

PONIENDO EN CLARO

”Magnifeción” ¿una solución a la producción de anticuerpos recombinantes en situaciones de epidemia/pandemia?

Iris Asensio García¹, María Luz Centeno Martín²

1. Graduada en Biotecnología. Trabajo Fin de Grado 2013-2014. Universidad de León.
2. Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Área de Fisiología Vegetal, Universidad de León.

Ciertas situaciones de emergencia, como la provocada por el último brote epidémico del virus del Ébola, crean la necesidad de producir, rápidamente y a gran escala, antígenos y anticuerpos útiles en la elaboración de vacunas. La Biotecnología cuenta con varios sistemas de producción de proteínas recombinantes, pero no todos son capaces de responder eficientemente a ese tipo de demandas. Una buena alternativa es el empleo de las plantas como biofactorías. Existen varios métodos para lograr la expresión heteróloga de proteínas en plantas, desde los utilizados para obtener plantas transgénicas, hasta la infección con vectores virales que da lugar a elevados niveles de expresión transitoria. Uno de ellos es la “magnifeción” (de *magnifaction*), que combina el uso de vectores virales deconstruidos, y clonados entre los bordes derecho e izquierdo del T-ADN de una cepa de *Agrobacterium*, con la agroinfiltración realizada a escala industrial en plantas cultivadas en invernadero. Proporciona rendimientos de producción de hasta 5 g de proteína recombinante por kg de biomasa en solo 4-10 días. La metodología se ha aplicado para obtener los anticuerpos de “ZMapp”, el suero que ha dado buenos resultados en el tratamiento de infecciones por el virus del Ébola en humanos, así como otras proteínas de interés terapéutico.

Palabras clave: agricultura molecular, agroinfiltración, vectores virales deconstruidos, “ZMapp”, planta biofactoría.

Introducción

La producción de vacunas por parte de las empresas farmacéuticas debe cubrir la demanda mundial continua y, además, demandas puntuales y urgentes que se producen como consecuencia de situaciones de emergencia o de brotes epidémicos, como sucedió con la expansión del virus de la inmunodeficiencia adquirida en los noventa, el brote de gripe aviar en el año 2005, o el brote del virus del Ébola en 2014. La respuesta a estas últimas ha de ser rápida y dar lugar a un suministro de las terapias farmacológicas necesarias para sofocar el brote en el menor tiempo posible. En los casos más graves los fármacos deben producirse,

Forma de mencionar este artículo: Asensio, I., Centeno, M.L., 2016, “Magnifeción” ¿una solución a la producción de anticuerpos recombinantes en situaciones de epidemia/pandemia? AmbioCiencias, 14, 19-39. Revista de divulgación científica editada por la Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de León, ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.

además, a gran escala. También hay que considerar que los sectores de población normalmente más afectados y que sufren con mayor virulencia estas situaciones pertenecen a países en vías de desarrollo, por lo que sus recursos económicos a la hora de adquirir los tratamientos son limitados. Por lo tanto, la capacidad de producir mucho, rápido y barato tiene suma relevancia en la producción industrial de vacunas bajo estas situaciones concretas.

Los anticuerpos y antígenos que forman parte de las vacunas pueden producirse por métodos biotecnológicos. Esto ha sido posible gracias al desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, de la genómica y de la proteómica, que han permitido conocer la estructura de los genes, su función y la de sus productos proteicos, así como manipular el genoma de los organismos. Hoy en día se pueden sintetizar proteínas a partir de organismos distintos a aquellos de los que proceden, en mayores cantidades que en su ambiente natural, e incluso mejorar sus propiedades. Estas proteínas, conocidas como recombinantes, ofrecen multitud de posibilidades y aplicaciones en diferentes ámbitos, entre ellos el clínico.

La Biotecnología se puede servir de diversos sistemas de expresión para producir proteínas recombinantes. Estos se definen como sistemas formados por un organismo hospedador y un vector de expresión o fragmento de ADN que aporta la información que se quiere incluir y expresar en el primero. Los investigadores se afanan en desarrollar el sistema de expresión más eficiente y de menor coste para la producción de proteínas en cada situación (Xu *et al.*, 2012). Una de las cuestiones a considerar en el caso de los anticuerpos recombinantes es su complejidad química y estructural, pues son glicoproteínas oligoméricas, con regiones conservadas y otras variables, patrones de glicosilación complejos, y cuya correcta configuración es fundamental para la función de reconocimiento del antígeno (**Fig. 1**).

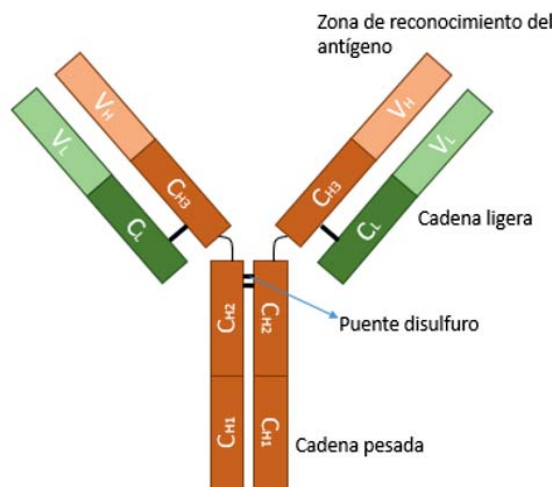


Figura 1. Estructura de un anticuerpo (inmunoglobulina G). La proteína funcional está formada por dos subunidades idénticas unidas por puentes disulfuro. Cada subunidad contiene una cadena pesada (C_H) y otra ligera (C_L). Ambas poseen regiones altamente conservadas (C) y una región variable (V). Las regiones variables constituyen las zonas de reconocimiento del antígeno.

El empleo de las plantas como sistemas de expresión es conocido como *plant molecular farming* o agricultura molecular. Consiste en la obtención, por medio de ingeniería genética, y cultivo en campo o invernadero de plantas modificadas con el fin de producir proteínas recombinantes con diferentes aplicaciones, entre ellas las de valor terapéutico (Obembe *et al.*, 2011). También se suele incluir en la definición el cultivo de células de plantas genéticamente modificadas para los mismos fines productivos. En cualquier caso, el objetivo es conseguir que las células de plantas actúen como biorreactores.

La agricultura molecular es una plataforma de producción conocida pero no explotada en todas sus posibilidades (Xu *et al.*, 2012). Frente a otros sistemas de producción, como los representados por el cultivo de bacterias en fermentadores, el cultivo de levaduras o el de células animales (insecto, ratón, etc.), presenta las siguientes ventajas para producir proteínas recombinantes:

- 1) Es más biosegura, pues minimiza los riesgos de contaminación con patógenos humanos o animales. Las plantas no son susceptibles de ser infectadas por virus animales, por lo que no actúan como sus vectores de transmisión, ni tampoco los virus de plantas se transmiten ni afectan al ser humano.
- 2) Es muy ventajosa desde el punto de vista del almacenamiento y la distribución.
- 3) La tecnología necesaria para cosechar y procesar las plantas y sus productos a escala industrial está disponible. Además, los sistemas de producción agrícola son más económicos que los de cultivos celulares en fermentadores, entre otras cosas porque emplean el sol como fuente de energía y no se necesitan infraestructuras tan caras. Como consecuencia, el escalado también es más sencillo y requiere menos costes.
- 4) Las plantas cuentan con un sistema endomembranoso y una vía secretora similares a los de células de mamíferos, por lo que las proteínas producidas son sometidas a las modificaciones postraduccionales pertinentes y a un plegamiento eficiente, gracias a que las chaperonas que poseen son homólogas a las presentes en las células humanas (Vitale y Pedrazzini, 2005).

