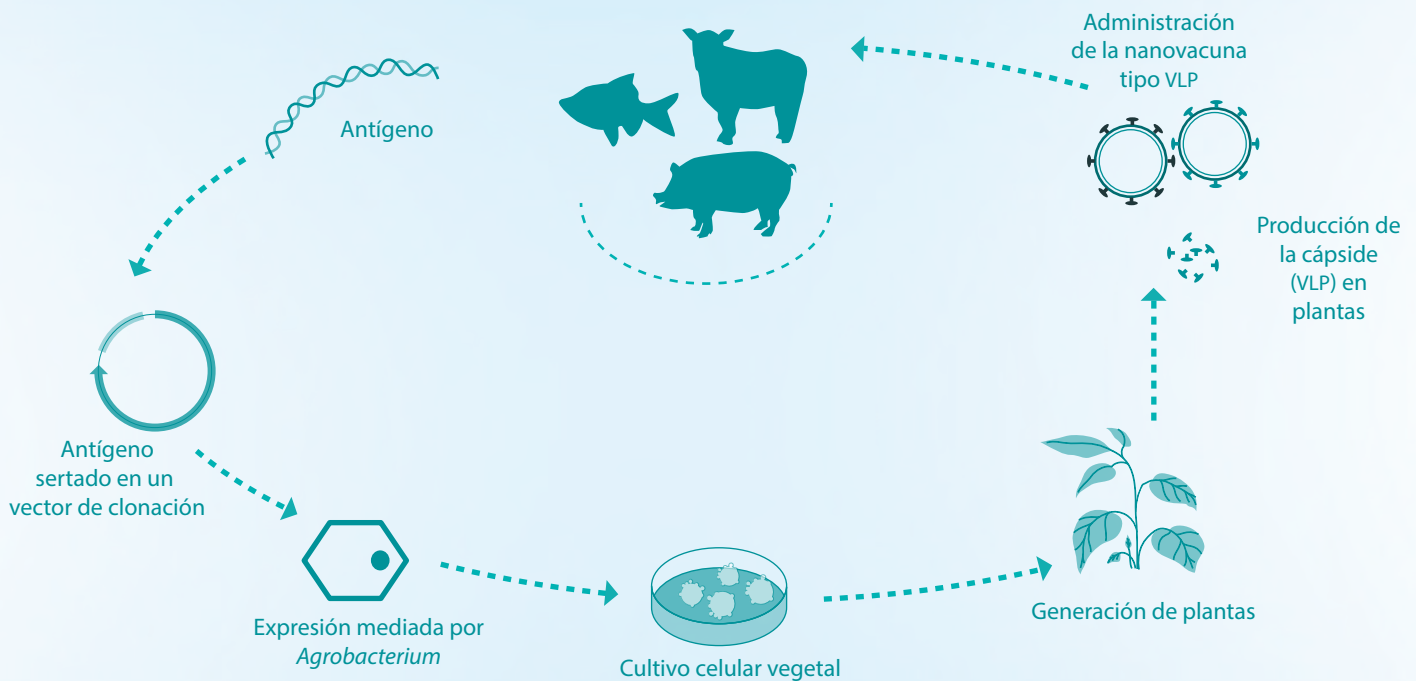


Figura 2.  
Producción de VLPs mediante el uso de plantas



**BRANDON  
BAYARDO  
DELGADO**

Ingeniero bioquímico por el Instituto Tecnológico de la Paz en Baja California Sur. Trabaja en el proyecto "Control de proceso y aseguramiento de calidad en Esterito de San Carlos, SPR De RL".



Proteína o antígeno	Virus	Enfermedad	Planta (sistema de expresión)	Respuesta Inmune	Referencia
PCV-2 (CP)	Circovirus porcino tipo 2 (PCV-2)	Circovirosis porcina	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Anticuerpos neutralizantes en ratones	Gunter <i>et al.</i> , 2019
PRRSV (CP)	Síndrome respiratorio y reproductivo porcino	Síndrome respiratorio y reproductivo porcino (también cerdo de oreja azul)	<i>Nicotiana silvestris</i>	Anticuerpos en ratones	Campero <i>et al.</i> , 2015
BTV-8 (CP)	Lengua azul	Lengua azul	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Anticuerpos en ovejas	Thuenemann <i>et al.</i> , 2013
ACVNN (CP)	Necrosis nerviosa del bacalao del Atlántico	Encefalopatía y retinopatía viral (también Necrosis nerviosa)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Anticuerpos de lubina	Marsian <i>et al.</i> , 2019

Tabla 1.

Principales modelos vacunales a base de VLP desarrollados contra enfermedades infecciosas de interés veterinario.

**Conclusión**

Las VLP han demostrado ser un modelo promisorio para la vacunología, ya que resultan ser sistemas de entrega efectivos que combinan buenos perfiles de seguridad con una fuerte inmunogenicidad y constituyen una alternativa segura contra enfermedades infecciosas. Sin embargo, es necesario evaluar modelos en etapas de estudio que fortalezcan su uso como nanovacunas orgánicas.

En este sentido, en el Grupo de Inmunología y Vacunología (GIV) del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (Cibnor) se desarrollan modelos promisorios a base de VLP producidas en plantas y microalgas contra enfermedades infecciosas de animales terrestres y marinos. La finalidad es evaluar su posible aplicación como inmunoestimulantes y nano-carreadores contra enfermedades de interés en el sector pecuario y acuícola de la región noroeste del país. **UP**

**Referencias bibliográficas:**

Ahmad, P., Ashraf, M., Younis, M., Hu, X., Kumar, A., Akram, NA y Al-Qurainy, F. (2012). Papel de las plantas transgénicas en la agricultura y la biopharming. *Avances en Biotecnología*, 30(3), pp. 524-540. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.006.

Kingston, N. J., Kurtovic, L., Walsh, R., Joe, C., Lovrecz, G., Locarnini, S., Beeson, J. G., Netter, H. J. (2019). Hepatitis B virus-like particles expressing Plasmodium falciparum epitopes induce complement-fixing antibodies against the circumsporozoite protein. *Vaccine*, 37(12), pp. 1674-1684. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.01.056.

Uribe-Campero, L., Monroy-García, A., Durán-Meza, A. L., Villagrana-Escareño, M. V., Ruiz-García, J., Hernández, J., Núñez-Palenius, H. G. y Gómez-Lim, M. (2015). Plant-based porcine reproductive and respiratory syndrome virus VLPs induce an immune response in mice. *Research in Veterinary Science*, 102, pp. 59-66. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.07.012

Pillet, S., Aubin, É., Trépanier, S., Poulin, J. F., Yassine-Diab, B., Ter Meulen, J., Ward, B. J. y Landry, N. (2018). Humoral and cell-mediated immune responses to H5N1 plant-made virus-like particle vaccine are differentially impacted by alum and GLA-SE adjuvants in a Phase 2 clinical trial. *NPJ Vaccines*, 3, pp. 1-9. doi: 10.1038/s41541-017-0043-3

Saini, V., Zharov, V. P., Brazel, C. S., Nikles, D. E., Johnson, D. T. y Everts, M. (2006). Combination of viral biology and nanotechnology: new applications in nanomedicine. *Nanomedicine Saini V, Zharov VP, Brazel CS, Nikles DE, Johnson DT, Everts M. (2006). Combination of viral biology and nanotechnology: new applications in nanomedicine. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2(3), pp. 200-206. doi: 10.1016/j.nano.2006.07.002