

Wissenschaftliches Gutachten im Rahmen des
TA-Projektes „Grüne Gentechnik - transgene
Pflanzen der 2. und 3. Generation“

Eignung von transgenen Pflanzen zur Produktion von oralen Vakzinen

Gutachten im Auftrag des Deutschen Bundestags,
vorgelegt dem Büro für Technikfolgen-Abschätzung
beim Deutschen Bundestag

Freiburg, im Dezember 2004

Katja Moch
Dr. Jennifer Teufel

Öko-Institut e.V.
Geschäftsstelle Freiburg
Postfach 50 02 42
D-79028 Freiburg
Tel.: 0761-4 52 95-0

Büro Darmstadt
Rheinstraße 95
D-64295 Darmstadt
Tel.: 06151-8191-0

Büro Berlin
Novalisstraße 10
D-10115 Berlin
Tel.: 030-28 04 86 80

1	Einleitung	1
	Rahmen des Gutachtens	2
2	Methoden	3
3	Grundsätzliche Probleme bei der oralen Gabe von Vakzinen	4
	Vermeidung oraler Toleranz	6
4	Stand der Forschung der Produktion von oralen Vakzinen in transgenen Pflanzen dargestellt anhand zweier Fallbeispiele	7
4.1	Impfstoff gegen Hepatitis B	7
	4.1.1 Prinzipielle Machbarkeit	7
	4.1.2 Verwendete Pflanzenarten und Transgenexpression	8
	4.1.3 Proteincharakterisierung	10
	4.1.4 Immunantwort bei Mäusen bei oraler Gabe von HBsAg in transgenen Pflanzen	12
	4.1.5 Immunantwort bei Menschen nach oraler Gabe von HBsAg in transgenen Pflanzen	14
	4.1.6 Forschungsdefizite und Ausblick.....	15
4.2	Impfstoff gegen enterotoxisches <i>E. coli</i>	18
	4.2.1 Verwendete Pflanzenarten und Transgenexpression	18
	4.2.2 Proteincharakterisierung	20
	4.2.3 Immunisierung mit LT-B produzierenden transgenen Pflanzen	20
	4.2.3.1 Transgene Kartoffeln mit LT-B als essbarer Impfstoff	21
	4.2.3.2 Transgener Mais mit LT-B als essbarer Impfstoff	22
	4.2.4 Forschungsdefizite und Anwendung	24
5	Sind transgene Pflanzen für die Produktion von oralen Vakzinen geeignet?	25
5.1	Schwankende Transgenexpression	25
5.2	Unzureichende Proteincharakterisierung	27
5.3	Unterschiedliche Ergebnisse zur Immunisierung	28
5.4	Unklare Abgrenzung zur Ausbildung oraler Toleranz	30
5.5	Anwendungsorientierte Diskussion	30
5.6	Ausblick und alternative Routen zur mukosalen Immunisierung .	33
	Zusammenfassung	34
6	Literatur	36

1 Einleitung

Im Humanmedizinbereich werden heute 25 Impfstoffe verwendet (Ogra et al. 2001). Davon werden fast alle parenteral, d.h. unter Umgehung des Verdauungstraktes, appliziert. Nur wenige Impfstoffe werden oral verabreicht.

Neben dem oralen Polio-Impfstoff (Sabin), dem oralen Typhusimpfstoff Ty21a (Vivotif von Berna Biotech), einem Cholera-Impfstoff (zellulärer Impfstoff bzw. B-Untereinheit; Dukoral von Powderjet Pharmaceuticals), einem abgeschwächter Cholera-Lebendimpfstoff CVD 103-HgR (Orochol von Berna Biotech) und einem nasalen Influenza-Impfstoff (FluMist von MedImmune/Wyeth) (Tacket 2004) sind in den USA sind zusätzlich orale Vakzine gegen Rotaviren und Adenoviren zugelassen (Fooks 2000; Russel-Jones 2000). Ein gegen Rotaviren 1998 zugelassener Impfstoff wurde allerdings von dem Unternehmen, das den Impfstoff vertrieb, zurückgezogen, weil als Nebeneffekt Intussusceptionen, ein teleskopartiges Ineinanderschieben des Darms, aufgetreten waren. Die Impfung gegen eine Infektion mit Adenoviren wird nur an Militärrekruten und deren Familien eingesetzt. In Deutschland besitzen orale Impfstoffe gegen Poliomyelitis (Kinderlähmung) und gegen Typhus eine Zulassung (<http://www.rki.de/INFEKT/INFEKT.HTM>). 1998 wurde allerdings die Empfehlung des Einsatzes von oralen Polio-Vakzinen aufgehoben, da es in Zusammenhang mit der oralen Polio-Lebendimpfung in Deutschland jährlich zu ein bis zwei Vakzine-assoziierten paralytischen Poliomyelitis-Erkrankungen gekommen war (RKI 2004). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) erklärte Europa im Bericht vom Juli 2002 als poliofrei (WHO 2002). Das Robert Koch Institut (RKI) empfiehlt trotzdem eine Routine-Impfung, allerdings mit einem zu injizierenden Impfstoff mit inaktivierten Polio-Erregern.