Por lo tanto, las plantas y sus cultivos celulares pueden representar una buena opción para producir antígenos y anticuerpos recombinantes útiles en la elaboración de vacunas, y dar respuesta a los retos que plantea una demanda urgente y masiva de éstos. Los anticuerpos producidos biotecnológicamente en plantas se conocen como planticuerpos (Loza-Rubio y Gómez-Lim, 2006).

Métodos de producción de planticuerpos anteriores a la “magnifeción”

La producción de proteínas recombinantes en plantas puede derivar de la expresión estable o transitoria de los genes foráneos. La primera implica que los genes se han integrado de manera estable en el genoma nuclear de las células, logrando que la información incorporada sea heredada por las siguientes progenies (Chen, 2008; García, 2010). Por lo tanto, la expresión estable interesa cuando el objetivo de la modificación es que el carácter determinado por la proteína se transmita a la descendencia. Es el caso de las plantas transgénicas obtenidas en el marco de programas de mejora genética de cultivos, p. e. el maíz Bt resistente a la plaga del taladro europeo. El método más eficiente para realizar estas modificaciones estables es la transformación genética nuclear o de los cloroplastos mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

La expresión transitoria da lugar a la síntesis de la proteína en las células que incorporan el transgén durante cierto tiempo, pero se acaba perdiendo porque el gen no se integra en el genoma, de modo que el nuevo carácter no se transmite a la descendencia. Este es el tipo de expresión resultante de las modificaciones llevadas a cabo por vectores virales. El nivel de expresión y el rendimiento de producción son bastante mayores que los obtenidos con la expresión estable, característica que resulta de sumo interés en la producción rápida y a gran escala de planticuerpos.

a) La transformación genética nuclear de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es un proceso natural por el cual la bacteria es capaz de transferir un fragmento de ADN de su plásmido Ti (*Tumor induction*; **Fig. 2**), denominado T-ADN, a las células infectadas. El T-ADN contiene genes que codifican para enzimas de síntesis de hormonas de plantas (oncogenes) y de opinas, aminoácidos utilizados por la bacteria como fuente de carbono, nitrógeno y energía. La integración de estos genes en el genoma de la planta y su expresión causan sobre-síntesis de hormonas que promueven la proliferación celular, lo que origina tumores en la planta. Los tumores producen opinas que mantienen el crecimiento de las bacterias en la rizosfera. El plásmido Ti posee también una región de virulencia con los genes *vir*, encargados de la infección bacteriana y de la transferencia del T-ADN (Nester, 2015).

Los genes situados entre los bordes derecho e izquierdo del T-ADN no son necesarios en el proceso de infección y transferencia génica, de modo que se pueden reemplazar por otros, obteniéndose así un vector de transformación. Se

trata de un plásmido Ti de menor tamaño, modificado por ingeniería genética, y desarmado (sin oncogenes), pero con todos los elementos necesarios para realizar los procesos de infección, transferencia e integración del T-ADN (Gelvin, 2003; Nester, 2015). Contiene un origen de replicación y un gen de selección de bacterias, la región de virulencia y los bordes derecho e izquierdo del T-ADN. Entre éstos se pueden incluir un gen foráneo de interés y un gen de selección de células de plantas transformadas. Las secuencias reguladoras de los genes incluidos en el T-ADN deben ser reconocidas por las células eucariotas para que se expresen en planta (Gelvin, 2003). Sus promotores pueden ser constitutivos, o específicos si se desea dirigir la expresión del transgén a un órgano determinado o inducirse bajo ciertas condiciones. Incluso se puede incorporar a la construcción secuencias marcadoras de la vía secretora, para que la proteína se acumule en un orgánulo concreto o sea vertida al apoplasto, de donde se podrá extraer con mayor facilidad (Gleba *et al.*, 2005).

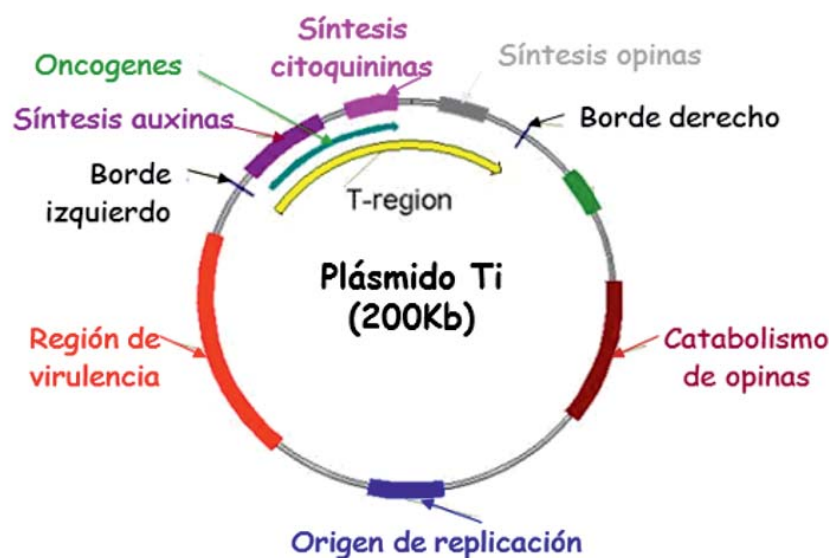


Figura 2. Estructura y componentes del plásmido Ti.

A pesar de ser una metodología bastante desarrollada, la transformación nuclear mediada por cepas modificadas de *Agrobacterium* no representa una herramienta adecuada para producir planticuerpos a nivel industrial. En primer lugar supone, además de la elaboración y clonación de los vectores, la puesta a punto de los protocolos de transformación y regeneración *in vitro* de las plantas transgénicas, así como la selección de aquellas que realmente muestran transformación estable. Estos procesos pueden retrasar de 18 a 24 meses la producción de los primeros 100 mg de proteína, demasiado tiempo para responder a una

situación de gran demanda a corto plazo (vacunas para epidemias) (Gleba *et al.*, 2005). Por otro lado, el rendimiento de producción, definido como el porcentaje de proteína recombinante respecto al total de proteína soluble de la planta, es bajo (0,1-0,5%). Esto se debe a que solo entre el 5 y el 9% de las copias del transgén transferidas por *Agrobacterium* se integran en los cromosomas y son expresadas de manera correcta en plantas.

