

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů



Lenka Dejmalová

Rostlinné jedlé vakcíny proti lidským gastrointestinálním onemocněním způsobeným
Escherichia coli a *Vibrio cholerae*

Plant-based edible vaccines against human gastrointestinal diseases caused by *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

RNDr. Hana Marková, Ph.D.

Praha, 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 26. 4. 2025

Lenka Dejmalová

Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. Haně Markové, Ph.D. za vedení práce, cenné rady a vstřícnost při vzájemné komunikaci.

Abstrakt

Průjmová onemocnění stále představují velký problémem pro rozvojové země, kde jsou zejména ve skupině dětí do 5 let zodpovědné za řadu úmrtí. Mezi významné patogeny, které způsobují tato onemocnění, patří bakterie *Escherichia coli* a *Vibrio cholerae*. Vakcíny proti některým patogenům způsobujícím průjmová onemocnění stále neexistují a již schválené injekčně podávané vakcíny jsou často pro obyvatele rozvojových zemí nedostupné. Vhodným řešením by tak mohla být konstrukce rostlinných jedlých vakcín. Výhodou takového přístupu je nízká cena, dlouhodobá skladovatelnost a snadná aplikovatelnost. Většina jedlých vakcín byla testována na myších, u nichž byla ukázána úspěšná imunizace. Dvě vakcíny proti *E. coli* byly testovány v I. fázi klinických testů, kde obě dokázaly navodit imunitní odpověď. Hlavními problémy pro uplatnění těchto vakcín je omezení pěstování geneticky modifikovaných plodin, problém s přesným dávkováním antigenu a riziko orální tolerance. Využití rostlin ve farmaceutickém průmyslu je však slibné pro výrobu antigenů pro injekční imunizaci a dalších terapeutik. Tato práce je rešerší studií zabývajících se rostlinnými jedlými vakcínami proti dvěma patogenům, *E. coli* a *V. cholerae*, ať už jako jednotlivým patogenům, tak ve formě multikomponentových, multivalentních a kombinovaných vakcín.

Klíčová slova

jedlé vakcíny, rostlinné jedlé vakcíny, transgenní rostliny, rostlinné biotechnologie, lidská průjmová onemocnění, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*

Abstract

Diarrheal diseases are still a major problem for developing countries, where they are responsible for a number of deaths, especially among children under 5 years of age. Main pathogens causing these diseases include the bacteria *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. Vaccines against some pathogens that cause diarrheal diseases still do not exist, and already approved injectable vaccines are often unavailable to people in developing countries. A suitable solution could be the construction of plant-based edible vaccines. The advantages of such an approach are low cost, long-term storage and easy application. Most edible vaccines have been tested on mice, in which successful immunization was shown. Two vaccines against *E. coli* have been tested in phase I clinical trials, where both were able to induce an immune response. The main problems for the application of these vaccines are the restrictions on the cultivation of genetically modified crops, problem with inaccurate antigen dosing and the risk of oral tolerance. However, the use of plants in the pharmaceutical industry is promising for the production of antigens for injection immunization and other therapeutics. This work is an overview of studies dealing with plant-based edible vaccines against two pathogens, *E. coli* and *V. cholerae*, both as individual pathogens and in the form of multicomponent, multivalent and combination vaccines.

Key words

edible vaccines, plant edible vaccines, transgenic plants, plant biotechnology, human diarrheal diseases, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*

Seznam zkratek

Ala	alanin
APC	antigen prezentující buňky
ASC	buňky sekretující protilátky
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
Bx17	endosperm specifický promotor
CD4 ⁺ T lymfocyty	T lymfocyty exprimující CD4 receptor
CF	kolonizační faktor
CFA/I	kolonizační faktor antigen I
CFU	jednotka formující kolonii
CPMV	virus tabáku vojtěšky
CT	cholera toxin
CTA	podjednotka A cholera toxinu
CTB	podjednotka B cholera toxinu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
eCTB	podjednotka B cholera toxinu bez fúzované SEKDEL sekvence
E8	promotor specifický pro plody rajčat
EAAAK	sekvence glutamát-alanin-alanin-alanin-lysin
EIT	fúzní protein antigenů EspA, intimin a Tir
EHEC	enterohemoragické kmeny <i>Escherichia coli</i>
ELISA	enzymová imunoanalýza
ETEC	enterotoxigenní kmeny <i>Escherichia coli</i>
EspA	protein A sekretovaný enteropatogenními kmeny <i>Escherichia coli</i>
EspB	protein B sekretovaný enteropatogenními kmeny <i>Escherichia coli</i>
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA
FliC	flagelin
GALT	lymfoidní tkáň asociované se střevem
Gb3	globotriaosyl ceramid
Gln	glutamin
GM1	monosialotetrahexosylgangliosid
GMO	geneticky modifikované organismy
GPGP	sekvence glycin-prolin-glycin-prolin
HIV	virus lidské imunodeficience

IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
Ile	isoleucin
<i>ipaD</i>	sekvence pro invazní plasmidový antigen D
KDEL	sekvence lysin-aspartát-glutamát-leucin
LF	letální faktor
loxP	sekvence DNA rozpoznávaná Cre rekombinázou
LptD	D transportní protein lipopolysacharidů
LT	teplotně labilní toxin
LT-A	podjednotka A teplotně labilního toxinu
LT-B	podjednotka B teplotně labilního toxinu
LTBentero	fúzní protein LT-B, ST, FliC a LptD s GPGP linkerem
Lys	lysin
M buňky	mikrofold buňky
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
MSB	hlavní semenná banka
NSB	další semenná banka
NSP4	nestrukturální protein 4
ORF	otevřený čtecí rámec
<i>PA20</i>	sekvence pro ochranný antigen 20
pCTB	podjednotka B cholera toxinu fúzovaná se SEKDEL sekvencí
PCR	polymerázová řetězová reakce
PVX	X virus brambor
RNA	ribonukleová kyselina
SEKDEL	sekvence serin-glutamát-lysin-aspartát-glutamát-leucin
Ser	serin
SICL	fúzní protein antigenů CFB, LT-B, Stx a intimin
sIgA	sekreční imunoglobulin A
ST	teplotně stabilní toxin
STEC	shiga-like toxigenní kmeny <i>Escherichia coli</i>
Stx	shiga toxin
Stx2	shiga toxin typu 2
StxB	podjednotka B shiga toxinu
Tat	translokátor twin-arginin

T-DNA	transferová deoxyribonukleová kyselina
Ti plasmid	plasmid indukující nádor
Tir	translokovaný intiminový receptor
TMV	virus tabákové mozaiky
ToxA	toxin A
ToxAentero	fúzní protein ToxA CTB, LT-B, ST, FliC a LptD s GPGP linkerem
Treg	regulační T lymfocyty
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
tRNA-Ala	transferová ribonukleová kyselina pro alanin
tRNA-Ile	transferová ribonukleová kyselina pro izoleucin
T7 RNA polymeráza	DNA dependentní RNA polymeráza pocházející z bakteriofága T7
TSP	celkový rozpustný protein
YncE	antigen enetotoxigenních kmenů <i>Escherichia coli</i>
ZP3	zona pellucida 3

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Metody výroby rostlinných jedlých vakcín.....	3
3 Mechanismy indukce imunitní odpovědi	6
4 Jedlé vakcíny proti infekcím způsobeným bakterií <i>Escherichia coli</i> (T. Escherich, 1885) ...	8
4.1 Cílové virulenční faktory vakcín proti <i>E. coli</i>	8
4.2 Vakcíny proti enterotoxigenním kmenům <i>E. coli</i>	9
4.3 Vakcíny proti enterohemoragickým kmenům <i>E. coli</i>	13
5 Vakcíny proti bakterii <i>Vibrio cholerae</i> (Pacini, 1854).....	15
6 Kombinované, multivalentní a multikomponentové vakcíny	20
6.1 Multikomponentové vakcíny proti <i>E. coli</i>	20
6.2 Multivalentní vakcíny proti <i>E. coli</i>	21
6.3 Kombinované vakcíny	22
7 Výhody a nevýhody rostlinných jedlých vakcín	25
8 Současný vývoj a budoucnost	27
9 Závěr.....	28
10 Seznam použité literatury	30
10.1 Internetové zdroje	40

1 Úvod

Vakcinace je důležitou prevencí proti lidským onemocněním, přičemž její obvyklou formou je injekční podání. Kromě injekčního způsobu vakcinace existuje také možnost orální imunizace. Počátky výroby orálně podávaných vakcín spadají do roku 1961, kdy byla licencována vakcína proti obrně (Melnick, 1984). Jednalo se o vakcínu na bázi atenuovaného polioviru, která ukázala účinnost tohoto způsobu imunizace. Od té doby byly vyvinuty i další metody výroby, a to produkce antigenů patogenů v mikroorganismech a v rostlinách (Pontes et al., 2014). Rostlinné vakcíny začaly být vytvářeny v 90. letech 20. století. První rostlinné jedlé vakcíny proti lidským patogenům vytvořili Haq et al. (1995) proti enterotoxigenní *Escherichia coli* a McGarvey et al. (1995) proti viru vztekliny. Od té doby byla připravena řada jedlých vakcín proti různým onemocněním virového i bakteriálního původu. Pro výrobu vakcín jsou vhodné rostliny, které tvoří trvanlivé a konzumovatelné plody nebo jiné části z důvodu snadné aplikace (Streatfield et Howard, 2003).

Jedlé vakcíny jsou vyvíjeny zejména proti širokému spektru infekcí problematických pro rozvojové země, kde lze stále evidovat problémy s nedostatečnou vakcinací obyvatel. Orální rostlinné vakcíny jsou slibnou možností pro vyřešení tohoto problému díky řadě výhod, jako jsou nízké finanční náklady, snadná aplikovatelnost, nenáročná příprava a dlouhá trvanlivost. Lze také připravit vakcínu proti více patogenům a je tak možné cílit na větší množství nemocí. Naproti tomu jejich hlavním nedostatkem je omezení pěstování geneticky modifikovaných plodin a problém s přesným dávkováním a s tím související riziko orální tolerance.

Mezi infekce s vysokou mírou mortality v rozvojových zemích se řadí mimo jiné průjmová onemocnění, jehož původci jsou například rotaviry, bakterie *Vibrio cholerae*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, patogenní kmeny bakterie *E. coli* nebo parazitičtí prvoci jako *Entamoeba spp.* nebo *Giardia spp.* Střevní onemocnění jsou riziková především pro děti z důvodu nedostatečně vyvinutého imunitního systému a podvýživy v rozvojových zemích (World health organization, 2024). Dle UNICEF (2024) jsou průjmová onemocnění celosvětově nejčastější příčinou úmrtí u dětí ve věku do pěti let. Největší mortalita byla zaznamenána v jižní Asii a v subsaharské Africe.

Cílem této práce je zpracovat literární rešerši o připravených rostlinných jedlých vakcínách proti bakteriím *E. coli* a *V. cholerae* a dále o kombinovaných, multivalentních a multikomponentových vakcínách proti těmto a dalším patogenům, které způsobují lidská

střevní onemocnění. Úvodní kapitoly jsou věnovány rovněž používaným metodám výroby a mechanismu indukce imunitní odpovědi. Součástí práce je také popis výhod a nedostatků těchto vakcín, kritické zhodnocení současného vývoje a náhled do budoucna.

2 Metody výroby rostlinných jedlých vakcín

Prvním krokem přípravy vakcíny je získání sekvence DNA pro antigen, která bývá zpravidla připravena synteticky. Nejprve se vytvoří krátké oligonukleotidy, které mají vzájemně komplementární části a mohou být spojeny a namnoženy pomocí PCR (Wen et al., 2006). Výhodou syntetické výroby sekvence je možnost optimalizace genetického kódu pro preferenčně využívané kodony cílové rostliny, což zvýší úspěšnost exprese proteinu a zamezí rozpoznání sekvence pro terminační místa eukaryotické mRNA, místa sestřihu nebo polyadenylační sekvence (Carton et al., 2007; Post et Nomura, 1980). Často se využívá možnosti spojení více antigenů z různých sérotypů nebo také ze vzdálených patogenů (Shojaei Jeshvaghani et al., 2019; Yu et Langridge, 2001). Sekvence bývá také fúzována se SEKDEL nebo KDEL sekvencí, což jsou signální sekvence proteinů pro jejich retenci v endoplazmatickém retikulu (Moravec et al., 2007). Haq et al. (1995) pro přípravu vakcíny použili dva typy LT-B lišící se přítomností SEKDEL sekvence. U rostlin obsahujících SEKDEL byla pozorována vyšší exprese antigenu, což je dáno usnadněním oligomerizace antigenu.

Následujícím krokem je vnesení požadovaného antigenu do rostliny, což může být provedeno více způsoby. Nejčastěji používané metody jsou znázorněny na Obr. 1. První možností transformace je použití biolistické metody, která je velmi univerzální, jelikož její účinek nezávisí na rostlinném druhu. Metoda je založena na vnášení DNA do buněk pomocí urychlených mikroprojektilů vyrobených zejména ze zlata nebo z wolframu. (Sanford, 1990). Sekvence je vložena do transformačního vektoru, který obsahuje homologní sekvence s cílovou sekvencí (De Cosa et al., 2001). Touto metodou lze provádět tvorbu vakcín transformací chromozomální i plastidové DNA (Rosales-Mendoza et al., 2009; Rosales-Mendoza et al., 2011). Výhodou exprese v plastidech je tvorba velkého množství antigenu, toho je dosaženo díky většímu množství kopií chloroplastů na buňku. Sekvence DNA dodávaná biolistickou metodou pro výrobu vakcíny v chloroplastovém genomu kóduje gen pro selekční marker, požadovaný antigen a obsahuje koncové části pro homologní rekombinaci v rostlinném genomu (Molina et al., 2004).

Antigen exprimovaný v chloroplastech a v chromozomální DNA se může lišit glykosylací, ke které v chloroplastech nedochází. Dle studií Rosales-Mendoza et al. (2009, 2011) glykosylace snížila množství antigenu potřebného pro imunizaci, z čehož usuzovali, že nejspíše funguje jako adjuvans. Avšak Yuki et al. (2013) nepozorovali rozdíl v imunizaci mezi použitím glykosylované a aglykosylované formy. Judge et al. (2004) ukázali, že vytvořené protilátky

proti glykosylovanému antigenu nemusí účinně neutralizovat bakteriální aglykosylované formy antigenu. Sekvenci pro antigen exprimovanou z chromozomální DNA však lze, jak ukázali Yuki et al. (2013), upravit mutací pro odstranění místa pro glykosylaci.