Generell stellen die Schleimhaut im Gastrointestinaltrakt und die Schleimhaut der Atemwege die „Eingangspforte“ für die meisten Humanpathogene dar. Der mukosalen Immunisierung, d. h. dem Impfschutz der Schleimhaut selber, wird deshalb ein großes Potential zur Krankheitsprävention eingeräumt. Eine mukosale Immunisierung wird an den Schleimhäuten selbst ausgelöst. Die orale Route ist dabei eine von mehreren Möglichkeiten.¹

Für eine Impfung können einerseits attenuierte (abgeschwächte) oder abgetötete Krankheitserreger, andererseits antigen² wirkende Untereinheiten verwendet werden. Für die oben erwähnten Schluckimpfungen werden abgeschwächte Erreger oder bestimmte nicht virulente Stämme der Erreger verwendet (Fooks et al. 2000). Für Schluckimpfungen wurden bisher keine antigen wirkenden Untereinheiten eingesetzt. Generell können antigen wirkende Untereinheiten aus den Erregern isoliert und aufgereinigt werden oder in gentechnisch veränderten Mikroorganismen oder tierischen Zellkulturen hergestellt und aufgereinigt werden (Mäkelä 2000). Es findet aber auch Forschung und Entwicklung dahingehend statt, orale Vakzine in transgenen Pflanzen zu produzieren. Prinzipiell sind pflanzliche Zellen in der Lage, komplexere Proteine, wie dies Antigene in Regel sind, herzustellen. Voraussetzung ist, dass die Gene, die für diese Proteine codieren, charakterisiert sind und geeignete Genkonstrukte, mit denen die pflanzliche Zelle transformiert werden kann, zur Verfügung

¹ Prinzipiell lässt sich ein Impfschutz der Schleimhaut an allen Schleimhäuten auslösen. Besonders intensiv wird die nasale Route untersucht (Bellanti et al. 2001); siehe auch Kapitel 5.

² Antigene werden als körperfremd erkannt und lösen eine Immunreaktion oder Immunantwort aus. Sie heißen Antigene, weil sie die Bildung von spezifisch gegen sie gerichteten Antikörpern hervorrufen können. Die meisten Antigene sind Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und Komplexe aus diesen Molekülklassen.

stehen. Bei Vakzinen ist zudem von großer Bedeutung, dass die Antigene in der richtigen dreidimensionalen Struktur produziert werden, damit sie einen Impfschutz garantieren.

Transgene Pflanzen (bzw. das transgene Pflanzengewebe), die orale Vakzine produzieren, sollen dabei als „Vehikel“ für die antigen wirkenden Untereinheiten fungieren, damit das Antigen unbeschadet in den Darm gelangt. Als mögliche „Vehikel“ werden auch andere Techniken diskutiert, beispielsweise sollen „Bio-Kapseln“, wie Liposome, Mikropartikel, virusähnliche Partikel oder Mikroorganismen das Antigen bis zum Darm bringen (Daniell et al. 2001b; Webster et al. 2003). Eines der wichtigsten Ziele, das man sich durch die Produktion von oralen Impfstoffen in transgenen Pflanzen zu erreichen erhofft, ist, dass die transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenteile roh oder nur teilweise prozessiert als essbare Impfstoffe verabreicht werden können. Dadurch sollen u.a. die teure Isolierung und Aufbereitung des Antigens entfallen (siehe Kapitel 5). Bei den wenigen Untersuchungen, die bislang am Menschen mit oralen Vakzinen aus transgenen Pflanzen stattgefunden haben³, wurden stets transgenes Pflanzengewebe direkt oder nur leicht prozessiert verabreicht (siehe Tabelle 5).