El problema del bajo rendimiento podría resolverse modificando el genoma de los cloroplastos, no el nuclear. Gracias a que cada cloroplasto contiene unas 100 copias de su genoma y cada célula de mesófilo foliar tiene unos 100 cloroplastos, las posibilidades de integración del transgén aumentarían en gran medida y con ello el rendimiento (Maliga, 2004). Sin embargo, los cloroplastos no tienen sistemas de modificación postraduccional, por lo que las proteínas recombinantes formadas no son siempre funcionales, e incluso pueden agregarse formando cuerpos proteicos complicando los procesos de extracción y purificación (Gleba *et al.*, 2005). Por otro lado, la metodología es igual de lenta que la transformación nuclear, haciendo de nuevo imposible el escalado industrial de la producción en poco tiempo.

b) La agroinfiltración es otra metodología útil en la producción de proteínas recombinantes en plantas que explota la expresión transitoria. Se sirve también de *Agrobacterium* como vehículo para introducir el transgén en las células, pero la cepa recombinante se infiltra en la planta, principalmente en las hojas. Puede realizarse manualmente, de forma local y directa (**Fig. 3**), o bien utilizando una cámara de vacío. En ese caso, las hojas se sumergen en una solución con la cepa de *A. tumefaciens* tras sacar de ellas el aire por vacío. Se aplica entonces una presión para que los espacios intersticiales se rellenen con la solución. Una vez allí, *Agrobacterium* infecta y transfiere el gen de interés a las células de las hojas en un número muy elevado de copias, y aunque el porcentaje de las que se integran en el genoma es bajo (5-9%), casi todas acceden al núcleo y se expresan de forma transitoria.

La expresión mayoritariamente transitoria del transgén se aprovecha para producir altas cantidades de proteína en poco tiempo por varios motivos: (i) la síntesis se inicia a los 3-4 días de la agroinfiltración, (ii) no es necesaria la regeneración *in vitro* de plantas, pues el objetivo no es obtener una planta transgénica con un nuevo carácter heredable, y (iii) tampoco se requiere seleccionar las células transformadas (Grimsley *et al.*, 1986). Estas tres características de la agroinfiltración acortan enormemente el proceso de producción. Además, la agroin-

filtración sigue siendo un método muy versátil por conservar la elevada infectividad de *Agrobacterium*. Pero su principal valor radica en su potencial de escalabilidad, ya que la infiltración al vacío puede hacerse simultáneamente en un gran número de plantas y en poco tiempo.

Figura 3. Metodología de agroinfiltración manual. Primero se



hiere la hoja superficialmente por abrasión. Después, y empleando una jeringuilla, se aplica por presión la solución de la cepa de *Agrobacterium* modificada, que entra a través de los espacios intercelulares (tomado de Chen *et al.*, 2013).

c) Los vectores virales constituyen otros de los sistemas que explotan la expresión transitoria de genes foráneos en plantas. Representan una excelente alternativa en la producción industrial de proteínas recombinantes (Gleba *et al.*, 2004), dado que los vectores virales poseen ventajas como su velocidad de expresión, el alto rendimiento y la reducción de los costes (Gleba *et al.*, 2007).

Los vectores virales de primera generación o *full virus* son virus funcionales de plantas que se comportan como los virus silvestres (wt), manteniendo todas sus características, a saber: capacidad de infectividad, replicación de los ácidos nucleicos, traducción de sus proteínas, movimiento sistémico dentro del hospedador, ensamblaje y producción de viriones maduros, reprogramación de los procesos de biosíntesis, y supresión del silenciamiento génico. La diferencia con los virus originales radica en que se modifica su genoma para que expresen la secuencia heteróloga exógena (Gleba *et al.*, 2004). Los más utilizados son el virus del mosaico de la coliflor (CaMV), que es un virus ADN de doble cadena, y algunos virus cuyo genoma está representado por una hebra simple de ARN, como el del mosaico del tabaco (TMV) y el virus X de la patata (PVX). En los vectores virales, el gen foráneo se incluye bajo el control de un promotor fuerte, por lo general el de las proteínas de la cápsida del propio virus (CP). Al cabo de 2-3 semanas de realizar la infección de la planta, el vector ha accedido a los distintos órganos y células donde el gen se expresa de forma transitoria (Gleba *et al.*, 2004).

El principal potencial de los vectores virales radica en su capacidad para replicarse de manera autónoma, lo que permite amplificar miles de veces la

expresión transitoria del transgén en relación a otros sistemas como la agroinfiltración. Si además se tiene en cuenta la propagación sistémica de los virus, es fácil entender que el rendimiento en la producción de proteínas recombinantes sea mayor. Sin embargo, su empleo presenta limitaciones:

- 1) Su infectividad es baja porque suelen ser especie-específicos.
- 2) Aunque son vectores sistémicos, no son capaces de infectar toda la planta (rara vez infectan las hojas inferiores) y su propagación es asincrónica.
- 3) La infección sistémica es un proceso relativamente lento que deja tiempo a la planta para activar sus defensas.

Se obtienen rendimientos aceptables pero sólo para proteínas de bajo peso molecular. De hecho, se ha probado que existe una correlación negativa entre el tamaño del inserto (máximo 1 Kb) y la estabilidad del vector viral para TMV y PVX (Gleba *et al.*, 2007). Para resolver este problema se diseñaron vectores virales modificados en los que se eliminaron los genes para CP, lo que permitió disponer de mayor espacio para incluir transgenes mayores.

d) Parte de las limitaciones de los primeros **vectores virales modificados** se pudieron superar mediante su empleo **combinado con la agroinfiltración** (Gleba *et al.*, 2007). La nueva metodología pasaba por incluir en el T-ADN de cepas de *Agrobacterium* vectores basados en virus ARN modificados, sin los genes CP, en forma de cADNs recombinantes. De este modo la entrada y liberación del vector viral se realizaría por agroinfiltración, aprovechando así también la elevada infectividad de la bacteria (Chen y Lai, 2013). En los primeros intentos, realizados con vectores virales basados en el virus TMV, modificados y clonados en el T-ADN de *Agrobacterium*, se obtuvieron eficiencias de infección muy bajas (1 por cada 10⁸ bacterias inoculadas) (Gleba *et al.*, 2007). El mal resultado estuvo relacionado con la liberación del primer genoma viral en el núcleo de las células infectadas. Esto representaba una etapa artificial en el ciclo de vida del TMV ya que su ARN es citoplasmático, por lo que no entra en el núcleo celular y no se procesa con la maquinaria del ARN nuclear (Chung *et al.*, 2006). De hecho, el análisis de genomas virales demostró que las secuencias codificadoras de muchas de las regiones de ese ARN pueden ser reconocidas como anómalas por dicha maquinaria. Por lo tanto, el vector representado por una copia simple de ARNm del virus en el núcleo celular posiblemente se degradaba antes de llegar al citoplasma.

Por consiguiente, tampoco la sustitución del movimiento sistémico de los vectores virales por la agroinfiltración resultó ser un método del todo adecuado

para dar respuesta a demandas grandes y urgentes de anticuerpos recombinantes. A partir de este punto, los investigadores se centraron en el desarrollo de nuevos vectores y de sistemas de liberación del transgén más eficientes.

“Magnifeción”

La “magnifeción” es el método de expresión transitoria de proteínas heterólogas en plantas que combina el empleo de vectores virales deconstruidos (de *deconstructed virus*) o de 2^a generación, con la agroinfiltración mecánica e industrial de la plantas (Gleba et al., 2005). Fue desarrollado por el grupo liderado por Sylvestre Marillonnet para Icon Genetics (Marillonnet *et al.*, 2004). Estos investigadores abordaron la cuestión de los bajos niveles de infectividad de los vectores virales trabajando con modificaciones genéticas del virus TMV (sin los genes para CP), e introduciendo un nuevo protocolo para mejorar su liberación en múltiples áreas de la planta (Marillonnet *et al.*, 2005).