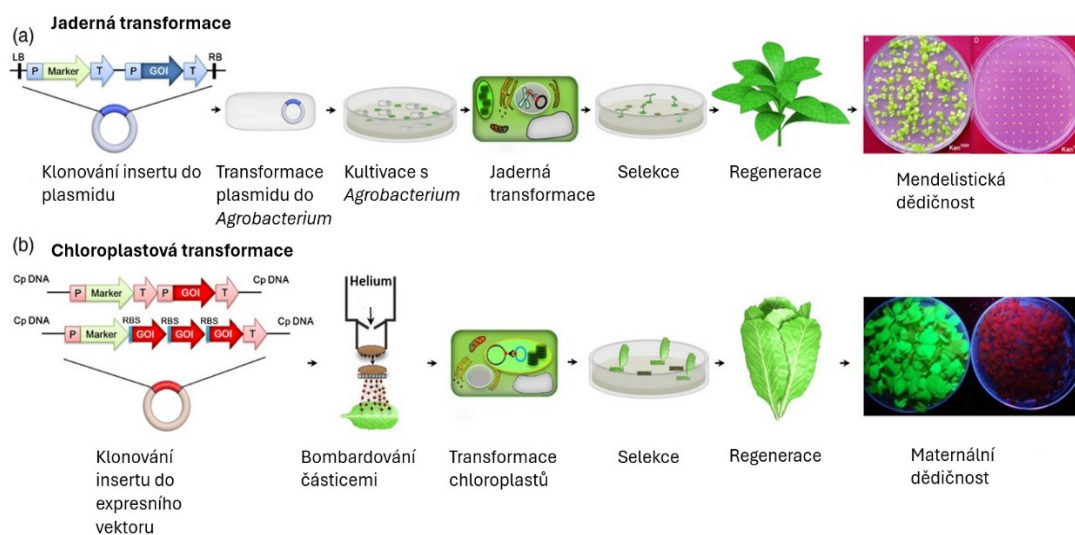
Další a velmi často užívanou možností je vnesení antigenu pomocí bakterií rodu *Agrobacterium* (Conn, 1942) nebo rostlinných virů. Nejčastěji využívaným druhem je *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend, 1907), kterým se do rostlin dostává T_i plasmid nesoucí patogenní geny, což je přirozená součást těchto bakterií. Součástí T_i plasmidu je T-DNA, která je při poranění rostlin translokována do jádra rostlinných buněk, kde dochází k rekombinaci a stabilní integraci (Das, 1998; Chilton et al., 1977). Expresí genů T-DNA v jádře vznikají látky, které vedou ke vzniku nádorů, v nichž se nachází příznivé prostředí pro růst bakterií *A. tumefaciens* (Montoya et al., 1977). Tyto patogenní geny na plasmidu je však možno nahradit naklonováním genu pro antigen. Rekombinantní plasmid je poté transformován do bakterie *A. tumefaciens*, například pomocí elektroporace, a následně je možné rostlinu infikovat. Tato metoda transformace je výhodná, jelikož bakterie *A. tumefaciens* infikuje širokou škálu rostlin (De Cleene et De Ley, 1976). Pro zvýšení exprese se využívá metoda agroinfiltrace, která je založena na vpravení suspenze bakterií *A. tumefaciens* do mezibuněčných prostor, což zaručí rovněž infekci buněk nenacházejících se na povrchu rostliny. Toho může být dosaženo injekcí suspenze nebo pomocí vakua, což umožní odsátí vzduchu z mezibuněčných prostor. Integrace do genomu žádnou z těchto metod není sekvenčně specifická, což vede k různorodé míře exprese (Wroblewski et al., 2005).

Pro tvorbu rostlinných vakcín byla použita řada rostlinných virů, například virus mozaiky vojtěšky (CPMV), virus tabákové mozaiky (TMV) nebo X virus bramboru (PVX) (Chapman et al. 1992; Karasev et al., 2005; Liu et al., 2005). Při použití této metody je sekvence kódující antigen vložena do virového vektoru na místo části sekvence pro obalový protein. Vektor je poté vnesen do rostliny (Chapman et al., 1992; Karasev et al., 2005). V případě tvorby vakcíny proti HIV antigenu Tat produkovaném v rostlinách špenátu (*Spinacia oleracea* L.) a v rostlinách tabáku Benthamova (*Nicotiana benthamiana* Domin) byla sekvence pro Tat naklonována do upraveného vektoru TMV. Vektor byl poté linearizován, transkribován in vitro pomocí T7 RNA polymerázy a RNA transkripty byly naočkovány do listů rostlin. Týden po inokulaci se Tat protein nahromadil nad detekovatelnou úroveň. Nevýhodou této metody je, že některé rostliny nemusí vložené sekvence tolerovat. Špenát se sice ukázal jako tolerantní rostlina, ale u rostlin tabáku Benthamova byl po inokulaci RNA zaznamenán rozvoj nekrózy. Další negativní stránkou metody je, že může být navozena pouze přechodná

exprese (Karasev et al., 2005). Rovněž úseky vkládané do virových částic jsou velikostně omezené a během replikace viru dochází ke genetickému driftu, což může vést k vyředění sekvence pro antigen. Výhodou však je, že sekvence pro antigen je při replikaci viru hojně amplifikována (Liu et al., 2005).

Po transformaci jsou rostlinné buňky na přechodnou dobu pěstovány na selekčním médiu s obsahem herbicidu. Úspěšnost transformace není stoprocentní a je potřeba získané transformované buňky selektovat, což lze provést díky vnesení genu pro rezistenci vůči herbicidům, jenž je součástí vektoru. Selektovat rostlinné buňky lze také pomocí antibiotik, kdy může být použita například kanamycinová rezistence. Po selekci rostlin je potřeba provést další analýzu, abychom zjistili míru exprese antigenu, jelikož inserce do chromozomu není sekvencně specifická a úroveň exprese se tak může mezi úspěšně transformovanými rostlinami lišit. Pro tuto analýzu lze použít metodu Western blot. Například při transformaci rostlin tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.) prostřednictvím bakterie *A. tumefaciens* byly použity dva vektory a Western blot analýzou byla zjištěna úspěšnost detekovatelné hladiny exprese antigenu. U obou případů byla úspěšnost podobná, v případě prvního vektoru 58 % a u druhého 60 % (Wen et al., 2006). Ve vyselektovaných semenech kukuřice exprimující podjednotku B cholerového toxinu (CTB) bylo pouze v 66 % exprimováno detekovatelné množství antigenu. U těchto linií byla míra exprese odlišná a pohybovala se mezi hodnotami 0,0002 a 0,0014 % celkového rozpustného proteinu (TSP) (Karaman et al., 2012).

Obr. 1: Proces výroby vakcín v rostlinách. Převzato a upraveno podle Chan et Daniell (2015). (a) Jaderná transformace – transformace chromozomální DNA pomocí bakterie rodu *Agrobacterium*, dědičnost je mendelistická. (b) Chloroplastová transformace – transformace plastidové DNA biolistickou metodou, dědičnost je maternální.



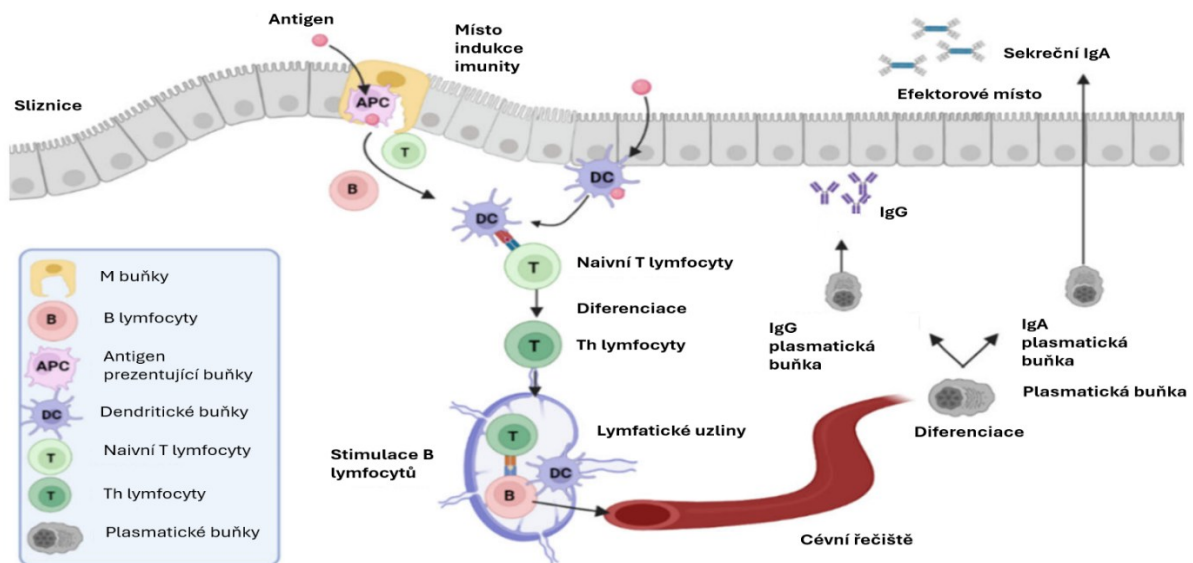
3 Mechanismy indukce imunitní odpovědi

Cílem jedlých rostlinných vakcín je navození slizniční i systémové imunity vůči podávanému antigenu. Proces indukce imunitní odpovědi je znázorněn na Obr. 2. Pro rozvoj imunitní reakce je podstatné, aby se antigen dostal neporušeně do střeva, kde cílí na mikrofold (M) buňky (Brayden et al., 2005). Rostlinné buňky jsou efektivním dopravním prostředkem pro antigen do střeva, jelikož buněčná stěna pro něj představuje ochrannou vrstvu a zabraňuje jeho předčasné degradaci způsobené trávicími enzymy při průchodu gastrointestinálním traktem. Glykosidická vazba v rostlinné buněčné stěně není hydrolyzovatelná trávicími enzymy a k jejímu rozrušení dochází až ve střevech, kde se nacházejí symbiotické mikroorganismy schopné jejího rozštěpení, čímž dojde k uvolnění antigenu do střeva (Flint et al., 2012; Daniell et al., 2019).

M buňky jsou součástí slizničního epiteliálního povrchu a vychytávají, transportují a zpracovávají antigen uvolněný do gastrointestinálního traktu, proto většina orálně podávaných vakcín cílí právě na ně. M buňky zprostředkovávají transport antigenu k Peyerovým plátům (Brayden et al., 2005), které patří mezi lymfoidní tkáň asociované se střevem (GALT). V GALT dochází k dodávání antigenu antigen prezentujícím buňkám (APC), mezi které se řadí především dendritické buňky (Iwasaki et Kelsall, 1999). Dalším typem GALT jsou

mezenterické lymfoidní uzliny, v nichž aktivované APC následně prezentují antigen T a B lymfocytům, čímž dochází k jejich aktivaci (Rosales-Mendoza et Salazar-González, 2014). B lymfocyty tvoří protilátky imunoglobulin A (IgA), což je důležitá složka slizniční adaptivní imunity. IgA sekretovaný do lumen střev se nazývá sekreční IgA (sIgA) (Mantis et al., 2011). sIgA slouží k neutralizaci toxinů a ochraně před vstupem patogenu do epiteliálních buněk (Lycke et al., 1999; Silvey et al., 2001). Důležitou roli v adaptivní slizniční imunitě hraje také produkce cytokinů (Ishigame et al., 2009). Imunitní odpovědí cytotoxických lymfocytů je sekrece granulí a lýze patogenů (Peters et al., 1991). Stejně jako u ostatních vakcín, důležitá je tvorba paměťových buněk. Pokud dojde k navození slizniční imunity, dojde také k rozvoji systémové imunity, jelikož aktivované B lymfocyty jsou schopné migrovat krevním řečištěm (Neutra et al., 1996).

Obr. 2: Mechanismus indukce imunitní odpovědi při orální imunizaci ve střevech. Převzato a upraveno podle Kwong et al. (2023). Antigen se dostane neporušeně do střeva, je zpracován mikrofold (M) buňkami, je dodán antigen prezentujícím buňkám (APC), jejichž typem jsou dendritické buňky (DC). Ty prezentují antigen naivním T a B lymfocytům, vznikají tak Th lymfocyty, které pomáhají aktivovat B lymfocyty. Dojde tak k jejich diferenciaci na plasmatické buňky, které tvoří imunoglobulin A (IgA) a G (IgG).



Aby došlo k rozvoji imunitní reakce, je potřeba obejít toleranci imunitního systému ke složkám přijímaným v potravě, takzvanou orální toleranci. Ta je zprostředkována klonální delecí CD4⁺ T lymfocytů a indukcí regulačních T lymfocytů (Treg), které potlačují odpověď autoreaktivních T lymfocytů. Bylo popsáno, že zacílení proteinového antigenu přímo na M buňky usnadňuje indukcii tolerance (Suzuki et al., 2008). Orální tolerance je závislá na dávce antigenu ve vakcíně. Například u orálně podávané rostlinné vakcíny proti viru hepatitidy typu B byla pozorována nejuspěšnější imunizace při nízkých dávkách, které byly stále dostatečné

pro imunogenicitu, ale zároveň při nich nebylo indukováno zvýšení hladiny Treg buněk (Kostrzak et al., 2009). Dodáváním antigenu lze navodit opačný stav, než je imunizace, což lze ukázat na příkladu toxinu CTB. Jedná se o účinné adjuvans pro stimulaci slizniční imunity a je schopen iniciace imunitní odpovědi i u antigenů, které samy o sobě nejsou na sliznicích imunogenní (Lycke et Holmgren, 1986). Stejně tak může sloužit i k iniciaci orální tolerance. Toho lze rovněž využít, a to při terapii autoimunitních onemocnění, kdy lze podat CTB fúzovaný s autoantigenem, a tím navodit i systémovou toleranci. Avšak pro účinné navození tolerance je potřeba opakovaného podávání vysokých dávek antigenu (Sun et al., 1994; Yu et Langridge, 2001).

Pro imunogenicitu antigenu je velmi podstatný kontext, ve kterém se antigen vyskytuje při použití k orální imunizaci. Antigeny mohou být účinné při injekčním podávání, avšak při jejich použití pro orální vakcíny nemusí dojít ke zdárné imunizaci. Toto se projevilo například ve výzkumu titru protilátek proti samotnému rotavirovému enterotoxinu NSP4 a proti NSP4 fúzovanému s CTB. Při podání stejné dávky byl titr protilátek proti fúzovanému NSP4 dvojnásobný. Dle autorů může být příčinou malá velikost, jelikož tento antigen obsahuje pouze 22 aminokyselinových zbytků, a tedy nedostatečné cílení na asociované lymfoidní tkáň se střevem a nedostatečnou stabilitu (Yu et Langridge, 2001).

4 Jedlé vakcíny proti infekcím způsobeným bakterií *Escherichia coli* (T. Escherich, 1885)

V rámci druhu *Escherichia coli* (T. Escherich, 1885) se rozlišují různé kmeny, z nichž některé jsou běžnou součástí komenzální mikroflóry, jiné jsou však patogenní. Ty jsou původci průjemových onemocnění závažných zejména pro děti v rozvojových zemích, kde mohou způsobit řadu úmrtí. Rostlinné jedlé vakcíny jsou vyvíjené proti enterotoxigenním kmenům (ETEC) a enterohemoragickým kmenům (EHEC), podskupině shiga-like toxigenních kmenů (STEC), které jsou producenty shiga toxinu (Stx). Příčinou jejich patogenity je adherence k povrchu sliznice a následné uvolňování enterotoxinů (Kaper et al., 2004; Shojaei Jeshvaghani et al., 2019). Přehled jedlých vakcín proti *E. coli* je uveden v Tab. 1.

4.1 Cílové virulenční faktory vakcín proti *E. coli*

Rostlinné jedlé vakcíny jsou cíleny především na virulenční faktory LT, ST, YncE a CF u ETEC a faktory EspA, Tir, Stx a intimin u EHEC (Karimi et al., 2013; Sato et Shimonishi, 2004; Shojaei Jeshvaghani et al., 2019; Fatemeh et al., 2022).

LT je teplotně labilní toxin skládající se z podjednotky LT-A a pěti podjednotek LT-B. LT-B pentamer se váže na monosialotetrahexosylgangliosid (GM1) v membráně epitelu střeva, což způsobí transport podjednotky LT-A dovnitř do buněk, jehož přítomností dochází ke stimulaci produkce cAMP, čímž dojde k aktivaci proteinkinázy A a následné fosforylaci iontových kanálů způsobujících export soli a vody a dochází tak k iniciaci průjmu. (Tacket et al., 1998; Sheikh et al., 2022). Naproti tomu ST je teplotně stabilní toxin, který se váže na transmembránový receptor guanylátcyklázy C, což vede ke zvýšení koncentrace cGMP a rovněž dochází k aktivaci proteinkinázy A (Sato and Shimonishi, 2004). Toxiny zvané kolonizační faktory (CF) představují velkou skupinu, existuje jich více než 22 typů. Jejich funkce je zprostředkování adherence ke střevnímu epitelu vazbou na glykokonjugáty. (Gaastra et Svennerholm, 1996). U periplasmatického proteinu YncE není fyziologická funkce známá (Baba-Dikwa et al., 2008). Při adherenci kmene EHEC se uplatňuje toxin intimin, který se váže na Tir vylučovaný EHEC do buněk hostitele. Virulenní faktor EspA je důležitý pro dodání Tir do buňky a transportuje se prostřednictvím transportního systému typu III a zprostředkuje kontakt s cílovou epiteliální buňkou (Kenny et al., 1997; Knutton et al., 1998). Stx se dostává do buňky pomocí endocytózy, vede k inhibici proteosyntézy a jeho přítomnost může vést k hemolyticko-uremickému syndromu. (Sandvig et van Deurs, 1996; Shojaei Jeshvaghani et al., 2019).

4.2 Vakcíny proti enterotoxigenním kmenům *E. coli*

Vakcíny proti ETEC se zaměřují zejména na imunizaci pomocí LT-B. Pro výrobu v rostlinách již byly použity rostliny lilku bramboru (*Solanum tuberosum* L.), kukuřice (*Zea mays* L.), tabák virginský, locika setá (*Lactuca sativa* L.) a další rostliny. Všechny vakcíny byly testovány na myších, avšak pouze vakcíny vyráběné v lilku bramboru a v kukuřici prošly také klinickými testy. LT-B lze použít také jako účinné adjuvans (Martínez-González et al., 2011; Rosales-Mendoza et al., 2009; Streatfield et al., 2001; Tacket et al., 1998; Tacket et al., 2004).

V případě klinicky testované vakcíny produkované v transgenních rostlinách lilku bramboru byla jako antigen používána syntetická sekvence pro LT-B, jehož hmotnost v jedné dávce byla 0,4-1,1 mg. Transformace byla provedena bakterií *A. tumefaciens*. Rostliny byly pěstovány v půdě do dosažení zralosti a hlízy byly spotřebovány do 3 měsíců. Klinické studie se zúčastnilo 14 dobrovolníků. Skupina 11 dobrovolníků požívala syrové transgenní brambory ve třech dávkách a kontrolní skupina 3 dobrovolníků konzumovala hlízy přírodní linie. U třech z dobrovolníků užívajících transgenní hlízy byla zaznamenána nevolnost. U 91 % dobrovolníků bylo v nějaké době po imunizaci zaznamenáno v séru čtyřnásobné zvýšení anti-

LT-B imunoglobulinu G (IgG) a u 55 % čtyřnásobné zvýšení anti-LT-B IgA, zatímco u dobrovolníků požívajících požívajících hlízy přírodní linie prokázáno žádné zvýšení. Ve stolici imunizovaných dobrovolníků byl detekován nárůst sekrečních IgA. Schopnost protilátek neutralizovat patogen byla úspěšná, neboť pomocí neutralizace byl u 8 z 11 dobrovolníků stanoven neutralizační titer protilátek > 1:100. Úspěšnost imunizace byla srovnávána s LT-B produkovaným v *E. coli* a bylo zjištěno, že není tak vysoká, avšak i imunizace antigenem LT-B z brambor je signifikantní. Dávka byla ve všech případech dostatečná, jelikož bylo prokázáno, že rovněž u dobrovolníka s nejnižším množstvím v dávce byla vyvolána imunitní odpověď. Při zvyšování dávky již obsah antigenu LT-B nehrál roli a nedošlo ke zvýšení imunitní odpovědi. Klinická studie byla tedy úspěšná, jelikož došlo k navození slizniční i systémové imunity (Tacket et al., 1998).

Tacket et al. (2004) dále klinicky testovali vakcínu proti ETEC vyrobenou v kukuřici. Vakcína byla připravena transformací bakterií *A. tumefaciens* a nejprve byla testována na myších, kterým byla podávána transgenní namletá semena s LT-B o hmotnosti 5 nebo 50 µg. 5 µg LT-B stačilo pro vyvolání imunitní odpovědi. Imunizace semeny kukuřice byla srovnávána s imunizací čistým LT-B ve stejném množství, přičemž bylo zjištěno, že množství protilátek v séru je v obou případech stejné, avšak IgA byly zjišťovány i ve stolici, kde bylo množství protilátek po konzumaci semen kukuřice vyšší než po imunizaci pomocí LT-B. Po imunizaci byl myším podán toxin LT a bylo prokázáno, že myši jsou chráněné před otokem střeva a imunizace transgenními semeny kukuřice byla tedy úspěšná (Streatfield et al., 2001). Vakcína pro klinické testování byla připravena rozemletím a odtučněním kukuřičných klíčků. Odtučnění vedlo ke koncentraci antigenu a také k možnosti prodloužení doby skladování. Účinnost vakcíny byla studována na 13 dobrovolnících, z nichž 4 sloužili jako negativní kontrola a byli falešně imunizováni netransgenní kukuřičnou moučkou. Dobrovolníci požívali kukuřičnou moučku s obsahem 1 mg LT-B ve třech dávkách. U imunizovaných dobrovolníků nebyly zaznamenány žádné zdravotní komplikace, pouze u jednoho se vyskytl mírný průjem. V této studii došlo ke čtyřnásobnému navýšení sérové hodnoty protilátek IgA u 44 % a IgG u 78 % dobrovolníků. Čtyřnásobné zvýšení sIgA bylo detekováno ve stolici rovněž u 44 % dobrovolníků. 7 dní po imunizaci byly detekovány buňky sekretující protilátky (ASC), které byly zaznamenány u 78 %, přičemž byly detekovány IgG i IgA ASC zároveň (Tacket et al., 2004).

Proti LT-B byly vyvinuty i další úspěšné vakcíny, avšak všechny byly zatím testovány pouze na myších. Mason et al. (1998) připravili vakcínu proti LT-B v lilku bramboru. Syntetická

sekvence pro LT-B byla do rostlin transformována bakterií *A. tumefaciens*. Nejvyšší míra exprese byla zaznamenána v listech, a to až 1,9 % TSP. U rostlin s vysokou mírou exprese LT-B byl pozorován zakrnělý fenotyp. Myši byly imunizovány 20 nebo 50 µg LT-B. Žádná z myší nebyla po imunizaci před infekcí stoprocentně chráněna. U myší imunizovaných rostlinným LT-B byla odolnost nižší než u imunizovaných bakteriálním LT-B, avšak stále byla významná.

Další vakcína produkovaná v rostlinách lilku bramboru rovněž exprimovala syntetický gen pro LT-B fúzaný se SEKDEL sekvencí. Tato fúzní sekvence byla klonována pod patatinový promotor, který je specifický pro hlízy, což vede k expresi pouze v nich. Transformace proběhla rovněž pomocí bakterie *A. tumefaciens*. Nejvyšší hladina exprese LT-B byla 17 µg/g hlízy. Testovaným myším bylo podáváno 5 g nakrájených hlíz s obsahem přibližně 65 µg LT-B. Druhá skupina dostávala intragastricky 0,4 ml extraktu hlíz s přibližně 2 µg LT-B a třetí skupina byla imunizována injekčně 0,5 µg transgenního LT-B smíchaného s adjuvans butyl16-p(AA). Po třech týdnech byla subkutánně imunizovaným myším podána orální posilovací dávka obsahující přibližně 65 µg LT-B v hlíze nebo 2 µg LT-B v extraktu. U myší imunizovaných orálně a intragastricky nebyly hladiny protilátek detekovatelné, nicméně subkutánní imunizace se ukázala jako úspěšná a následná orální posilovací dávka dokázala zvýšit titer IgA, avšak hladina IgG zůstala stejná (Lauterslager et al., 2001).

Haq et al. (1995) použili pro tvorbu vakcíny rostliny tabáku virginského a lilku bramboru. Jak již bylo zmíněno v Kap. 2, použili dva typy LT-B lišící se přítomností SEKDEL sekvence. Myším bylo orálně podáváno 12,5 µg LT-B v rostlinné tkáni nebo v purifikované podobě. Imunitní odpovědi obou skupin se vzájemně nelišily, ale titry protilátek byly nižší než při použití bakteriálního LT-B.

Kang et al. (2003) vytvořili vakcínu proti LT-B v chloroplastech tabáku virginského, kde exprese LT-B dosahovala 2,5 % TSP. Chloroplastový transformační vektor obsahoval homologní sekvence s chloroplastovou sekvencí a byl navržen pro vložení sekvence mezi geny pro tRNA kódující Ile a Ala ve dvou oblastech invertovaných repetit. Na jeden plastidový genom tedy připadají 2 sekvence (De Cosa et al., 2001). Transformace listů tabáku virginského probíhala biolistickou metodou. Vakcína nebyla testována, byla pouze prokázána silná vazba LT-B ke GM1 (Kang et al., 2003). Kang et al. (2004) vytvořili další vakcínu v chloroplastech tabáku virginského, ve které byl jako antigen použit LT s mutací Ser v pozici 63 na Lys v podjednotce A. Tato mutovaná forma postrádá toxické vlastnosti, ačkoliv je stále schopna vazby na GM1. Mutace LT byla provedena mutagenní PCR. Vakcína byla vytvořena

stejně jako v předchozí studii. Exprese mutantního LT dosahovala až 3,7 % TSP. Vakcína rovněž nebyla testována.

Vakcína obsahující LT-B byla připravena také v rostlinách lilku rajčete (*Solanum lycopersicum* L.). LT-B byl fúzován se 7 aminokyselinami ze zona pellucida 3 (ZP3), přičemž stále měl schopnost tvořit pentamery. Transformace kotyledonů rostlin lilku rajčete probíhala prostřednictvím bakterie *A. tumefaciens*. V rostlinách lilku rajčete byla zaznamenána exprese LT-B až 64,7 µg/g suché hmotnosti a vytvořený prášek ze všech lyofilizovaných rajčat obsahoval 37,8 µg/g suché hmotnosti a byla u něj zaznamenána skladovatelnost minimálně 5 měsíců. U následující generace vzniklé samoopylením byl obsah LT-B až 354,7 µg/g suché hmotnosti. U LT-B nebyla zaznamenána žádná glykosylace. Lyofilizace snížila hmotnost rajčat na 6 % původní hmotnosti a obsah antigenu se zároveň zvýšil 16krát, což znamená, že nedošlo k jeho degradaci při zpracování (Walmsley et al., 2003).

Kim et al. (2010) připravili vakcínu exprimující LT-B v kalusu rýže. Syntetická LT-B sekvence byla transformována biolistickou metodou do kalusu. Nejvyšší exprese byla 0,12 % TSP, což odpovídalo 0,086 mg/g. Myši byly orálně imunizovány čtyřmi dávkami. LT-B dokázal navodit tvorbu protilátek a u imunizovaných myši byla zaznamenána snížená vazba LT-B na GM1 ve srovnání s neimunizovanými myši.

LT-B byl exprimován také v rostlinách sóji (*Glycine max* L.). V semenech byla zaznamenána exprese až 3,5 % TSP, což odpovídalo 2 mg. Bylo pozorováno, že jeho obsah ve skladovaných semenech se alespoň 3 měsíce nemění. Syntetický gen pro LT-B byl fúzován se KDEL sekvencí. Fúzní sekvence byla klonována pod kontrolu glycininového promotoru. Myši byly imunizovány v týdenních intervalech, kdy první skupina myši dostávala injekčně 0,5 µg LT-B, druhá žaludeční sondou dávku 25 µg a třetí byla imunizována smíšenou strategií. Nejvyšší titr IgG byl zaznamenán u injekčně imunizovaných myši, v případě IgA byla nejúčinnější smíšená imunizace a při injekční imunizaci nebyly tyto protilátky zaznamenány. U orálně imunizovaných myši bylo dosaženo ochrany proti akumulaci tekutiny ve střevě způsobené LT (Moravec et al., 2007).

Martínez-González et al. (2011) připravili vakcínu proti LT-B v rostlinách lociky transformací bakterií *A. tumefaciens*. Myši byly imunizovány 8 µg rostlinného a bakteriálního LT-B. Při imunizaci bakteriálním LT-B byl titr IgA vyšší, avšak i LT-B ze salátu dokázal navodit signifikantní úroveň. Po imunizaci vakcínou vyrobenou v rostlinách lociky byly myši navíc infikovány choleryním toxinem a rovněž proti němu byla prokázána odolnost.

Ve vláskových kořenech tabáku virginského byla vytvořena vakcína obsahující antigen YncE. Listové segmenty byly transformovány *Agrobacterium rhizogenes* (Riker et al., 1930) Conn, 1942. V kořenech byla zaznamenána exprese YncE 0,9 % z TSP. Testované myši byly imunizovány orálně nebo injekčně i orálně 25 µg YncE čtyřikrát v sedmidenních intervalech. V obou případech imunizace byly navozeny významné titry protilátek. Vyšší titr IgG byl zaznamenán u myši imunizovaných orálně i injekčně, kdežto u myši imunizovaných pouze orálně byla vyšší hladina IgA (Fatemeh et al., 2022).

4.3 Vakcíny proti enterohemoragickým kmenům *E. coli*

Jedlá vakcína proti kmenu EHEC byla vytvořena vnesením modifikované sekvence pro shiga toxin typu 2 (Stx2) do rostlin tabáku virginského. Sekvence pro Stx2 byla upravena pomocí tichých mutací v obou podjednotkách, které byly poté vneseny do vektoru jako jednotlivé ORF (otevřené čtecí rámce). Úspěšnost výroby vakcíny byla testována na myších. Významná hladina protilátek byla zjištěna u myši, které byly krmeny rostlinnými extrakty v podobě pěti dávek a které byly imunizovány parenterálně a poté obdržely posilovací orální dávku. Ve srovnání s toxinem LT-B je potřeba navodit celosystémovou imunitu proti Stx2, jelikož nepůsobí pouze v gastrointestinálním traktu, ale vstupuje do oběhu a váže se na tkáň s globotriaosyl ceramidem (Gb3). Celosystémová imunizace v této studii byla úspěšná, jelikož myši byly chráněny před renálním tubulárním poškozením. (Wen et al., 2006).