La idea inicial para obtener los **vectores virales deconstruidos** consistió en eliminar secuencias que regulaban funciones del virus TMV modificado que no eran necesarias en el proceso de agroinfiltración (Gleba *et al.*, 2004; Gleba *et al.*, 2007). Así se obtenía más espacio para introducir genes de interés de mayor tamaño. Si la eliminación de esas secuencias ocasionara alguna deficiencia en las funciones virales que sí eran necesarias para la expresión heteróloga, éstas podrían delegarse en funciones complementadas en *trans* del hospedador o ser sustituidas por funciones análogas procedentes de fuentes no virales. Partiendo de esas premisas, los investigadores hicieron nuevas modificaciones en los vectores virales:

- 1) Identificaron secuencias que podían ser el origen de la inducción del procesamiento indeseado del ARNm vírico en el núcleo de las células infectadas. Eliminando algunos puntos de procesamiento y aumentando el % GC obtuvieron una mayor eficiencia en células infectadas (Chung *et al.*, 2006).
- 2) Estudiaron la posibilidad de que el gran tamaño del ARNm vírico pudiera afectar a la eficacia de su exportación al citoplasma dado que la maquinaria del hospedador trabaja habitualmente con transcritos más cortos. Para permitir la salida del ARN viral al citoplasma se añadieron varios intrones en la secuencia génica viral introducida (Chung *et al.*, 2006).

El grupo de Marillonnet comprobó que con el empleo de los nuevos virus deconstruidos, y su entrega a modo de precursores de ADN por *Agrobacterium*,

se conseguía el procesamiento eficaz de la información contenida en los replicones virales activos en casi todas las células de la planta infectadas (>93%). También, que los nuevos vectores mejoraban los eventos de infección (1 de cada 10-20 bacterias infiltradas iniciaba un proceso de infección viral). La eficiencia fue 10^3 y 10^7 veces mayor que la conseguida, respectivamente, con infecciones directas con vectores virales y con vectores de 1^a generación modificados y agroinfiltrados. Este incremento permite utilizar suspensiones de *Agrobacterium* más diluidas, reduciendo el tiempo necesario para obtenerlas, así como su coste. Por último, como el vector viral carece del gen de la cápsida proteica, puede contener y expresar insertos génicos de hasta 2,3 kb (Marillonnet *et al.*, 2005).

Por lo tanto, la “magnificación” consiste en infiltrar la totalidad de la planta con una o varias suspensiones de *Agrobacterium* portadoras de los T-ADNs que codificarán para los replicones virales en forma de ADNc; la técnica combina funciones y ventajas de **3 sistemas biológicos**:

- El vector viral deconstruido: destaca por su capacidad para replicarse y amplificar el transgén, lo que proporciona niveles de expresión muy elevados, y se encarga de la propagación célula-célula (distancia corta). Por otro lado, el hecho de entregar la información en forma de precursores de ADN en lugar de ARN, evita los problemas asociados a su procesamiento en el núcleo.
- *Agrobacterium*: asume las funciones de infección primaria y de circulación sistémica, gracias a su elevada infectividad y a su capacidad para liberar y distribuir el vector viral en la planta.
- Planta: además de su bajo coste, realiza un procesamiento postraduccionnal correcto, por lo que produce proteínas recombinantes complejas y funcionales. Las proteínas se forman sobre todo en las hojas, que representan la parte mayoritaria de la biomasa de la planta, lo que permite obtener elevados rendimientos. Aunque la infiltración se ha llevado a cabo en varias especies, las mayores eficiencias se han logrado en *Nicotiana benthamiana* (Wylie *et al.*, 2015). Son plantas con crecimiento muy vigoroso, gran superficie foliar y muy susceptibles a las infecciones víricas. Se cultivan en invernadero (**Fig. 4**) y se pueden cosechar varias veces al año, proporcionando más de 50 toneladas de biomasa/ha. año, frente a producciones de 6 toneladas en trigo, arroz o maíz.

El sistema de Marillonnet ofrecía un protocolo para la expresión de proteínas heterólogas en plantas sencillo y escalable que se podía prolongar indefinida-

mente en el tiempo (Gleba *et al.*, 2005). Pero su escalado industrial requería la agroinfiltración en muchas plantas y superar el problema que planteaba voltearlas durante su inmersión en la suspensión de *Agrobacterium*. Para automatizar el proceso a gran escala se desarrolló un túnel de vacío y rociado (**Fig. 5B**) (Chen *et al.*, 2013).

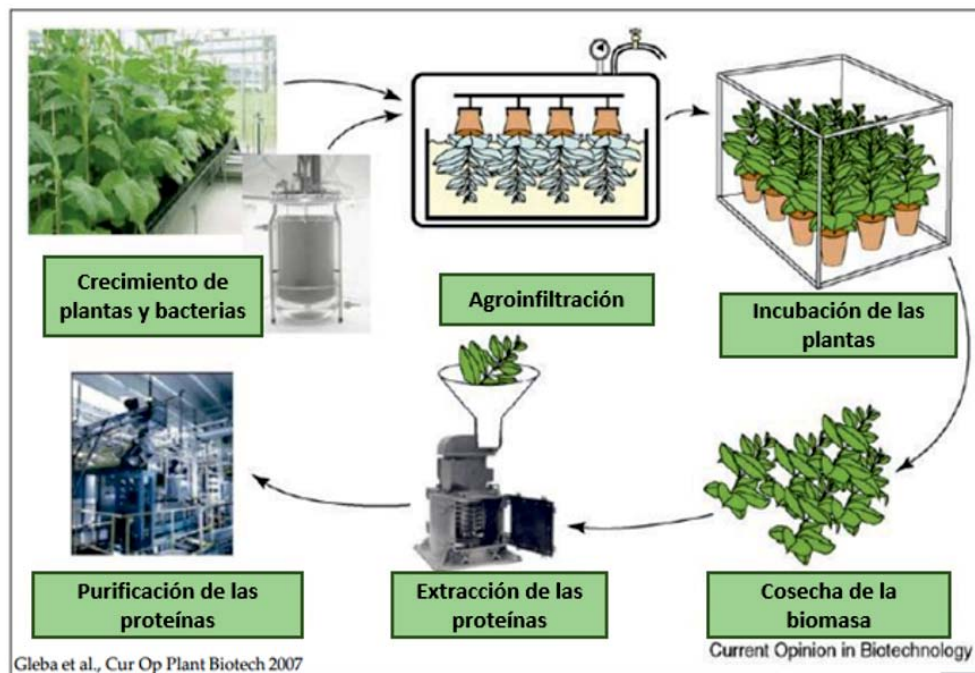


Figura 4. Escalado del proceso de “magnificación”. El proceso implica: a) cultivo de *N. benthamiana* en invernadero y de las bacterias en fermentadores; b) inmersión de las plantas en la suspensión de bacterias para realizar la agroinfiltración; c) Incubación en entorno limitado durante 4-10 días (periodo de infección y de expresión del transgén); d) cosecha de las hojas de las plantas; e, f) extracción y purificación de la proteína recombinante (tomado de Gleba *et al.*, 2007).