Proti EHEC byly vytvořeny další dvě vakcíny v rostlinách lociky, které exprimovaly EspB a γ -intimin s optimalizovanými sekvencemi a v některých insertech byla připojena sekvence pro transitní chloroplastový protein. Inserty byly ohraničeny loxP místy, což může v budoucnu sloužit k vyštipnutí genu pro rezistenci v pylu, aby se snížilo riziko jeho šíření v životním prostředí. Kotyledony byly transformovány bakterií *A. tumefaciens*. Mezi výtěžkem antigenů a expresí v chloroplastech nebyla zaznamenána souvislost. Myši byly imunizovány dávkou 2,8 µg γ -intiminu nebo 1,1 µg EspB po dobu 6 dní. 20. den od začátku imunizace byly pozorovány mírné hladiny anti-EspB IgG, zatímco hladiny IgA protilátek proti oběma antigenům dosáhly významných hodnot, neutralizační titr pro EspB byl 1:500 a pro γ -intimin 1:750. Myši byly po imunizaci infikované EHEC, kdy u vakcíny s EspB antigenem bylo sníženo vylučování bakterií na 5,8 % jednotek formujících kolonii (CFU) a při použití γ -intiminu na 27 %. Oba případy tedy byly úspěšné, avšak při použití γ -intiminu nebyl výsledek statisticky významný (Su et al., 2023).

Vakcínu proti EHEC vytvořili také Judge et al. (2004), kteří exprimovali syntetickou část sekvence pro intimin v tabáku virginském. Vakcína byla vytvořena transformací bakterií *A. tumefaciens*. Byly použity dva vektory, které se lišily přítomností signální sekvence. V případě vektoru se signální sekvencí dosahovala exprese intiminu 10 až 13 µg/g, ale byla u něj zaznamenána glykosylace. Po imunizaci myší byla vyvolána tvorba protilátek, které však byly účinné pouze proti glykosylované formě a nebyly schopné neutralizovat bakteriální intimin. Při použití vektoru bez signální sekvence bylo dosaženo exprese pouze 3 µg/g. Myši byly imunizovány buněčnou suspenzí exprimující intimin s cholera toxinem (CT) sloužícím jako adjuvans. Jako účinnější forma imunizace pro snížení doby kolonizace EHEC u myší se ukázalo injekční podání intiminu a následná orální imunizace.

Tab. 1: Přehled rostlinných jedlých vakcín proti *E. coli*. V tabulce jsou zahrnuty vakcíny proti různým antigenům enterotoxigenních (ETEC) a enterohemoragických (EHEC) kmenů *E. coli*. Ve sloupci Rostlina je uveden rostlinný druh, ve kterém byla vakcína připravena transformací bakteriemi *A. tumefaciens* a *A. rhizogenes* nebo pomocí biolistické metody. Je popsán způsob testování, v případě testování na myších je uvedeno, zda bylo zaznamenáno zvýšení hladin protilátek (protilátky) a zda byla prokázána vyšší odolnost myši infekci po imunizaci vakcínou (odolnost).

Autor	Rostlina	Patogen	Antigen	Příprava	Testování
Haq et al., 1995	lilek brambor, tabák virginský	ETEC	LT-B	<i>A. tumefaciens</i>	myši – protilátky
Mason et al., 1998	lilek brambor	ETEC	LT-B	<i>A. tumefaciens</i>	myši - protilátky, odolnost
Tacket et al., 1998	lilek brambor	ETEC	LT-B	<i>A. tumefaciens</i>	I. fáze klinických testů
Lauterslager et al., 2001	lilek brambor	ETEC	LT-B	<i>A. tumefaciens</i>	myši – protilátky
Streatfield et al., 2001	kukuřice setá	ETEC	LT-B	<i>A. tumefaciens</i>	myši, I. fáze klinických testů
Kang et al., 2003	tabák virginský	ETEC	LT-B	biolistická metoda	netestováno
Walmsley et al., 2003	lilek rajče	ETEC	LT-B	<i>A. tumefaciens</i>	netestováno
Judge et al., 2004	tabák virginský	EHEC	intimin	<i>A. tumefaciens</i>	myši - protilátky, odolnost
Kang et al., 2004	tabák virginský	ETEC	LT	biolistická metoda	netestováno
Wen et al., 2006	tabák virginský	EHEC	Stx2	<i>A. tumefaciens</i>	myši - protilátky, odolnost
Moravec et al., 2007	sója luštinatá	ETEC	LT-B	biolistická metoda	myši - protilátky
Kim et al., 2010	rýže setá	ETEC	LT-B	biolistická metoda	myši - protilátky
Martínez-González et al., 2011	lilek brambor	ETEC	LT-B	<i>A. tumefaciens</i>	myši - protilátky
Fatemeh et al., 2022	tabák virginský	ETEC	YncE	<i>A. rhizogenes</i>	myši - protilátky
Su et al., 2023	locika setá	EHEC	EspB, γ -intimin	<i>A. tumefaciens</i>	myši - protilátky, odolnost

5 Vakcíny proti bakterii *Vibrio cholerae* (Pacini, 1854)

Bakterie *Vibrio cholerae* (Pacini, 1854) je stejně jako *E. coli* původcem průjmových onemocnění. Proti tomuto onemocnění již byly vyrobeny tři vakcíny, které jsou předběžně schváleny WHO pro použití, Dukoral®, Shanchol™ a Euvichol® (World health organization). Jedlé rostlinné vakcíny proti *V. cholerae* cílí na toxin CTB, který se stejně jako v

případě LT-B u *E. coli* váže na GM1 (Holmgren et al., 1973). Přehled těchto vakcín je uveden v Tab. 2.

První vakcína proti *V. cholerae* byla vytvořena v rostlinách lilku bramboru. V této studii byla prokázána schopnost oligomerizace a imunogenicita CTB produkovaného v rostlinách. Sekvence CTB a SEKDEL byly klonovány do vektoru, jenž byl transformován elektroporací do bakterie *A. tumefaciens*. Po transformaci rostlin bylo regenerováno 6 linií, u kterých byla míra exprese sledována díky genu pro luciferázu pod *mas* P1 promotorem. Gen pro CTB byl pod promotory *mas* P1 a P2 indukovanými auxinem, což mělo za následek zvýšení exprese v auxinem indukovaných tkáních až 100krát. CTB se zde vyskytoval až v množství 0,3 % TSP. Vakcína nebyla testována, pouze byla analyzována schopnost vazby CTB na GM1 gangliosid. Afinita CTB byla silná a selektivní pouze pro vazbu ke GM1 (Arakawa et al., 1997).

Biolistickou metodou byla vytvořena vakcína exprimující CTB v endospermu rostlin rýže. Syntetický gen pro CTB se SEKDEL sekvencí byl vložen do rostlinného expresního vektoru pod kontrolu Bx17 specifického promotoru pro endosperm, který umožnil zvýšenou expresi CTB. Bylo selektováno 7 linií rostlin, ale pouze u 4 z nich byla zaznamenána schopnost reprodukce, u ostatních linií nebyla tvorba semen zaznamenána (Oszvald et al., 2008).

Další vakcína vyráběná v rostlinách rýže byla připravena transformací bakterií *A. tumefaciens*. Byla zjištěna míra exprese 30 µg CTB na semeno a v analýze Western blot za neredukujících podmínek byla ukázána schopnost CTB tvořit pentamer. Nejprve byla vakcína testována na myších, u nichž byl zaznamenán rozvoj IgA i IgG odpovědi po podání dávky 75 µg CTB. U myší imunizovaných ekvivalentní dávkou bakteriálního CTB bylo navození IgA odpovědi mnohem méně úspěšné. Po vystavení myší CT nebyly u myší imunizovaných semeny rýže pozorovány žádné příznaky onemocnění, avšak u části myší imunizovaných purifikovaným CT-B byl zaznamenán průjem (Nochi et al., 2007). V navazující studii byla účinnost imunizace touto vakcínou testována u makaků (*Macaca fascicularis* Raffles, 1821). Tři z nich byli orálně imunizováni rozemletými semeny s obsahem 1 mg CTB v pěti dávkách po dvou týdnech a po půl roce obdrželi posilovací dávku. Anti-CTB sIgA byly u makaků zaznamenány již před imunizací i přes neexistující předchozí záznam o prodělané infekci *V. cholerae* a ukázaly se jako reaktivní také proti LT-B *E. coli*. Po imunizaci již nebylo zaznamenáno žádné zvýšení hladiny sIgA. Po imunizaci dvěma až třemi dávkami začaly být pozorovatelné IgG protilátky a i po 6 měsících od počátku imunizace dosahovaly u všech makaků minimálně detekovatelných hladin. Posilovací dávka po 6 měsících znovu navodila původní hladinu

protilátek. Schopnost protilátek byla hodnocena v neutralizačním testu, kde se sledovala vazba CTB na receptor GM1 a jeho inhibice protilátkami v séru, což dopadlo úspěšně (Nochi et al., 2009).

Vakcína byla vyráběna také v rostlinách tabáku Benthamova, a to rovněž vnesením syntetické sekvence pro CTB fúzované se SEKDEL prostřednictvím bakterie *A. tumefaciens*. V listech byla zaznamenána exprese až 0,5 µg CTB/g. U části produkovaného antigenu byla zaznamenána N-glykosylace. Glykosylace pouze části proteinů byla způsobena pravděpodobně neefektivním rozpoznáním CTB komplexem oligosacharyltransferázy v endoplazmatickém retikulu. Pro její eliminaci byla provedena cílená mutagenese kodonu Asn4 na Ser, jelikož Asn se nepodílí na vazbě GM1 a mutace by neměla ovlivnit funkci CTB. Aglykosylovaná forma byla srovnatelná s bakteriálním CTB a byla u ní prokázána schopnost vazby GM1 s vysokou afinitou, čímž se nelišila od komerčního CTB antigenu. Vakcína byla testována na myších, kdy jim byly podávány dávky 3, 10 nebo 30 µg CTB bez SEKDEL (eCTB) nebo se SEKDEL (pCTB) a po dvou týdnech obdržely posilovací dávku. U myši imunizovaných 30 µg byly zaznamenány průměrné titry IgG 100000 a IgA 200. Myši imunizované dávkou 10 µg eCTB vykazovaly signifikantní titr IgA v porovnání s kontrolními myšmi, ale nižší hladinu než u myši imunizovaných pCTB. U myši imunizovaných 3 µg byly titry IgA i IgG v případě obou typů CTB nízké. Hladiny IgA zůstávaly vysoké alespoň 6 měsíců. Protilátky byly schopny snížit vazbu CT na GM1 o 20 až 60 %. Výsledky naznačovaly tomu, že pCTB byl v imunizaci efektivnější (Hamorsky et al., 2013).

Yuki et al. (2013) připravili další vakcínu na bázi CTB produkovanou v rostlinách rýže. Optimalizovaná sekvence pro CTB byla fúzovaná se signální sekvencí KDEL a se sekvencí pro glutelin B-1 signální peptid, která je podstatná pro nasměrování do endospermu. Transformace byla provedena bakterií *A. tumefaciens*. Pomocí metody SDS-PAGE byla zjištěna produkce dvou typů monomerů, jelikož u jednoho byla zaznamenána glykosylace. Pro zajištění stejných vlastností veškerého CTB byla odstraněna sekvence pro glykosylaci, kdy sekvence pro Asn4 substituována sekvencí pro Gln. Vakcína byla testována na myších a na primátech. Myši byly imunizovány dávkou 60 – 360 µg glykosylovaného nebo původního CTB. U obou skupin byla indukována imunitní odpověď, která byla v obou případech stejná. Makakům bylo podáváno 5 dávek ve dvoutýdenních intervalech obsahujících 1,4 mg CTB. První skupina rovněž dostala původní CTB a druhá neglykosylovaný. Imunitní odpovědi mezi těmito skupinami se nelišily. Byla navozena tvorba IgG, avšak IgA byly zaznamenány ve stolici makaků již před imunizací a po vakcinaci nedošlo k jejich navýšení. Transgenní

rostliny byly samoopylovány po dobu šesti generací. Semena, která tvořila šestou generaci (T6), byla označena jako hlavní semenná banka (MSB). Pro uchování byla vysušena a umístěna do chladu. U semen vzniklých samosprášením T6 generace, která byla nazvána další semenná banka (NSB), byla prováděna genetická a proteomická analýza. Obsah CTB byl u MSB 6,45 mg/g semene a u NSB 5,83 mg/g. PCR analýzou bylo zjištěno, že sekvence CTB zůstává stále stejná. Peptidové spektrum se rovněž nelišilo a CTB byl stále exprimován v endospermu. Bylo tedy prokázáno, že MSB a NSB se kvalitou neliší a lze tato semena dále rozmnožovat a používat (Sasou et al., 2021).

Pro výrobu vakcíny s obsahem CTB antigenu byla použita také kukuřice. Syntetická sekvence byla vnesena rovněž pod kontrolu specifického promotoru pro endosperm, a to pod promotor pro γ -zein. Transgenní rostliny byly vytvořeny biolistickou metodou. Bylo získáno 6 linií rostlin a u 3 z nich došlo k inzerci více než 10 kopií sekvence CTB. V semenech dvou linií nebylo exprimováno detekovatelné množství antigenu. U ostatních linií byla míra exprese odlišná a pohybovala se mezi hodnotami 0,0002 a 0,0014 % TSP. Křížením nebo samoopylením dvou linií s nejvyšší mírou exprese byly získány dceřiné rostliny s až 30krát vyšší mírou exprese CTB. Testované myši byly rozděleny do 5 skupin, kdy byly krmeny 5 μ g, nebo 10 μ g CTB, 5 μ g LT-B *E. coli*, 5 μ g LT-B + 5 μ g CTB, nebo semeny přírodní linie. Bylo ukázáno, že antigen LT-B dokáže navodit vyšší tvorbu IgG. Zároveň u anti-LT-B IgG byla zaznamenána schopnost reagovat s CTB, ale u anti-CTB s LT-B tato reakce nebyla tak silná. V případě IgA protilátek byla schopnost zkřížené reakce zaznamenána u obou toxinů. Dávka 10 μ g CTB se ukázala jako účinnější než 5 μ g. 34. a 41. den byla zaznamenána ještě vyšší hladina sérových anti-CTB protilátek v případě imunizace LT-B + CTB. Imunizací CTB byla indukována déle trvající slizniční imunitní odpověď než při použití LT-B (Karaman et al., 2012).

Ve studii Jani et al. (2002) nebyla CTB sekvence pro expresi v rostlinách lilku rajčete nijak upravována. Sekvence byla klonována do vektoru se SEKDEL sekvencí, který byl do rostlin vnesen pomocí bakterie *A. tumefaciens*. Nejvyšší hodnota exprese v listech byla 0,02 % a v plodech až 0,04 % TSP. Bylo otestováno, že CTB je schopen oligomerizace, což bylo ukázáno na jeho schopnosti vazby na GM1. Stejnou metodou byla připravena vakcína v rostlinách tabáku virginského, u které byla zaznamenána hladina exprese CTB v listech rovněž 0,02 % TSP. Ta již byla testována na myších, kterým bylo podáváno 5 μ g CTB. (Jani et al., 2004).

Další vakcínu v rostlinách lilku rajčete připravili Jiang et al. (2007). Expres CTB v těchto rostlinách byla vyšší než u předchozí vakcíny a dosahovala až 0,081 % TSP, což odpovídalo 0,455 µg/g. Toho bylo dosaženo použitím promotoru E8, který je specifický pro plody. Transformace byla zprostředkována rovněž bakterií *A. tumefaciens*. Vakcína byla také testována na myších, kterým bylo podáváno 10 g rajčat s nejvyšší mírou exprese CTB pětkrát ve 28denním období každý den rozdělených ve třech dávkách. Titry sérových i slizničních protilátek byly u 11 z 12 testovaných myši signifikantní a byly vyšší při orální imunizaci CTB v rajčatech než při imunizaci 5 µg čistého CTB. Avšak při imunizaci čistým CTB byla zaznamenána signifikantní hladina u všech myši.

Vakcína vyrobená v rostlinách lociky produkovala antigen CTB v chloroplastech. Expres v chloroplastech by mohla zaručit srovnatelné hladiny mezi transgenními liniemi rostlin, jelikož zde nedochází k umlčování genů. Pro biolistickou transformaci rostlin byl použit vektor, kterým byla sekvence pro CTB integrována do oblasti invertovaných repetitivních sekvencí mezi geny pro tRNA-Ile a tRNA-Ala. Nejvyšší míra exprese byla 6,3 % TSP a byla zaznamenána ve starých listech. Úspěšnost imunizace touto vakcínou však nebyla testována (Suleiman et al., 2013).

Tab. 2: Přehled rostlinných jedlých vakcín proti V. cholerae. Všechny vakcíny jsou cíleny na antigen cholera toxin B (CTB). Ve sloupci Rostlina je uveden rostlinný druh, ve kterém byla vakcína připravena transformací bakterií A. tumefaciens nebo pomocí biolistické metody. V tabulce je popsán způsob testování, v případě testování na myších je uvedeno, zda bylo zaznamenáno zvýšení hladin protilátek (protilátky) a zda byla prokázána vyšší odolnost myši infekci po imunizaci vakcínou (odolnost).

Autor	Rostlina	Příprava	Testování
Arakawa et al., 1997	lilek brambor	<i>A. tumefaciens</i>	netestováno
Jani et al., 2002	lilek rajče	<i>A. tumefaciens</i>	netestováno
Jani et al., 2004	lilek rajče	<i>A. tumefaciens</i>	myši - protilátky
Jiang et al., 2007	lilek rajče	<i>A. tumefaciens</i>	myši - protilátky
Nochi et al., 2007	rýže setá	<i>A. tumefaciens</i>	myši – protilátky, odolnost, makakové
Oszvald et al., 2008	rýže setá	biolistická metoda	netestováno
Karaman et al., 2012	kukuřice	biolistická metoda	myši - protilátky, odolnost
Hamorsky et al., 2013	tabák Benthamův	<i>A. tumefaciens</i>	myši - protilátky, odolnost
Suleiman et al., 2013	locika setá	biolistická metoda	netestováno
Yuki et al., 2013	rýže setá	<i>A. tumefaciens</i>	myši, makakové

6 Kombinované, multivalentní a multikomponentové vakcíny

Jak již bylo zmíněno v Kap. 2, výhodou rostlin pro výrobu vakcín je možnost kombinovat více antigenů. Pokud pocházejí z jednoho kmene, nazývají se multikomponentové, v případě použití antigenů z různých kmenů patogenu se označují jako multivalentní. Naproti tomu kombinované vakcíny obsahují antigeny z různých organismů (Ellis et Brown, 1997; Saul et Fay, 2007). Inerty vakcín zmíněných v této kapitole jsou zkonstruovány kombinací několika antigenů uplatňujících se při střevních onemocněních. Seznam těchto vakcín je uveden v Tab. 3.

6.1 Multikomponentové vakcíny proti *E. coli*

Výhoda multikomponentových vakcín spočívá v tvorbě protilátek proti více antigenům jednoho patogenu, které kooperují při infekci (Viviani et al., 2022). Multikomponentová vakcína produkovaná v rostlinách tabáku virginského obsahující fúzní LT-B a ST potvrdila schopnost LT-B fungovat jako účinné adjuvans, jelikož ST je za normálních okolností velmi málo imunogenní. Vznikla tak širokospektrální vakcína, která se prokázala jako účinná rovněž proti choleroému toxinu (Rosales-Mendoza et al., 2009; Rosales-Mendoza et al., 2011). Nejprve byla vakcína vytvořena biolistickou metodou a exprimována v chloroplastovém genomu. Hladina protilátek u myši po požití 10 µg rostlinného LT-B byla srovnatelná s hodnotou po požití čistého LT-B (Rosales-Mendoza et al., 2009). Později byla vyrobena transformací bakterií *A. tumefaciens* a exprimována z genomové DNA. Výhodou je posttranslační modifikace a snazší příprava. Pouze 5 µg rostlinného fúzního antigenu stačilo k dosažení stejného efektu jako při expresi v chloroplastovém genomu. Autoři článku tento jev vysvětlovali možností funkce glykosylace jako adjuvans (Rosales-Mendoza et al., 2011).

Proti EHEC byla připravena multikomponentová vakcína v tabáku virginském a v řepce olejce (*Brassica napus* L.), které exprimovaly chimérický protein EIT obsahující části sekvencí pro virulenční faktory EspA, intimin a Tir. Nukleotidová sekvence těchto antigenů byla optimalizována pro tyto rostliny a spojená linkery a na C konec byla přidána sekvence KDEL. Transformace byla zprostředkována bakterií *A. tumefaciens*. U rostlin byla zaznamenána exprese EIT 0,3 % TSP. Imunizace byla prováděna semeny řepky, u kterých byla hladina EIT 10 µg/g suché hmotnosti. První skupina myši byla imunizována injekčně, druhá žaludeční sondou a třetí kombinací těchto strategií. Injekční imunizací byla indukována nejvyšší tvorba IgG a u ostatních skupin byla rovněž významná. V případě tvorby IgA však nebyl u injekční imunizace zaznamenán významný efekt, avšak u dalších dvou skupin byly

titry IgA zvýšené. Po orální infekci *E. coli* byla u všech skupin pozorována stejně úspěšně snížená doba trvání kolonizace a běžná morfologie tlustého a slepého střeva (Amani et al., 2011).

Karimi et al. (2013) vytvořili další multikomponentovou vakcínu proti EHEC v rostlinách tabáku virginského. Rostliny byly upraveny pro expresi chimérického proteinu EIT, který obsahoval virulenční faktory EspA, intimin a Tir, které byly spojené pomocí linkerů a postrádaly část aminokyselinové sekvence. Transgenní rostliny byly připraveny prostřednictvím transformace plastidů. Sekvence pro EIT byla vnesena do plasmidu, jenž byl do listů tabáku virginského dodán biolistickou metodou. Listy byly poté nakrájeny a kultivovány. Úspěšnost imunizace byla také testována na myších, kterým byla podávána dávka 5 µg EIT. Největší titr protilátek IgG proti EIT byl zaznamenán po třetí dávce u injekčně imunizovaných myší, druhý nejvyšší u myší s první injekční dávkou a u myší imunizovaných pouze orálně nejnižší, avšak stále významný. V případě IgA byl efekt opačný, nejvyšší hladina byla zjištěna u orálně imunizovaných myší a u injekčně imunizovaných myší nebyla jejich hodnota signifikantní. Stejný efekt byl pozorován u sIgA, avšak u myší s injekčně podávaným EIT nebyl zaznamenán žádný titr, stejně jako u kontrolních myší. Myši byly poté orálně infikovány EHEC a bylo zkoumáno vylučování bakterií ve stolici. U imunizovaných myší bylo prokázáno zkrácení této doby na 7 až 10 dní, zatímco u neimunizovaných probíhalo i 14 dní po infekci. Po 8 dnech byla provedena histologická analýza střev u obou experimentálních skupin. U imunizované skupiny nebyla zjištěna odchylka od normálního stavu, zatímco u kontrolních myší bylo pozorováno krvavě zbarvené tlusté střevo. Pro výzkum adherence ke střevu byly připraveny histochemické řezy. V epiteliálních buňkách v případě strategie primární injekční a následné orální imunizace nebyly prokázány žádné bakterie, avšak i další imunizační strategie významně snížily kolonizaci epitelu.

6.2 Multivalentní vakcíny proti *E. coli*

Příkladem multivalentní vakcíny je chimérická vakcína proti ETEC a EHEC. Ta byla připravena kombinací sekvence čtyř antigenů pocházejících z těchto kmenů. Insert zvaný SICL byl pro tuto vakcínu vytvořen spojením sekvencí pro 19–89 aminokyselinových zbytků ze StxB, 282 zbytků z C-konce intiminu, 24–170 zbytků z CFB a 22–124 zbytků z LT-B pomocí linkeru s EAAAK repeticemi a byla k nim připojena sekvence KDEL pro transport do endoplasmatického retikula a Kozakova sekvence. Přítomnost insertu v genomové oblasti byla následně ověřena pomocí PCR. Použité rostliny řepky olejky byly transformovány

bakterií *A. tumefaciens* a selektovány na médiu s kanamycinem a s cefotaximem. Úroveň exprese byla studována reverzní transkripcí. Výtěžek rekombinantního proteinu byl odhadnut na 80 µg/g suchého semene. Myši, na kterých byla úspěšnost vakcíny studována, byly rozděleny do několika skupin. První skupina byla imunizována perorálně dávkou 20 µg, druhá skupina dostala perorální dávku čtyřikrát a jednu posilovací subkutánní. Třetí skupina sloužila jako negativní kontrola a byl jí perorálně podáván extrakt ze semen přírodní linie. Po poslední dávce byl stanoven titr protilátek proti SICL IgA ve stolici a IgA a IgG v krevním séru pomocí ELISA. Analýzou bylo zjištěno, že při čtyřech perorálních a jednom subkutánním podání je titr IgG nejvyšší, avšak titr po pětinasobném orálním podání byl rovněž signifikantní. Titry IgA byly v krevním séru i ve stolici v obou případech signifikantní. U negativní kontroly nebyla zaznamenána žádná imunitní odpověď. Účinnost anti-SICL protilátek byla stanovena neutralizačním testem *in vivo*. Neimunizované myši zemřely 4 dny po infekci, zatímco v obou imunizovaných skupinách byla úspěšnost přežití skoro 72 % (Shojaei Jeshvaghani et al., 2019).

6.3 Kombinované vakcíny

Příkladem kombinovaných vakcín je vakcína kombinující antigeny *Vibrio cholerae* (Pacini, 1854), rotaviru a ETEC. V tomto experimentu byla snaha vytvořit univerzální vakcínu obsahující antigeny tří významných původců střevních onemocnění, která se ukázala jako úspěšná. Při přípravě této vakcíny byly vytvořeny dva inserty se sekvencemi antigenů *V. cholerae*, rotaviru a ETEC. První insert pro vakcínu byl připraven spojením sekvence pro podjednotku cholerového toxinu CTB na C konci se sekvencí pro 22 aminokyselinových zbytků epitopu myšího rotavirového enterotoxinu NSP4 a sekvence pro SEKDEL, druhý insert spojením podjednotky CTA na N konci s kolonizačním faktorem kmene ETEC CFA/I a KDEL sekvencí. Rostliny byly transformovány bakterií *A. tumefaciens* a selektovány na médiu s kanamycinem. Tyto inserty byly klonovány do vektoru v opačném směru a pod kontrolou odlišných promotorů a pro jejich expresi byly použity rostliny lilku bramboru. Při testech účinnosti multikomponentové vakcíny na deseti myších byly zaznamenány sérové protilátky IgG proti CFA/I u všech a proti CTB a NSP4 pouze u osmi. Při studii slizniční imunity byl úspěch tvorby protilátek proti všem antigenům zaznamenán pouze u čtyř myší s nižší hodnotou titru než u sérových protilátek. Fúzní protein CTA s CFA/I se spojuje s CTB a vzniká tak oligomer podobný holotoxinu, který je schopen vazby na gangliosidy v membráně enterocytů. Mláďata imunizovaných samic fúzním CTB-NSP4 vykazovala po expozici rotaviru sníženou náchylnost k průjmovému onemocnění. Pomocí průtokové

cytometrie byly sledovány buňky sleziny u imunizovaných myší po poslední imunizaci a ukázalo se, že došlo k významnému zvýšení počtu CD4⁺ paměťových buněk (Yu et Langridge, 2001).

Kombinovaná vakcína byla vytvořena také proti bakteriím *Shigella dysenteriae* (Shiga, 1897) Castellani and Chalmers, 1919, *V. cholerae* a *Bacillus anthracis* (Cohn, 1872) v rostlinách lilku rajčete. Rostliny lilku rajčete byly transformovány agroinfiltrací. Vektor transformovaný do bakterie *A. tumefaciens* byl připraven naklonováním fragmentů genů *ipaD*, který působí jako toxin v případě infekce *S. dysenteriae*, a *PA20* pocházejícího z *B. anthracis* do vektoru již obsahujícího sekvenci pro podjednotku B cholerového toxinu. Expres antigenů v rostlinách byla úspěšná a jejich nejvyšší hladina byla zaznamenána v zelených plodech, a to až čtyřikrát vyšší než v listech a zralých plodech. Zelené plody jsou pro agroinfiltraci účinnější, jelikož v nich dochází k vyšší míře exprese proteinů a může do nich být injikováno větší množství bakterií *A. tumefaciens* než do listů. Pro cílenou expresi ve zralých plodech bylo navrženo použití specifického promotoru pro geny pro syntézu ethylenu. Úspěšnost imunizace touto vakcínou však nebyla testována (Davod et al., 2018).

Kim et al. (2004) vytvořili kombinovanou vakcínu v lilku bramboru proti bakteriím *B. anthracis* a *V. cholerae*. V rostlinách byly exprimovány CTB a letální faktor (LF) *B. anthracis*. Doména I LF byla fúzována s C koncem CTB. Transformace rostlin byla provedena bakterií *A. tumefaciens*. Expres fúzního proteinu tvořila 0,00039 % až 0,0018 % TSP a bylo ukázáno, že při expresi v lilku bramboru dojde k oligomerizaci antigenu. Tato vakcína však nebyla testována.