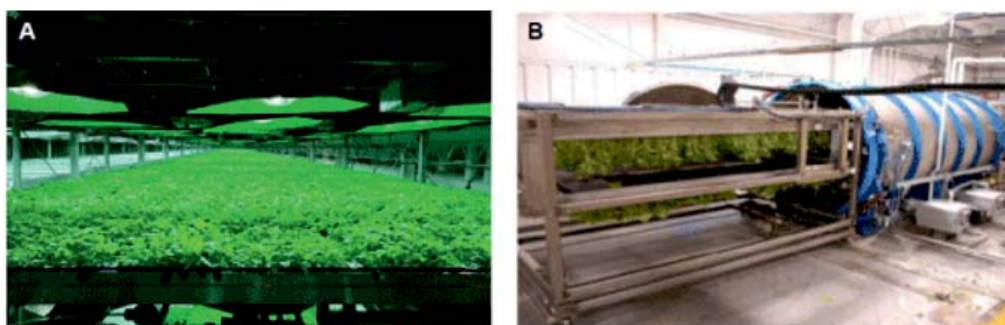


Figura 5. Crecimiento (A) y agroinfiltración a escala industrial de *N. benthamiana* (B). Fotografías de Bratcher B (Kentucky Bioprocessing) (tomada de Chen *et al.*, 2013).

La “magnificación” a escala industrial permite producir planticuerpos, útiles en la elaboración de vacunas, de manera rápida, económica y en grandes cantidades, con las siguientes **ventajas** frente a los métodos anteriores:

1) Ofrece mayor rapidez de escalado de la producción (Gleba *et al.*, 2005). Los procesos industriales se pueden realizar en menos de 10 días. En 3-4 semanas se producen cantidades de proteína recombinante de mg, e incluso de g, y es posible obtener hasta 100 Kg de proteína en menos de un año. La mayor limitación está representada por el diseño y la obtención de los vectores.

2) Proporciona los mayores rendimientos, tal como demuestran los siguientes valores máximos: hasta 5 g de proteína recombinante por Kg de biomasa foliar, 80% de la proteína soluble total, o 500 kg de proteína recombinante por hectárea de invernadero al año (Gleba *et al.*, 2005) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Comparativa de rendimientos (% de proteína recombinante respecto a la proteína soluble total, excepto en*) y velocidades de producción de los sistemas de expresión de proteínas recombinantes en plantas. Pf: peso fresco.

Sistema de expresión	Rendimiento	Velocidad
Transformación nuclear mediada por <i>A. tumefaciens</i>	0,1-0,5%	18-24 meses
Transformación cloroplastos	25%	12-18 meses
Agroinfiltración *	50 mg proteína/100 Kg Pf	3-4 días tras la infiltración
Vectores virales 1ª generación	20%	2-3 semanas
“Magnificación”	80%	4-10 días

3) El proceso es relativamente económico pues se necesitan materiales baratos (las plantas y poca cantidad de biomasa bacteriana), se pueden sincronizar todas las operaciones abaratando los costes del trabajo, y los costes de purificación de la proteína recombinante son más baratos dada la elevada producción. Se estima que para un rendimiento de 0,8 g proteína/Kg de biomasa fresca, el coste de producción es menor de 1\$ por g de proteína cruda, y el de purificación menor de 50\$ por g (Gleba *et al.*, 2005).

4) Es una tecnología versátil, pues se ha demostrado su eficacia en la producción de diversos tipos de proteínas. Algunos rendimientos (gramos de proteína/Kg biomasa) son: 1,2 de somatotropina, 5,1 de interferón alfa, 5,4 de varios antígenos bacterianos y 0,4-1,5 para diferentes anticuerpos cadena simple.

5) Bioseguridad. La “magnificación” se realiza sobre plantas cultivadas en contenedor e invernaderos con bloqueos de seguridad, lo que minimiza las pro-

babilidades de liberación de las células modificadas de *Agrobacterium* al ambiente. Tampoco los vectores virales suponen riesgos para otros cultivos y especies vegetales, ya que al tratarse de virus deconstruidos no es posible que puedan revertir al silvestre. Además, el uso de *Nicotiana*, una planta de uso no alimentario, mitiga aún más los problemas de bioseguridad.

A pesar de sus ventajas, la “magnificación” también muestra **limitaciones**, para la que ya existen varias **soluciones**:

1) Las plantas realizan glicosilaciones postraduccionales de las proteínas específicas de ellas. Esto podría generar en algunos casos proteínas recombinantes no funcionales en humanos o animales, lo que es un problema de especial importancia en el caso de antígenos y anticuerpos.

2) La producción industrial en fermentadores de la cepa recombinante de *Agrobacterium* es uno de los procesos que más encarecen la “magnificación”, de modo que esta resultaría más rápida y económica si este proceso se pudiera suprimir. Una forma de lograrlo consistiría en insertar, en el genoma de la planta hospedadora y de forma estable, el replicón viral con el gen de interés bajo el control de un promotor inducible. El desarrollo metodológico sería más lento, pues habría que obtener la planta transgénica por transformación nuclear de las células, regeneración *in vitro* y posterior selección. Sin embargo, la capacidad de producir la proteína recombinante se podría transmitir a los descendientes de la primera planta biofactoría, disponiendo de muchas más a largo plazo (generaciones sucesivas).

Tales ideas fueron adoptadas por Dohi *et al.* (2006) y por Zhang y Mason (2006). Los primeros desarrollaron un sistema basado en un promotor inducible por estrógeno, y los segundos otro en el cual la amplificación se logra gracias a la expresión en *trans* de la proteína iniciadora de la replicación, que se encuentra bajo el control de un promotor inducible por etanol.

3) Otra limitación de la “magnificación” es su adaptación a la expresión de proteínas oligoméricas como los planticuerpos, ya que los vectores virales deben ser manipulados para que expresen cantidades equimolares de diferentes péptidos. Se sabe que la liberación conjunta de 2 construcciones distintas de vectores virales basados en el mismo virus da lugar a replicones competitivos (se produce la amplificación preferencial de uno de ellos).

Giritch y colaboradores (Girith *et al.*, 2006) abordaron este problema y utilizaron dos vectores derivados de dos virus distintos y no competitivos, TMV y PVX, con el fin de producir IgGs completas. La metodología forma parte del sistema MagnICON (Girith *et al.*, 2006; Marillonett *et al.*, 2004), y se basa en el ensamblaje *in planta* de los componentes de la replicación de los genomas de los

virus TMV y PVX a partir de diferentes módulos de ADNc (**Fig. 6**).