Další kombinovaná vakcína byla vytvořena proti ETEC a bakteriím *Salmonella typhimurium* (Loeffler, 1892) Castellani and Chalmers, 1919 a *Vibrio parahaemolyticus* (Fujino et al., 1951) Sakazaki et al., 1963. Pro konstrukci insertu nazvaného LTEnteru byly použity pro expresi v rostlinách optimalizované části sekvencí LT-B ETEC jako adjuvans, antigenu ST rovněž pocházející z ETEC, FliC *S. typhimurium* a LptD *V. parahaemolyticus*, které byly propojené GPGP linkerem. Na C konec byla umístěna SEKDEL sekvence. Sekvence byla vnesena do rostlin tabáku virginského infekcí bakterií *A. tumefaciens* a byla testována na myších. Rostliny byly schopny exprimovat 0,029 – 5,29 µg/g antigenu a jejich fenotyp nebyl ovlivněn. Myši byly imunizovány orálně rozemletými pletivy s obsahem 300 ng LTEnteru a některé subkutánně dávkou 70 ng. Proti FliC byly protilátky detekovány až po čtvrté imunizaci, a to pouze IgA při orálním podávání. Proti ostatním antigenům byla zaznamenána

úspěšnost tvorby IgA až po třetí imunizaci a v případě anti-LTB a anti-ST IgG již po druhé dávce (Trujillo et al., 2020).

Trujillo et al. (2023) dále připravili vakcínu exprimující multiepitopový gen ToxAentero, který cílil na CTB *V. cholerae* a obsahoval další antigeny shodné s LTBAentero z předchozí studie. Jako adjuvans byl použit ToxA z *V. parahaemolyticus*. Postup výroby byl obdobný jako u LTBAentero. Transformací bylo získáno 11 linií rezistentních na kanamycin, z nichž u 9 byla zaznamenána amplifikace ToxAentero, u kterých autoři zjistili hladiny exprese 0,8 – 5,46 µg/g. Při orální imunizaci obdržely myši dávku přibližně 275 ng ToxAentero a při injekčním podávání 55 ng. Myši byly rovněž imunizovány orálně a subkutánně. Výsledky obou typů imunizace byly podobné, avšak bylo zjištěno, že při orální imunizaci je titer protilátek proti většině antigenů vyšší. U této vakcíny byly na rozdíl od LTBAentero zaznamenány i anti-FliC po subkutánní imunizaci.

Tab. 3: Přehled rostlinných jedlých multikomponentových, multivalentních a kombinovaných vakcín. Ve sloupci Rostlina je uveden rostlinný druh, ve kterém byla vakcína připravena transformací bakterií *A. tumefaciens* nebo pomocí biolistické metody. V tabulce je také popsán způsob testování, v případě testování na myších je uvedeno, zda bylo zaznamenáno zvýšení hladin protilátek (protilátky) a zda byla prokázána vyšší odolnost myši infekci po imunizaci vakcínou (odolnost).

Autor	Rostlina	Patogen	Antigen	Příprava	Testování
Yu et Langride, 2001	lilek brambor	ETEC, <i>Vibrio cholerae</i> , rotavirus	CTA, CTB, NSP4, CFA/I	<i>A. tumefaciens</i>	myši - protilátky, odolnost
Kim et al., 2004	lilek brambor	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>Bacillus anthracis</i>	LF, CTB	<i>A. tumefaciens</i>	netestováno
Amani et al., 2011	tabák virginský, řepka olejka	EHEC	EspA, intimin, Tir	<i>A. tumefaciens</i>	myši - protilátky, odolnost
Rosales-Mendoza et al., 2011	tabák virginský	ETEC	LT-B, ST	biolistická metoda, <i>A. tumefaciens</i>	myši - protilátky
Karimi et al. 2013	tabák virginský	EHEC	EspA, intimin, Tir	biolistická metoda	myši - protilátky, odolnost
Davod et al., 2018	lilek rajče	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Shigella dysenteriae</i>	ipaD, CTB, PA20	<i>A. tumefaciens</i>	netestováno
Shojaei Jeshvaghani et al., 2019	řepka olejka	ETEC, EHEC	Stx, intimin, CFB, LT-B	<i>A. tumefaciens</i>	myši - protilátky, odolnost
Trujillo et al., 2020	tabák virginský	ETEC, <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	FliC, LptD, LT-B, ST	<i>A. tumefaciens</i>	myši - protilátky
Trujillo et al., 2023	tabák virginský	ETEC, <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	FliC, LptD, LT-B, ST, CTB, ToxA	<i>A. tumefaciens</i>	myši - protilátky

7 Výhody a nevýhody rostlinných jedlých vakcín

Rostlinné jedlé vakcíny mají spoustu výhod oproti konvenčním metodám produkce. Jsou vhodné pro užití i v rozvojových zemích, jelikož obcházejí řadu problémů souvisejících s podáváním konvenčních vakcín v těchto oblastech. Mají totiž potenciál být dlouho skladovatelné a pro jejich uchování není potřeba skladování v chladu. U lyofilizovaných transgenních listů salátu bylo prokázáno, že za pokojové teploty zůstával antigen LT-B ve stejném množství i po roce skladování (Martínez-González et al., 2011). Rovněž v případě CTB v semenech rýže zůstávalo jeho množství neměnné, a to i po 1,5 roce skladování. I po této době dokázala vakcína navodit srovnatelnou imunitní reakci jako u čerstvých semen. U čistého CTB nebyla stabilita prokázána (Nochi et al., 2007). Dalším důležitým aspektem je

cena, přičemž produkce v rostlinách je ve srovnání s produkcí antigenů jinými metodami levější. To se odvíjí od toho, že pěstování rostlin není tolik nákladné a není pro něj potřeba speciálních technologií. I samotná aplikace vakcín není tak složitá, protože není nutné používat jehly. Příprava jedlých vakcín je jednodušší, jelikož není potřeba z rostlin antigen purifikovat a pacientům lze podávat části rostlin, které nebyly nijak zpracované, nebo byly upraveny velmi jednoduše technologiemi pro potravinářský průmysl, například lyofilizací (Ma et al., 2005). Imunizace rostlinnými vakcínami je ve srovnání s vakcínami připravenými v savčích buňkách rovněž bezpečná, jelikož rostliny nejsou infikovatelné lidskými patogeny (Yusibov et Rabindran, 2008). Výhodou je také možnost rychlého a rozsáhlého namnožení rostlinné biomasy a zisku velkého množství osiva. Toho může být dosaženo použitím pylu transgenních rostlin nebo křížením s rostlinami přírodní linie (Streatfield et al., 2001).

Existuje však také řada nedostatků, které znemožňují snadný rozvoj a uvedení vakcín do praxe. Podstatnou nevýhodou rostlinných vakcín je současný přístup ke geneticky modifikovaným organismům (GMO), čímž je pěstování transgenních rostlin značně regulováno a znemožňuje jejich aplikaci v řadě zemí. Nicméně přístup rozvojových zemí ke GMO rostlinám je mnohem benevolentnější. Pěstování GMO je hojně rozšířené například v Brazílii, v Jihoafrické republice nebo v Súdánu (Sinebo et Maredia, 2016). Pěstování transgenních rostlin může mít negativní vliv na přírodní populace, jelikož potenciálním problémem je únik rostlin z kontrolovaných stanovišť a možnost toku genů opylením rostlin přírodní linie pylem geneticky modifikovaných rostlin. Tento problém však neplatí pro rostliny s transformovaným plastidovým genomem, jelikož plastidy se dědí u většiny rostlin pouze v mateřské linii (Corriveau et Coleman, 1998).

Dalším problémem je také možnost vyvolání alergické reakce nebo orální tolerance na antigen. S tím souvisí další problém, kterým je dávkování, jelikož, jak bylo již zmíněno v Kap. 3, orální tolerance závisí na dávce antigenu. Pokud by byl pacientům podáván přímo rostlinný materiál bez úpravy, nebylo by možné zaručit dodání požadované vakcinační dávky, je tedy potřeba, aby byly stanovovány koncentrace antigenů (Kirk et al., 2005). Ne všechny rostliny jsou vhodné pro tvorbu jedlých vakcín, například v případě bramborových hlíz je nutné, aby byly konzumovány syrové, jelikož při varu by došlo k denaturaci antigenu. Rostliny tabáku virginského rovněž nejsou vhodné, jelikož obsahují alkaloidy. Ačkoliv jsou pro výrobu nejatraktivnější běžně konzumované plodiny, například rajčata, jejich použití je omezeno trvanlivostí. Pokud bychom chtěli vakcíny dlouhodobě skladovat, je vhodnější použít pro imunizaci semena.

Ačkoliv lze u rostlinných jedlých vakcín najít spoustu výhod oproti jiným způsobům přípravy vakcín, zejména tedy rychlost výroby, nízkou cenu a snadnou aplikovatelnost, mají také řadu nevýhod, zejména omezení regulacemi GMO a riziko orální tolerance, které omezují pokrok v jejich testování a následnému užívání.

8 Současný vývoj a budoucnost

V současné době je vyvinuta řada rostlinných vakcín, ale většina z nich prošla pouze testováním na myších. Jak bylo zmíněno v Kap. 4.2, jenom dvě jedlé vakcíny proti těmto kmenům byly testovány klinicky, přičemž prošly pouze první fází. Žádná jiná dosud vyrobená orální vakcína nebyla testována ve druhé fázi (Shah et al., 2022). To je pravděpodobně způsobeno nedostatky tohoto způsobu vakcinace, které jsou zmíněny v Kap. 7.

Ačkoliv k případné aplikaci rostlinných jedlých vakcín vede ještě dlouhá cesta, rostliny jsou slibnou skupinou ve využití pro „biofarming“. Tato technologie nezahrnuje pouze výrobu rostlinných jedlých vakcín, ale veškerou produkci proteinů pro farmaceutické účely v transgenních rostlinách. V současné době lze zaznamenat vývoj injekčně podávaných vakcín produkovaných v rostlinách. U tohoto typu vakcín byla již připravena vakcína, která prošla i třetí fází klinických testů. Jedná se o kvadrivalentní vakcínu proti viru chřipky, která byla vyrobena v rostlinách tabáku Benthamova (Ward et al., 2021). Z toho lze usuzovat, že tyto vakcíny by mohly nahradit koncept jedlých vakcín díky eliminaci jejich podstatného nedostatku, který představuje dávkování a s ním spojené riziko orální tolerance. U injekčně podávaných rostlinných vakcín je zaručena kontrola nad dávkou antigenu a jejich produkce je stejně jako u jedlých vakcín rychlá a levná a nehrozí kontaminace lidskými patogeny. Ještě větší pokrok byl zaznamenán u vývoje léčiv pro genetická onemocnění. Příkladem je enzym taligluceráza alfa pod názvem ELELYSO™ produkovaný v rostlinách mrkve (*Daucus carota* L.), který byl již v roce 2012 schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) k použití pro léčbu Gaucherovy choroby 1. typu (Elelyso® (taliglucerase alfa) for injection).

V blízké budoucnosti tedy nejspíše nelze očekávat schválení rostlinných jedlých vakcín pro užívání, avšak lze očekávat klinické testování vyvinutých vakcín pro injekční podávání a přípravu dalších léčiv. Rovněž lze předpokládat, že nedojde k povolení jejich pěstování z důvodu regulací GMO, nicméně slibnou možností je výroba konvenčních injekčně podávaných vakcín v rostlinných buněčných kulturách.

9 Závěr

Cílem této práce bylo vypracovat literární rešerši na téma Rostlinné jedlé vakcíny proti lidským gastrointestinálním onemocněním způsobeným *E. coli* a *V. cholerae*. Koncept rostlinných jedlých vakcín představuje naději pro rozvojové země, jelikož tyto vakcíny mohou mít při vhodném výběru rostlinného druhu dlouhou dobu trvanlivosti, jsou levné a jejich výroba a aplikace je jednoduchá.

Pro výrobu rostlinných vakcín popisovaných v této práci byl nejčastěji používán tabák virginský a lilek brambor, dále lilek rajče, rýže, kukuřice, sója, řepka olejka a tabák Benthamův. Pro přípravu většiny vakcín byla použita syntetická sekvence upravená pro expresi v rostlinách. Všechny vakcíny byly vyrobené transformací bakteriemi rodu *Agrobacterium* nebo biolistickou metodou, kterou došlo ke vnesení sekvence do plastidové DNA. V chloroplastech byla zaznamenána vyšší exprese antigenu, což je dáno větším počtem kopií sekvence na buňku.

Vakcíny proti *E. coli* byly cíleny na řadu antigenů, nejčastěji na LT-B a dále na ST, YncE, CF u ETEC, EspA, Tir, Stx a intimin. Většina vakcín byla úspěšně testována na myších a dvě vakcíny proti LT-B antigenu prošly I. fází klinického testování. V případě *V. cholerae* byly vakcíny cíleny pouze na antigen CTB. Většina vakcín byla rovněž testována na myších a dvě na makacích. Všechny testované vakcíny dokázaly navodit imunitní odpověď. Žádná vakcína proti *V. cholerae* nebyla klinicky testována. Řada studií prokázala, že LT-B a CTB mohou účinkovat jako adjuvans při orální imunizaci proti různým onemocněním. Lze také vzájemně fúzovat více sekvencí pro různé antigeny, a to i ze vzdálených organismů, což vede ke vzniku širokospektrálních multikomponentových, multivalentních nebo kombinovaných vakcín. Kombinované vakcíny popisované v této práci byly vytvořeny až proti čtyřem bakteriím způsobujícím průjmová onemocnění. Většina těchto vakcín byla testována pouze na myších. Imunizace všemi testovanými vakcínami se ukázala jako účinná.

I přes úspěšnou přípravu a testování na myších, primátech i v klinických studiích na lidech není stále žádná rostlinná orální vakcína schválená pro použití. Jedlé vakcíny proti *E. coli* byly testovány na lidech pouze dvakrát, a to naposledy v roce 2004. Důvodem pro stagnaci klinického testování jsou zejména regulace pro GMO a jejich negativní vnímání ze strany veřejnosti a také variabilita dávky antigenu v rostlinném materiálu, která může způsobit riziko orální tolerance nebo naopak nedostatečné imunizace. Nicméně rostliny představují pro farmaceutický průmysl velký potenciál, jelikož by do budoucna mohly sloužit k výrobě

injekčně aplikovaných vakcín, u nichž je klinické testování pokročilejší. Rovněž jsou rostliny slibnou skupinou pro výrobu dalších terapeutik. Tato léčiva mohou být produkována v rostlinných buněčných kulturách v bioreaktorech, čímž lze obejít riziko pěstování GMO.

10 Seznam použité literatury

Amani, J.; Mousavi, S. L.; Rafati, S.; Salmanian, A. H. Immunogenicity of a Plant-Derived Edible Chimeric EspA, Intimin and Tir of *Escherichia Coli* O157:H7 in Mice. *Plant Science* **2011**, *180* (4), 620–627. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.01.004>.

Arakawa, T.; Chong, D. K. X.; Lawrence Merritt, J.; Langride, W. H. R. Expression of Cholera Toxin B Subunit Oligomers in Transgenic Potato Plants. *Transgenic Research* **1997**, *6* (6), 403–413. <https://doi.org/10.1023/A:1018487401810>.

Baba-Dikwa, A.; Thompson, D.; Spencer, N. J.; Andrews, S. C.; Watson, K. A. Overproduction, Purification and Preliminary X-ray Diffraction Analysis of YncE, an Iron-Regulated Sec-Dependent Periplasmic Protein from *Escherichia Coli*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications* **2008**, *64* (Pt 10), 966–969. <https://doi.org/10.1107/S1744309108029515>.