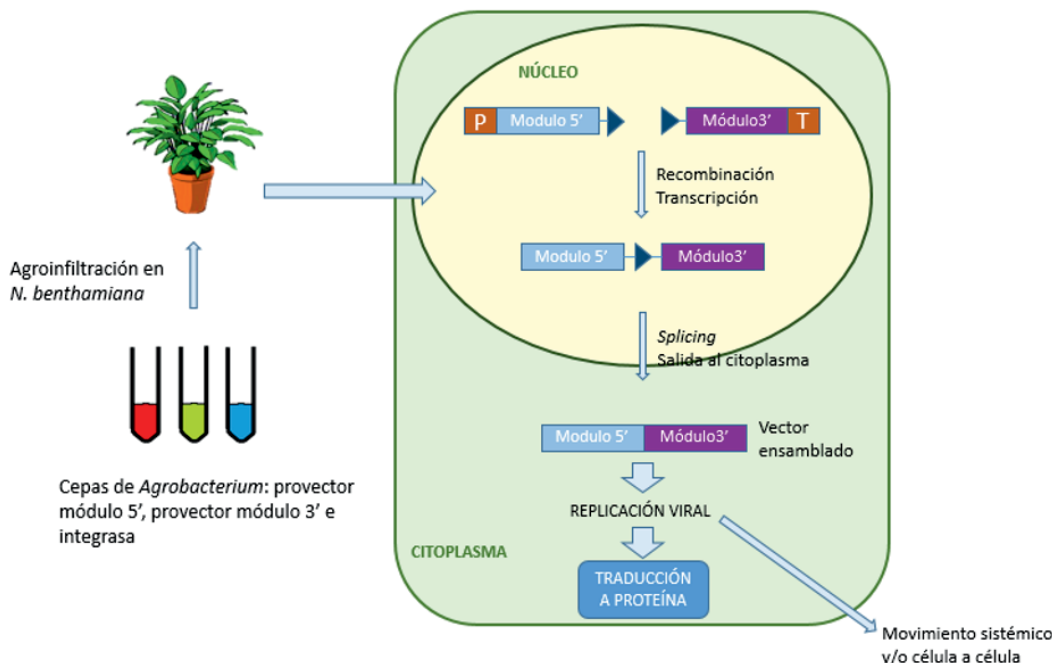


Figura 6. Esquema del procedimiento del ensamblaje *in planta* de los módulos de los provectores virales. El módulo 5' lleva el ARN viral correspondiente a la ARN polimerasa y a las proteínas de movimiento del virus. El módulo 3' contiene el transgén y la región 3' no traducida. Las cepas de *A. tumefaciens* dan cabida a los dos módulos, se mezclan y se co-infiltran en las células de planta con una tercera construcción que produce una recombinasa. Producida la expresión, la recombinasa une los módulos 5' y 3' dando lugar a módulos competentes para la replicación en planta. Este montaje de ADN es transcrito y modificado para generar el replicón infeccioso y funcional (elaborado a partir de Marillonett *et al.*, 2004).

Otro vector viral deconstruido destacado por su utilización en la producción de planticuerpos es el Geminiviral-BeYDV (**Fig. 7**), derivado del geminivirus del frijol amarillo enano BeYDV. Este virus tiene una sola hebra circular de ADN que se replica en un gran número de copias por el mecanismo del círculo rodante (Chen *et al.*, 2014). El vector se desarrolló para evitar las modificaciones a realizar como consecuencia de la naturaleza del material genético de TMV y PVX (ARN de cadena simple) y que había que clonar en forma de ADNc.

Con el sistema Geminiviral-BeYDV se consiguen rendimientos de producción de proteínas recombinantes comparables a los logrados con el sistema MagnICON, si bien el tiempo de producción es algo inferior (acumulación de proteínas en 4-8 días tras la agroinfiltración) (Huang *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2012). Además, en un mismo vector Geminiviral-BeYDV se pueden incluir varios genes en tándem. Se resuelve por tanto la dificultad de producir varias hetero-

subunidades (hasta 5) de proteínas multiméricas como los anticuerpos, eliminando la necesidad de co-infectar múltiples módulos de expresión. Este sistema representa un avance significativo en las tecnologías de expresión transitoria para la producción comercial de proteínas farmacéuticas.

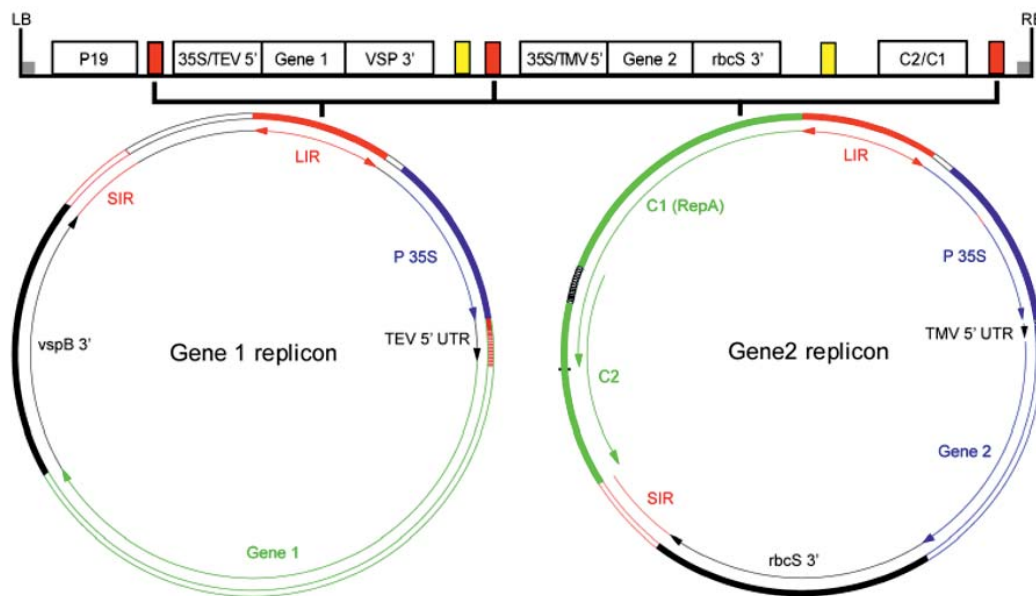


Figura 7. Un único vector Geminiviral-BeYDV genera dos replicones no competitivos para la coexpresión de dos proteínas, o de una proteína con dos hetero-subunidades. LB y RB son los bordes izquierdo y derecho del T-ADN que se transfiere a la planta mediante *A. tumefaciens*. Hay dos segmentos génicos flanqueados por regiones del genoma viral (LIR, rectángulos rojos). En el momento de la liberación a las células de plantas, la expresión del gen C1/C2 produce una proteína asociada a la replicación del virus que corta las secuencias LIR para generar dos moléculas de ADN monocatenario. A continuación, estas se copian para obtener una doble hebra de ADN que puede replicarse por el mecanismo del círculo rodante. Los dos replicones son amplificados de manera independiente y no competitiva, para producir un gran número de copias de ADN y, a su vez, abundantes ARNm para la traducción de las proteínas 1 y 2 (codificadas por los genes 1 y 2); para conocer detalles ver Chen *et al.*, 2011 y 2013.

Aplicaciones de la “magnificación” a la producción industrial de anticuerpos contra virus: el caso particular de “ZMapp”

La técnica de la “magnificación” destaca por su aplicación en el ámbito clínico y farmacológico. Ha sido empleada en los procesos de elaboración y obtención de diversas proteínas recombinantes cuya finalidad era el desarrollo de nuevas vacunas (**Tabla 2**). Entre estos destaca, dada la gran repercusión que tuvo, la obtención de los anticuerpos que forman parte de “ZMapp”, uno de los tratamientos que mejores resultados ha dado frente a la enfermedad causada por el virus del Ébola (EVD).

El virus del Ébola o *Zaire ebolavirus* pertenece al género *Ebolavirus* (familia *Filoviridae*), junto con otras 4 especies, de las cuales 3 son también patógenas para el hombre. Es un virus zoonótico que se transmite de animales a humanos por contacto directo o por la ingesta de carne infectada. Entre las especies implicadas en el contagio a humanos se encuentran el chimpancé, el gorila, y algunas especies de murciélagos. Estos últimos son los candidatos más factibles a representar el reservorio del virus. El contagio entre humanos sucede por contacto directo con mucosas, heridas o fluidos corporales.

Tabla . Ejemplos de proteínas farmacéuticas producidas mediante “magnificación”.