Brayden, D. J.; Jepson, M. A.; Baird, A. W. Keynote Review: Intestinal Peyer's Patch M Cells and Oral Vaccine Targeting. *Drug Discovery Today* **2005**, *10* (17), 1145–1157. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03536-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03536-1).

Carton, J. M.; Sauerwald, T.; Hawley-Nelson, P.; Morse, B.; Peffer, N.; Beck, H.; Lu, J.; Cotty, A.; Amegadzie, B.; Sweet, R. Codon Engineering for Improved Antibody Expression in Mammalian Cells. *Protein Expression and Purification* **2007**, *55* (2), 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.05.017>.

Chan, H.-T.; Daniell, H. Plant-Made Oral Vaccines against Human Infectious Diseases—Are We There Yet? *Plant Biotechnology Journal* **2015**, *13* (8), 1056–1070. <https://doi.org/10.1111/pbi.12471>.

Chapman, S.; Kavanagh, T.; Baulcombe, D. Potato Virus X as a Vector for Gene Expression in Plants. *The Plant Journal* **1992**, *2* (4), 549–557. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1992.t01-24-00999.x>.

Chilton, M.-D.; Drummond, M. H.; Merlo, D. J.; Sciaky, D.; Montoya, A. L.; Gordon, M. P.; Nester, E. W. Stable Incorporation of Plasmid DNA into Higher Plant Cells: The Molecular Basis of Crown Gall Tumorigenesis. *Cell* **1977**, *11* (2), 263–271. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90043-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90043-5).

- Corriveau, J. L.; Coleman, A. W. Rapid Screening Method to Detect Potential Biparental Inheritance of Plastid Dna and Results for Over 200 Angiosperm Species. *American Journal of Botany* **1988**, 75 (10), 1443–1458. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1988.tb11219.x>.
- Daniell, H.; Kulis, M.; Herzog, R. W. Plant Cell-Made Protein Antigens for Induction of Oral Tolerance. *Biotechnology Advances* **2019**, 37 (7), 107413. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.06.012>.
- Das, A. DNA Transfer from Agrobacterium to Plant Cells in Crown Gall Tumor Disease. In *Plant-Microbe Interactions*; Biswas, B. B., Das, H. K., Eds.; Springer US: Boston, MA, **1998**; pp 343–363. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1707-2_11.
- Davod, J.; Fatemeh, D. N.; Honari, H.; Hosseini, R. Constructing and Transient Expression of a Gene Cassette Containing Edible Vaccine Elements and Shigellosis, Anthrax and Cholera Recombinant Antigens in Tomato. *Molecular Biology Reports* **2018**, 45 (6), 2237–2246. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4385-3>.
- De Cleene, M.; De Ley, J. The Host Range of Crown Gall. *The Botanical Review* **1976**, 42 (4), 389–466. <https://doi.org/10.1007/BF02860827>.
- De Cosa, B.; Moar, W.; Lee, S.-B.; Miller, M.; Daniell, H. Overexpression of the Bt cry2Aa2 Operon in Chloroplasts Leads to Formation of Insecticidal Crystals. *Nature Biotechnology* **2001**, 19 (1), 71–74. <https://doi.org/10.1038/83559>.
- Ellis, R. W.; Brown, K. R. Combination Vaccines. In *Advances in Pharmacology*; August, J. T., Anders, M. W., Murad, F., Coyle, J., Eds.; Academic Press **1997**; Vol. 39, pp 393–423. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60077-0](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60077-0).
- Fatemeh, M. L.; Amani, J.; Motamedi, M. J.; Kazemi, R.; Shahriari Ahmadi, F. The Immunogenicity of a YncE Antigen from E. Coli Enterotoxigenic (ETEC) by Edible Delivery of Transgenic Hairy Roots Tobacco. *Journal of Applied Biotechnology Reports* **2022**, 9 (4), 856–863. <https://doi.org/10.30491/jabr.2021.248555.1285>.
- Flint, H. J.; Scott, K. P.; Duncan, S. H.; Louis, P.; Forano, E. Microbial Degradation of Complex Carbohydrates in the Gut. *Gut Microbes* **2012**, 3 (4), 289–306. <https://doi.org/10.4161/gmic.19897>.

Gaastra, W.; Svennerholm, A.-M. Kolonizační Faktory Lidské Enterotoxigenní *Escherichia Coli* (ETEC). *Trends in Microbiology* **1996**, *4* (11), 444–452. [https://doi.org/10.1016/0966-842X\(96\)10068-8](https://doi.org/10.1016/0966-842X(96)10068-8).

Hamorsky, K. T.; Kouokam, J. C.; Bennett, L. J.; Baldauf, K. J.; Kajiura, H.; Fujiyama, K.; Matoba, N. Rapid and Scalable Plant-Based Production of a Cholera Toxin B Subunit Variant to Aid in Mass Vaccination against Cholera Outbreaks. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **2013**, *7* (3), e2046. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002046>.

Haq, T. A.; Mason, H. S.; Clements, J. D.; Arntzen, C. J. Oral Immunization with a Recombinant Bacterial Antigen Produced in Transgenic Plants. *Science* **1995**, *268* (5211), 714–716. <https://doi.org/10.1126/science.7732379>.

Holmgren, J.; Lönnroth, I.; Svennerholm, L. Tissue Receptor for Cholera Exotoxin: Postulated Structure from Studies with GM1 Ganglioside and Related Glycolipids. *Infection and Immunity* **1973**, *8* (2), 208–214.

Ishigame, H.; Kakuta, S.; Nagai, T.; Kadoki, M.; Nambu, A.; Komiyama, Y.; Fujikado, N.; Tanahashi, Y.; Akitsu, A.; Kotaki, H.; Sudo, K.; Nakae, S.; Sasakawa, C.; Iwakura, Y. Differential Roles of Interleukin-17A and -17F in Host Defense against Mucoepithelial Bacterial Infection and Allergic Responses. *Immunity* **2009**, *30* (1), 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.009>.

Iwasaki, A.; Kelsall, B. L. Freshly Isolated Peyer's Patch, but Not Spleen, Dendritic Cells Produce Interleukin 10 and Induce the Differentiation of T Helper Type 2 Cells. *Journal of Experimental Medicine* **1999**, *190* (2), 229–240.

Jani, D.; Meena, L. S.; Rizwan-ul-Haq, Q. M.; Singh, Y.; Sharma, A. K.; Tyagi, A. K. Expression of Cholera Toxin B Subunit in Transgenic Tomato Plants. *Transgenic Research* **2002**, *11* (5), 447–454. <https://doi.org/10.1023/A:1020336332392>.

Jani, D.; Singh, N. K.; Bhattacharya, S.; Meena, L. S.; Singh, Y.; Upadhyay, S. N.; Sharma, A. K.; Tyagi, A. K. Studies on the Immunogenic Potential of Plant-Expressed Cholera Toxin B Subunit. *Plant Cell Reports* **2004**, *22* (7), 471–477. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0711-9>.

Jiang, X.-L.; He, Z.-M.; Peng, Z.-Q.; Qi, Y.; Chen, Q.; Yu, S.-Y. Cholera Toxin B Protein in Transgenic Tomato Fruit Induces Systemic Immune Response in Mice. *Transgenic Research* **2007**, *16* (2), 169–175. <https://doi.org/10.1007/s11248-006-9023-5>.

- Judge, N. A.; Mason, H. S.; O'Brien, A. D. Plant Cell-Based Intimin Vaccine Given Orally to Mice Primed with Intimin Reduces Time of Escherichia Coli O157:H7 Shedding in Feces. *Infection and Immunity* **2004**, *72* (1), 168–175. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.168-175.2004>.
- Kang, T.-J.; Loc, N.-H.; Jang, M.-O.; Jang, Y.-S.; Kim, Y.-S.; Seo, J.-E.; Yang, M.-S. Expression of the B Subunit of E. Coli Heat-Labile Enterotoxin in the Chloroplasts of Plants and Its Characterization. *Transgenic Research* **2003**, *12* (6), 683–691. <https://doi.org/10.1023/B:TRAG.0000005114.23991.bc>.
- Kang, T.-J.; Han, S.-C.; Kim, M.-Y.; Kim, Y.-S.; Yang, M.-S. Expression of Non-Toxic Mutant of *Escherichia Coli* Heat-Labile Enterotoxin in Tobacco Chloroplasts. *Protein Expression and Purification* **2004**, *38* (1), 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.08.002>.
- Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Mobley, H. L. T. Pathogenic Escherichia Coli. *Nature Reviews Microbiology* **2004**, *2* (2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>.
- Karaman, S.; Cunnick, J.; Wang, K. Expression of the Cholera Toxin B Subunit (CT-B) in Maize Seeds and a Combined Mucosal Treatment against Cholera and Traveler's Diarrhea. *Plant Cell Reports* **2012**, *31* (3), 527–537. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1146-3>.
- Karasev, A. V.; Foulke, S.; Wellens, C.; Rich, A.; Shon, K. J.; Zwierzynski, I.; Hone, D.; Koprowski, H.; Reitz, M. Plant Based HIV-1 Vaccine Candidate: Tat Protein Produced in Spinach. *Vaccine* **2005**, *23* (15), 1875–1880. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.11.021>.
- Karimi, F.; Mousavi, A.; Salmanian, A. H.; Alizadeh, H.; Rafati, S. Immunogenicity of EIT Chimeric Protein Expressed in Transplastomic Tobacco Plants towards Development of an Oral Vaccine against Escherichia Coli O157:H7. *Plant Biotechnology Reports* **2013**, *7* (4), 535–546. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0296-x>.
- Kenny, B.; DeVinney, R.; Stein, M.; Reinscheid, D. J.; Frey, E. A.; Finlay, B. B. Enteropathogenic E. Coli (EPEC) Transfers Its Receptor for Intimate Adherence into Mammalian Cells. *Cell* **1997**, *91* (4), 511–520. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80437-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80437-7).
- Kim, T.-G.; Galloway, D. R.; Langridge, W. H. R. Synthesis and Assembly of Anthrax Lethal Factor-Cholera Toxin B-Subunit Fusion Protein in Transgenic Potato. *Molecular Biotechnology* **2004**, *28* (3), 175–183. <https://doi.org/10.1385/MB:28:3:175>.

Kim, T.-G.; Kim, B.-G.; Kim, M.-Y.; Choi, J.-K.; Jung, E.-S.; Yang, M.-S. Expression and Immunogenicity of Enterotoxigenic Escherichia Coli Heat-Labile Toxin B Subunit in Transgenic Rice Callus. *Molecular Biotechnology* **2010**, *44* (1), 14–21. <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9200-x>.

Kirk, D. D.; McIntosh, K.; Walmsley, A. M.; Peterson, R. K. D. Risk Analysis for Plant-Made Vaccines. *Transgenic Research* **2005**, *14* (4), 449–462. <https://doi.org/10.1007/s11248-005-5697-3>.

Knutton, S.; Rosenshine, I.; Pallen, M. J.; Nisan, I.; Neves, B. C.; Bain, C.; Wolff, C.; Dougan, G.; Frankel, G. A Novel EspA-associated Surface Organelle of Enteropathogenic Escherichia Coli Involved in Protein Translocation into Epithelial Cells. *The EMBO Journal* **1998**, *17* (8), 2166–2176. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.8.2166>.

Kostrzak, A.; Cervantes Gonzalez, M.; Guetard, D.; Nagaraju, D. B.; Wain-Hobson, S.; Tepfer, D.; Pniewski, T.; Sala, M. Oral Administration of Low Doses of Plant-Based HBsAg Induced Antigen-Specific IgAs and IgGs in Mice, without Increasing Levels of Regulatory T Cells. *Vaccine* **2009**, *27* (35), 4798–4807. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.05.092>.

Kwong, K. W.-Y.; Xin, Y.; Lai, N. C.-Y.; Sung, J. C.-C.; Wu, K.-C.; Hamied, Y. K.; Sze, E. T.-P.; Lam, D. M.-K. Oral Vaccines: A Better Future of Immunization. *Vaccines* **2023**, *11* (7), 1232. <https://doi.org/10.3390/vaccines11071232>.

Lauterslager, T. G. M.; Florack, D. E. A.; van der Wal, T. J.; Molthoff, J. W.; Langeveld, J. P. M.; Bosch, D.; Boersma, W. J. A.; Hilgers, L. A. T. Oral Immunisation of Naive and Primed Animals with Transgenic Potato Tubers Expressing LT-B. *Vaccine* **2001**, *19* (17), 2749–2755. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00513-2](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00513-2).

Liu, L.; Cañizares, M. C.; Monger, W.; Perrin, Y.; Tsakiris, E.; Porta, C.; Shariat, N.; Nicholson, L.; Lomonosoff, G. P. Cowpea Mosaic Virus-Based Systems for the Production of Antigens and Antibodies in Plants. *Vaccine* **2005**, *23* (15), 1788–1792. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.11.006>.

Lycke, N.; Holmgren, J. Strong Adjuvant Properties of Cholera Toxin on Gut Mucosal Immune Responses to Orally Presented Antigens. *Immunology* **1986**, *59* (2), 301–308.

Lycke, N.; Erlandsson, L.; Ekman, L.; Schön, K.; Leanderson, T. Lack of J Chain Inhibits the Transport of Gut IgA and Abrogates the Development of Intestinal Antitoxic Protection¹. *The Journal of Immunology* **1999**, *163* (2), 913–919. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.163.2.913>.

Ma, J. K.-C.; Barros, E.; Bock, R.; Christou, P.; Dale, P. J.; Dix, P. J.; Fischer, R.; Irwin, J.; Mahoney, R.; Pezzotti, M.; Schillberg, S.; Sparrow, P.; Stoger, E.; Twyman, R. M. Molecular Farming for New Drugs and Vaccines. *EMBO Reports* **2005**, *6* (7), 593–599. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400470>.

Mantis, N. J.; Rol, N.; Corthésy, B. Secretory IgA's Complex Roles in Immunity and Mucosal Homeostasis in the Gut. *Mucosal Immunology* **2011**, *4* (6), 603–611. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.41>.

Martínez-González, L.; Rosales-Mendoza, S.; Soria-Guerra, R. E.; Moreno-Fierros, L.; López-Revilla, R.; Korban, S. S.; Guevara-Arauza, J. C.; Alpuche-Solís, Á. G. Oral Immunization with a Lettuce-Derived Escherichia Coli Heat-Labile Toxin B Subunit Induces Neutralizing Antibodies in Mice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **2011**, *107* (3), 441–449. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9994-7>

Mason, H. S.; Haq, T. A.; Clements, J. D.; Arntzen, C. J. Edible Vaccine Protects Mice against Escherichia Coli Heat-Labile Enterotoxin (LT): Potatoes Expressing a Synthetic LT-B Gene. *Vaccine* **1998**, *16* (13), 1336–1343. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(98\)80020-0](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(98)80020-0).

McGarvey, P. B.; Hammond, J.; Dienelt, M. M.; Hooper, D. C.; Fu, Z. F.; Dietzschold, B.; Koprowski, H.; Michaels, F. H. Expression of the Rabies Virus Glycoprotein in Transgenic Tomatoes. *Nature Biotechnology* **1995**, *13* (12), 1484–1487. <https://doi.org/10.1038/nbt1295-1484>.