Planta hospedadora	Diana farmacológica	Fase de desarrollo	Referencia
<i>N. benthamiana</i>	Vacuna Gripe A H5N1 HA VLP	I/II ensayo clínico	Potera, 2012
<i>N. benthamiana</i>	Vacuna complejo inmune contra el Ébola	Preclínica	Phoolcharoen et al., 2011
<i>N. benthamiana</i>	Vacuna HgcHB VLP	Preclínica	Huang et al., 2009
<i>N. benthamiana</i>	Vacuna HgsHB VLP	Preclínica	Chen y Lai, 2013
<i>N. benthamiana</i>	Vacuna HIV-1 Pr55gag	Preclínica	Chen y Lai, 2013
<i>N. benthamiana</i>	Vacuna contra WNV preM/M y E	Preclínica	Chen et al., 2011; Chen y Lai, 2013
<i>N. benthamiana, lechuga</i>	Terapia contra Ébola basada en MAb	Preclínica	He et al., 2012; Huang et al., 2010; Lai et al., 2012; Olinger et al., 2012
<i>N. benthamiana, lechuga</i>	Vacuna contra Norovirus NVCP VLP	Preclínica	Huang et al., 2009; Lai et al., 2012; Santi et al., 2008
<i>N. benthamiana, lechuga</i>	Terapia contra WNP basada en mAb	Preclínica	Lai et al., 2010; Lai et al., 2012
<i>N. benthamiana, lechuga</i>	Vacuna WNV DIII	Preclínica	Chen et al., 2011; Lai et al., 2012

HA: hemaglutinina; VLP: *virus-like particle*; AgcHB: antígeno “core” del virus hepatitis B; AgsHB: antígeno de superficie del virus hepatitis B; Pr55gag: precursor de la proteína Gag; WNV: virus del Nilo Occidental (*West Nile virus*); preM/M: proteínas de la premembrana y la membrana; E: proteína de la envoltura; NVCP: proteína capsídica de Norovirus.

Desde el descubrimiento del virus Ébola han tenido lugar unos 20 brotes epidémicos, siendo el más grave el ocurrido en 2014 (Choi *et al.*, 2005). Con más de 28.000 afectados, de los cuales murieron aproximadamente el 40%, la enfermedad se desarrolla a lo largo de unos 21 días después de la exposición al virus. Se caracteriza porque el paciente presenta inicialmente fiebre alta, dolor de cabeza y abdominal, coagulación intravascular diseminada, diarrea y vómitos. Cuando la enfermedad evoluciona da lugar a múltiples hemorragias que derivan en un fallo multiorgánico antes de que la respuesta inmune sea efectiva, lo que finalmente significa la muerte del individuo. La gravedad del último brote de Ébola ha demostrado al mundo la necesidad de obtener vacunas o fármacos que protejan a la población.

El desarrollo de fármacos frente al virus de Ébola y/o a sus efectos se inició alrededor de 2002, existiendo algunos agentes experimentales de entre los que destacan TKM-Ébola, favipiravirin, BCX 4430 y “ZMapp” (World Health Organization, 2014).

“Zmapp” es un biofármaco con 3 anticuerpos monoclonales recombinantes. Resulta de la mezcla de los anticuerpos más eficientes de otros dos cócteles: a) el “MB-003”, creado por Mapp Biopharmaceutical (San Diego, USA) en colaboración con el Instituto de Investigaciones Médicas en Enfermedades Infecciosas del Ejército de EE.UU.; y b) el “ZMab”, desarrollado por Defyrus Inc. (Toronto). En ambos casos los anticuerpos se produjeron en plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con cepas de *Agrobacterium* portadoras de vectores virales deconstruidos, si bien se utilizó el sistema MagnICON en el caso de “MB-003” y el sistema Geminiviral en el de “ZMab”. En cuanto a la eficiencia de ambos fármacos, el “MB-003” protegió al 100% de los primates no humanos infectados cuando se les administró tras 1 h de ser expuestos al virus del Ébola, y al 67% cuando se les suministró a los 2 días (Olinger *et al.*, 2014). Igualmente, el 100% de macacos expuestos al virus y tratados 1 día después con “ZMab” sobrevivieron (Qiu *et al.*, 2012). Estos y los resultados de otros ensayos (Pettitt *et al.*, 2013, Qiu *et al.*, 2013) animaron a las dos empresas a firmar un consorcio, Leaf Biopharmaceutical (San Diego), en el que participan también el Gobierno de EE.UU. y la Agencia de Salud Pública de Canadá. El consorcio promovió el desarrollo de “ZMapp”, tratamiento que combina los anticuerpos 13C6 de “MB-003”, y 2G4 y 4G7 de “ZMab”. Los tres son producidos a gran escala mediante “magnificación” por la empresa Kentucky BioProcessing (**Fig. 5**). 8-10 días después de realizar la “magnificación” en *N. benthamiana*, los anticuerpos se extraen de las plantas, se purifican y se utilizan para formular “ZMapp”. El tratamiento se aplica en forma de suero al paciente enfermo para proporcionarle inmunidad pasiva.

Cuando el brote de Ébola estalló en 2014, “ZMapp” estaba siendo ensayado en primates no humanos. Los buenos resultados y la urgencia por buscar un tratamiento que frenara la epidemia, hicieron que la Organización Mundial de la Salud (OMS) aprobara en julio de 2014 su empleo en dos cooperantes estadounidenses infectados por el virus. En ambos se produjo la reversión de la enfermedad. También se ensayó en un misionero español infectado, pero este falleció, probablemente por el estado avanzado en que se encontraba la EVD y por la edad del paciente.

Siguiendo la cronología de ensayo de “ZMapp”, la OMS aprobó el 12 de agosto de 2014 su uso en África como tratamiento experimental frente a la EVD, considerando la situación en el continente. A finales del mismo mes, se publicaron los resultados definitivos de los experimentos realizados en *macacos Rhesus*, con una recuperación del 100% de los 18 animales que habían sido infectados con el virus y a los que se les aplicó el suero con “ZMapp” 5 días después (Qiu *et al.*, 2014). En febrero de 2015, el Instituto Nacional de Salud de EE.UU. dio permiso para que el Instituto Nacional de Enfermedades Alérgicas e Infecciosas iniciara un ensayo clínico que concluirá a finales de 2016. En octubre de 2015 la FDA modificó la categoría de “ZMapp” de medicamento huérfano a medicamento de aprobación rápida, lo que permitirá acelerar su salida a mercado en nuevas situaciones de urgencia.

Conclusión

En los últimos años, la agricultura molecular se ha destacado como una plataforma prometedora en la producción de proteínas recombinantes de uso farmacológico. En el amplio escenario que ofrecen las plantas, encontramos distintos sistemas y metodologías con diversas características, que los hacen aptos para un propósito concreto. En la búsqueda de un sistema que dé respuesta a una demanda de productos terapéuticos como anticuerpos, de forma rápida y con elevados rendimientos, la metodología que más se ajusta en base de los datos analizados anteriormente es la llamada “magnificación”.

Bibliografía

- Chen, Q. 2008. Expression and purification of pharmaceutical proteins in plants. *Biological Engineering* 1:291-321.
- Chen, Q. y Lai, H. 2013. Plant-derived virus-like particles as vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 9:26-49.
- Chen, Q., He, J., Phoolcharoen, W. y Mason, H.S. 2011. Geminiviral vectors based on

- bean yellow dwarf virus for production of vaccine antigens and monoclonal antibodies in plants. *Human Vaccines* 7:331-338.
- Chen, Q., Lai, H., Hurtado, J., Stahnke, J., Leuzinger, K y Dent, M. 2013. Agroinfiltration as an effective and scalable strategy of gene delivery for production of pharmaceutical proteins. *Advanced Techniques in Biology & Medicine* 1:103.
- Choi, W.Y., Hong, K.J., Hong, J.E. y Lee, W.J. 2015. Progress of vaccine and drug development for Ebola preparedness. *Clinical and Experimental Vaccine Research* 4:11-16.
- Chung, S.M., Vaidya, M. y Tzifira, T. 2006. *Agrobacterium* is not alone: gene transfer to plants by viruses and other bacteria. *Trends In Plant Science* 11:1-4.
- Dohi, K., Nishikori, M., Tamai, A., Ishikawa, M., Meshi, T. y Mori, M. 2006. Inducible virus-mediated expression of a foreign protein in suspension-cultured plant cells. *Archives of Virology* 151:1075-1084.
- García, D.J. 2010. Plantas como fábricas de proteínas recombinantes humanas. *Cultura del Cuidado Enfermería* 7:39-50.
- Gelvin, S.B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 67:14701-14706.
- Giritch, A., Marillonnet, S., Engler, C., van Eldik, G., Botterman, J., Klimyuk, V. y Gleba, Y. 2006. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 103:14701-14706.
- Gleba, Y., Klimyuk, V. y Marillonnet, S. 2005. Magniffection - a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* 23:2042-2048.
- Gleba, Y., Klimyuk, V. y Marillonnet, S. 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 18:134-141.
- Gleba, Y., Marillonnet, S., y Klimyuk, V. 2004. Engineering viral expression vectors for plants: the “full virus” and the “deconstructed virus” strategies. *Current Opinion in Plant Biology* 7:182-188.
- Grimsley, N., Hohn, B. y Walden, R. 1986. “Agroinfection”, an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:3282-3286.
- He, J., Lai, H., Brock, C. y Chen, Q. 2012. A novel system for rapid and cost-effective production of detection and diagnostic reagents of the West Nile virus in plants. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2012:1-10.
- Huang, Z., Chen, Q., Hjelm, B., Arntzen, C. y Mason, H. 2009. A DNA replicon system for rapid high-level production of virus-like particles in plants. *Biotechnology and*

- Bioengineering* 103:706-714.
- Huang, Z., Phoolcharoen, W., Lai, H., Piensook, K., Cardineau, G., Zeitlin, L., Whaley, K.J., Arntzen, C., Mason, H. y Chen, Q. 2010. High-level rapid production of full-size monoclonal antibodies in plants by a single-vector DNA replicon system. *Biotechnology and Bioengineering* 106:9-17.
- Lai, H., He, J., Engle, M., Diamond, M.S. y Chen, Q. 2012. Robust production of virus-like particles and monoclonal antibodies with fminiviral replicon vectors in lettuce. *Plant Biotechnology Journal* 10:95-104.
- Lai, H., Engle, M., Fuchs, A., Keller, T., Johnson, S., Gorlatov, S., Diamond, M.S. y Chen, Q. 2010. Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats West Nile virus infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 107:2419-2424.
- Loza-Rubio, E. y Gómez-Lim, M.A. 2006. Producción de vacunas y otros compuestos biológicos en plantas transgénicas. *Veterinaria México* 37:441-455.
- Maliga, P. 2004. Plastid transformation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 55:289-313.
- Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V. y Gleba, Y. 2005. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnology* 23:718-723.
- Marillonnet, S., Giritch, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V. y Gleba, Y. 2004. In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 101:6852-6857.
- Nester, E.W. 2015. *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. *Frontiers in Plant Science* 5:730.
- Obembe, O.O., Popoola, J.O., Leelavathi, S. y Reddy, S.V. 2011. Advances in plant molecular farming. *Biotechnology Advances* 29:210-222.
- Olinger, G.G.Jr., Pettitt, J., Kim, D., Working, C., Bohorov, O., Bratcher, B., Hiatt, E., Hume, S.D., Johnson, A.K., Morton, J., Pauly, M., Whaley, K.J., Lear, C.M., Biggins, J.E., Scully, C., Hensley, L. y Zeitlin, L. 2012. Delayed treatment of Ebola virus infection with plant-derived monoclonal antibodies provides protection in rhesus macaques. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 109:18030-18035.
- Phoolcharoen, W., Bhoo, S.H., Lai, H., Ma, J., Arntzen, C.J., Chen, Q. y Mason, H.S. 2011. Expression of an immunogenic Ebola immune complex in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnology Journal* 9:807-816.
- Potera, C. 2012. Vaccine manufacturing gets boost from tobacco plants. Canada-based

- Medicago opens U.S. facility to exploit its influenza vaccine production method. *Genetic Engineering and Biotechnology News* 32:8-10.
- Qiu, X., Audet, J., Wong, G., Pillet, S., Bello, A., Cabral, T., Strong, J.E., Plummer, F., Corbett, C.R., Alimonti, J.B. y Kobinger, G.P. 2012. Successful treatment of Ebola virus-infected cynomolgus macaques with monoclonal antibodies. *Science Translational Medicine* 4:138-181.
- Qiu, X., Audet, J., Wong, G., Fernando, L., Bello, A., Pillet, S., Alimonti, J.B. y Kobinger, G.P. 2013. Sustained protection against Ebola virus infection following treatment of infected nonhuman primates with ZMab. *Scientific Reports* 3.
- Qiu, X., Wong, G., Audet, J., Bello, A., Fernando, L., Alimonti, J.B., Fausther-Bovendo, H., Wei, H., Aviles, J., Hiatt, E., Johnson, A., Morton, J., Swope, K., Bohorov, O., Bohorova, N., Goodman, C., Kim, D., Pauly, M.H., Velasco, J., Pettitt, J., Olinger, G.G. Whaley, K., Xu, B., Strong, J.E., Zeitlin, L. y Kobinger, G.P. 2014. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with “Zmapp”. *Nature* 514:47-53.
- Santi, L., Batchelor, L., Huang, Z., Hjelm, B., Kilbourne, J., Arntzen, C.J., Chen, Q. y Mason, H.S. 2008. An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles. *Vaccine* 26:1846-1854.
- Vitale, A. y Pedrazzini, E. 2005. Recombinant pharmaceuticals from plants: the plant endomembrane system as bioreactor. *Molecular Interventions* 5:216-225.
- World Health Organization 2014. Potential Ebola therapies and vaccines. *WHO consultation on potential Ebola therapies and vaccines: background document for participants*.
- Wylie, S.J., Zhang, C., Long, V., Roossinck, M.J., Koh, S.H., Jones, M.G., Iqbal, S. y Li, H. 2015. Differential responses to virus challenge of laboratory and wild accessions of Australian species of *Nicotiana*, and Comparative analysis of RDR1 gene sequences. *PloS One* 10.
- Xu, J., Dolan, M.C., Medrano, G., Cramer, C.L. y Weathers, P.J. 2012. Green factory: plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnology Advances* 30:1171-1184.
- Zhang, X. y Mason, H. 2006. Bean yellow dwarf virus replicons for high-level transgene expression in transgenic plants and cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 93:271-279.