Melnick, J. L. Live Attenuated Oral Poliovirus Vaccine. *Reviews of Infectious Diseases* **1984**, *6*, S323–S327.

Molina, A.; Hervás-Stubbs, S.; Daniell, H.; Mingo-Castel, A. M.; Veramendi, J. High-Yield Expression of a Viral Peptide Animal Vaccine in Transgenic Tobacco Chloroplasts. *Plant Biotechnology Journal* **2004**, *2* (2), 141–153. <https://doi.org/10.1046/j.1467-7652.2004.00057.x>.

Montoya, A. L.; Chilton, M. D.; Gordon, M. P.; Sciaky, D.; Nester, E. W. Octopine and Nopaline Metabolism in Agrobacterium Tumefaciens and Crown Gall Tumor Cells: Role of Plasmid Genes. *Journal of Bacteriology* **1977**, *129* (1), 101–107.

Moravec, T.; Schmidt, M. A.; Herman, E. M.; Woodford-Thomas, T. Production of Escherichia Coli Heat Labile Toxin (LT) B Subunit in Soybean Seed and Analysis of Its

Immunogenicity as an Oral Vaccine. *Vaccine* **2007**, *25* (9), 1647–1657. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.010>.

Neutra, M. R.; Frey, A.; Kraehenbuhl, J.-P. Epithelial M Cells: Gateways for Mucosal Infection and Immunization. *Cell* **1996**, *86* (3), 345–348. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80106-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80106-3).

Nochi, T.; Takagi, H.; Yuki, Y.; Yang, L.; Masumura, T.; Mejima, M.; Nakanishi, U.; Matsumura, A.; Uozumi, A.; Hiroi, T.; Morita, S.; Tanaka, K.; Takaiwa, F.; Kiyono, H. Rice-Based Mucosal Vaccine as a Global Strategy for Cold-Chain- and Needle-Free Vaccination. *Proceedings of the National Academy of Science* **2007**, *104* (26), 10986–10991. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703766104>.

Nochi, T.; Yuki, Y.; Katakai, Y.; Shibata, H.; Tokuhara, D.; Mejima, M.; Kurokawa, S.; Takahashi, Y.; Nakanishi, U.; Ono, F.; Mimuro, H.; Sasakawa, C.; Takaiwa, F.; Terao, K.; Kiyono, H. A Rice-Based Oral Cholera Vaccine Induces Macaque-Specific Systemic Neutralizing Antibodies but Does Not Influence Pre-Existing Intestinal Immunity¹. *The Journal of Immunology* **2009**, *183* (10), 6538–6544. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901480>.

Oszvald, M.; Kang, T.-J.; Tomoskozi, S.; Jenes, B.; Kim, T.-G.; Cha, Y.-S.; Tamas, L.; Yang, M.-S. Expression of Cholera Toxin B Subunit in Transgenic Rice Endosperm. *Molecular Biotechnology* **2008**, *40* (3), 261–268. <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9083-2>.

Peters, P. J.; Borst, J.; Oorschot, V.; Fukuda, M.; Krähenbühl, O.; Tschopp, J.; Slot, J. W.; Geuze, H. J. Cytotoxic T Lymphocyte Granules Are Secretory Lysosomes, Containing Both Perforin and Granzymes. *Journal of Experimental Medicine* **1991**, *173* (5), 1099–1109. <https://doi.org/10.1084/jem.173.5.1099>.

Pontes, D.; Azevedo, M.; Innocentin, S.; Blugeon, S.; Lefèvre, F.; Azevedo, V.; Miyoshi, A.; Courtin, P.; Chapot-Chartier, M.-P.; Langella, P.; Chatel, J.-M. Immune Response Elicited by DNA Vaccination Using *Lactococcus lactis* Is Modified by the Production of Surface Exposed Pathogenic Protein. *PLOS One* **2014**, *9* (1), e84509. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084509>.

Post, L. E.; Nomura, M. DNA Sequences from the Str Operon of *Escherichia Coli*. *Journal of Biological Chemistry* **1980**, *255* (10), 4660–4666. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)85545-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)85545-X).

- Rosales-Mendoza, S.; Alpuche-Solís, Á. G.; Soria-Guerra, R. E.; Moreno-Fierros, L.; Martínez-González, L.; Herrera-Díaz, A.; Korban, S. S. Expression of an Escherichia Coli Antigenic Fusion Protein Comprising the Heat Labile Toxin B Subunit and the Heat Stable Toxin, and Its Assembly as a Functional Oligomer in Transplastomic Tobacco Plants. *The Plant Journal* **2009**, *57* (1), 45–54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03666.x>.
- Rosales-Mendoza, S.; Soria-Guerra, R. E.; Moreno-Fierros, L.; Govea-Alonso, D. O.; Herrera-Díaz, A.; Korban, S. S.; Alpuche-Solís, Á. G. Immunogenicity of Nuclear-Encoded LTB:ST Fusion Protein from Escherichia Coli Expressed in Tobacco Plants. *Plant Cell Reports* **2011**, *30* (6), 1145–1152. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1023-0>.
- Rosales-Mendoza, S.; Salazar-González, J. A. Immunological Aspects of Using Plant Cells as Delivery Vehicles for Oral Vaccines. *Expert Review of Vaccines* **2014**, *13* (6), 737–749. <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.913483>.
- Sandvig, K.; van Deurs, B. Endocytosis, Intracellular Transport, and Cytotoxic Action of Shiga Toxin and Ricin. *Physiological Reviews* **1996**, *76* (4), 949–966. <https://doi.org/10.1152/physrev.1996.76.4.949>.
- Sanford, J. C. Biolistic Plant Transformation. *Physiologia Plantarum* **1990**, *79* (1), 206–209. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1990.tb05888.x>.
- Sasou, A.; Yuki, Y.; Honma, A.; Sugiura, K.; Kashima, K.; Kozuka-Hata, H.; Nojima, M.; Oyama, M.; Kurokawa, S.; Maruyama, S.; Kuroda, M.; Tanoue, S.; Takamatsu, N.; Fujihashi, K.; Goto, E.; Kiyono, H. Comparative Whole-Genome and Proteomics Analyses of the next Seed Bank and the Original Master Seed Bank of MucoRice-CTB 51A Line, a Rice-Based Oral Cholera Vaccine. *BMC Genomics* **2021**, *22* (1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07355-7>.
- Saul, A.; Fay, M. P. Human Immunity and the Design of Multi-Component, Single Target Vaccines. *PLOS One* **2007**, *2* (9), e850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000850>.
- Sato, T.; Shimonishi, Y. Structural Features of Escherichia Coli Heat-Stable Enterotoxin That Activates Membrane-Associated Guanylyl Cyclase. *The Journal of Peptide Research* **2004**, *63* (3), 200–206. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.2004.00125.x>.
- Shah, V. V.; Prajapati, R. A.; Shah, S. P.; Patel, S. R.; Patel, H. P. A Comprehensive Review on Edible Vaccine. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* **2022**, *12* (2-S), 192–201. <https://doi.org/10.22270/jddt.v12i2-S.5293>.

Sheikh, A.; Tumala, B.; Vickers, T. J.; Martin, J. C.; Rosa, B. A.; Sabui, S.; Basu, S.; Simoes, R. D.; Mitreva, M.; Storer, C.; Tyksen, E.; Head, R. D.; Beatty, W.; Said, H. M.; Fleckenstein, J. M. Enterotoxigenic Escherichia Coli Heat-Labile Toxin Drives Enteropathic Changes in Small Intestinal Epithelia. *Nature Communications* **2022**, *13* (1), 6886. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34687-7>.

Shojaei Jeshvaghani, F.; Amani, J.; Kazemi, R.; Karimi Rahjerdi, A.; Jafari, M.; Abbasi, S.; Salmanian, A. H. Oral Immunization with a Plant-Derived Chimeric Protein in Mice: Toward the Development of a Multipotent Edible Vaccine against *E. Coli* O157: H7 and ETEC. *Immunobiology* **2019**, *224* (2), 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2018.12.001>.

Silvey, K. J.; Hutchings, A. B.; Vajdy, M.; Petzke, M. M.; Neutra, M. R. Role of Immunoglobulin A in Protection against Reovirus Entry into Murine Peyer's Patches. *Journal of Virology* **2001**, *75* (22), 10870–10879. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.22.10870-10879.2001>.

Sinebo, W.; Maredia, K. Innovative Farmers and Regulatory Gatekeepers: Genetically Modified Crops Regulation and Adoption in Developing Countries. *GM Crops & Food* **2016**, *7* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/21645698.2016.1151989>.

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. Plant-Based Vaccines: Unique Advantages. *Vaccine* **2001**, *19* (17), 2742–2748. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00512-0](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00512-0).

Streatfield, S. J.; Howard, J. A. Plant-Based Vaccines. *International Journal for Parasitology* **2003**, *33* (5), 479–493. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00052-3).

Su, Y.-L.; Larzábal, M.; Song, H.; Cheng, T.; Wang, Y.; Smith, L. Y.; Cataldi, A. A.; Ow, D. W. Enterohemorrhagic Escherichia Coli O157:H7 Antigens Produced in Transgenic Lettuce Effective as an Oral Vaccine in Mice. *Theoretical and Applied Genetics* **2023**, *136* (10), 214. <https://doi.org/10.1007/s00122-023-04460-5>.

Suleiman, A. A.; Ibrahim, K. M.; Al-Shaibani, A. B. Production of Lettuce Edible Vaccine for Cholera Disease Using Chloroplast Genetic Engineering. *Journal of University of Anbar for Pure Science* **2013**, *7* (1), 20–27. <https://doi.org/10.37652/juaps.2013.83114>.

Sun, J. B.; Holmgren, J.; Czerkinsky, C. Cholera Toxin B Subunit: An Efficient Transmucosal Carrier-Delivery System for Induction of Peripheral Immunological Tolerance. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences **1994**, *91* (23), 10795–10799. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.23.10795>.

Suzuki, H.; Sekine, S.; Kataoka, K.; Pascual, D. W.; Maddaloni, M.; Kobayashi, R.; Fujihashi, K.; Kozono, H.; McGhee, J. R.; Fujihashi, K. Ovalbumin-Protein Σ 1 M Cell Targeting Facilitates Oral Tolerance with Reduction of Antigen-Specific CD4⁺ T Cells. *Gastroenterology* **2008**, *135* (3), 917–925. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.037>.

Tacket, C. O.; Mason, H. S.; Losonsky, G.; Clements, J. D.; Levine, M. M.; Arntzen, C. J. Immunogenicity in Humans of a Recombinant Bacterial Antigen Delivered in a Transgenic Potato. *Nature Medicine* **1998**, *4* (5), 607–609. <https://doi.org/10.1038/nm0598-607>.

Tacket, C. O.; Pasetti, M. F.; Edelman, R.; Howard, J. A.; Streatfield, S. Immunogenicity of Recombinant LT-B Delivered Orally to Humans in Transgenic Corn. *Vaccine* **2004**, *22* (31), 4385–4389. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.01.073>.

Trujillo, E.; Rosales-Mendoza, S.; Angulo, C. A Multi-Epitope Plant-Made Chimeric Protein (LTBentero) Targeting Common Enteric Pathogens Is Immunogenic in Mice. *Plant Molecular Biology* **2020**, *102* (1), 159–169. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00938-3>.

Trujillo, E.; Govea-Alonso, D. O.; Romero-Maldonado, A.; Angulo, C.; Rosales-Mendoza, S. Production and Immunogenicity Assessment of a ToxA-Based Multiepitope Plant-Made Protein Targeting Enteric Pathogens. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **2023**, *154* (3), 645–656. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02539-x>.

Viviani, V.; Biolchi, A.; Pizza, M. Synergistic Activity of Antibodies in the Multicomponent 4CMenB Vaccine. *Expert Review of Vaccines* **2022**, *21* (5), 645–658. <https://doi.org/10.1080/14760584.2022.2050697>.

Walmsley, A. M.; Alvarez, M. L.; Jin, Y.; Kirk, D. D.; Lee, S. M.; Pinkhasov, J.; Rigano, M. M.; Arntzen, C. J.; Mason, H. S. Expression of the B Subunit of Escherichia Coli Heat-Labile Enterotoxin as a Fusion Protein in Transgenic Tomato. *Plant Cell Reports* **2003**, *21* (10), 1020–1026. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0619-4>.

Ward, B. J.; Séguin, A.; Couillard, J.; Trépanier, S.; Landry, N. Phase III: Randomized Observer-Blind Trial to Evaluate Lot-to-Lot Consistency of a New Plant-Derived Quadrivalent Virus like Particle Influenza Vaccine in Adults 18–49 Years of Age. *Vaccine* **2021**, *39* (10), 1528–1533. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.01.004>.

Wen, S. X.; Teel, L. D.; Judge, N. A.; O'Brien, A. D. A Plant-Based Oral Vaccine to Protect against Systemic Intoxication by Shiga Toxin Type 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103* (18), 7082–7087. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510843103>.

Wroblewski, T.; Tomczak, A.; Micheltore, R. Optimization of Agrobacterium-Mediated Transient Assays of Gene Expression in Lettuce, Tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal* **2005**, *3* (2), 259–273. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00123.x>.

Yu, J.; Langridge, W. H. R. A Plant-Based Multicomponent Vaccine Protects Mice from Enteric Diseases. *Nature Biotechnology* **2001**, *19* (6), 548–552. <https://doi.org/10.1038/89297>.

Yuki, Y.; Mejima, M.; Kurokawa, S.; Hiroiwa, T.; Takahashi, Y.; Tokuhara, D.; Nochi, T.; Katakai, Y.; Kuroda, M.; Takeyama, N.; Kashima, K.; Abe, M.; Chen, Y.; Nakanishi, U.; Masumura, T.; Takeuchi, Y.; Kozuka-Hata, H.; Shibata, H.; Oyama, M.; Tanaka, K.; Kiyono, H. Induction of Toxin-Specific Neutralizing Immunity by Molecularly Uniform Rice-Based Oral Cholera Toxin B Subunit Vaccine without Plant-Associated Sugar Modification. *Plant Biotechnology Journal* **2013**, *11* (7), 799–808. <https://doi.org/10.1111/pbi.12071>.

Yusibov, V.; Rabindran, S. Recent Progress in the Development of Plant Derived Vaccines. *Expert Review of Vaccines* **2008**, *7* (8), 1173–1183. <https://doi.org/10.1586/14760584.7.8.1173>.

10.1 Internetové zdroje

Elelyso® (taliglucerase alfa) for injection. *How is ELELYSO made?* Online. Dostupné z: <https://www.elelyso.com/how-is-elelyso-made>. [cit. 2025-03-20].

FDA. *Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs*. Online. Dostupné z: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm>. [cit. 2025-03-20].

UNICEF. *Diarrhoea*. Online. 2024. Dostupné z: <https://data.unicef.org/topic/child-health/diarrhoeal-disease/>. [cit. 2025-03-19].

World health organization. *Cholera vaccine*. Online. Dostupné z: <https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/diseases/cholera>. [cit. 2025-03-17].

World health organization. *Diarrhoeal disease*. Online. 2024. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>. [cit. 2025-03-19].