Sollen in Zukunft transgene Pflanzen zur kommerziellen Produktion von oralen Vakzinen eingesetzt werden, muss eine ausreichende Produktqualität gesichert sein. Kriterien dabei sind eine kontrollierte und korrekte Translation sowie eine korrekte Faltung und Prozessierung des Vakzins. Im Fall, dass das pflanzliche Gewebe direkt als Impfstoff verwendet werden soll, muss eine stabile und stets gleich starke Expression des Transgens garantiert sein. Darüber hinaus muss gewährleistet sein, dass eine definierte Dosis des Antigens im Darmtrakt kontrolliert ausgeliefert wird.

Das vorliegende Gutachten betrachtet, inwieweit transgene Pflanzen qualitativ gute orale Vakzine produzieren und ein standardisierbares Produkt liefern können. Dafür wurden die in wissenschaftlichen Fachzeitschriften erschienenen Veröffentlichungen daraufhin ausgewertet, ob in den Forschungsgruppen die entsprechenden Probleme adressiert und untersucht wurden. Es wurde geprüft, ob eine angemessene Risikoforschung und eine Sicherung der Produktqualität statt findet. An zwei Fallbeispielen, nämlich beim Impfstoff gegen Hepatitis B sowie gegen enterotoxisches *Escherichia coli*, wurden die veröffentlichten Untersuchungen daraufhin ausgewertet, ob eine stabile Antigenproduktion gesichert ist, ob die intrazelluläre Speicherung untersucht wird (die beeinflusst, wie viel Antigen in aktiver Form vorliegt), und welche Ergebnisse die Untersuchungen zur Immunisierung lieferten.

Rahmen des Gutachtens

Das Büro für Technikfolgenabschätzung im Deutschen Bundestag führt seit November 2003 das Technikfolgen-Abschätzungs-Projekt „Grüne Gentechnik – transgene Pflanzen der 2. und 3. Generation“ durch, das sich auf die Teilmenge der transgenen Pflanzen mit geänderten Nutzungseigenschaften konzentriert. Das vorliegende Gutachten gehört zur zweiten Phase des Projektes, in dem vertiefend das „*Molecular Farming* – Probleme und Lösungsansätze“ bearbeitet wird. Transgene Pflanzen im Bereich des *Molecular Farming* können unterschiedlichen Nutzungszielen zugeordnet werden: das Ziel der Produktion veränderter Inhaltsstoffe in transgenen Pflanzen als *Functional Food* oder für Futtermittel,

³ Dabei handelt es sich um Prüfungen der klinischen Phase I, die aus einer Prüfung an wenigen gesunden Probanden besteht.

transgenen Pflanzen, die Rohstoffe für die Industrie oder pharmazeutische Stoffe produzieren sollen, oder das Ziel der Sanierung von beispielsweise belasteten Böden durch transgene Pflanzen und zuletzt transgene Zierpflanzen mit beispielsweise verlängerter Haltbarkeit. Das vorliegende Gutachten bearbeitet im Bereich „*Pharming*“ (Pharmazeutika-Produktion) die Impfstoffproduktion in transgenen Pflanzen, die Wirksamkeit und Eignung von Impfstoffen für die orale Verabreichung im allgemeinen, sowie die Dosierbarkeit oraler Impfstoffe bei Verzehr von „Impfstoff-Pflanzen“ als essbare Impfstoffe im besonderen.

2 Methoden

Forschung und Entwicklung zur Produktion von oralen Vakzinen in transgenen Pflanzen findet vor allem durch universitäre Forschergruppen statt (siehe auch Hüsing 2004), so dass davon auszugehen ist, dass die jeweiligen Untersuchungen veröffentlicht werden. In dem Gutachten wurden deshalb die in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlichten Artikel zu diesem Themenkomplex, insbesondere zu den zwei Fallbeispielen Hepatitis B und enterotoxisches *E. coli*, ausgewertet. Dazu wurde eine umfangreiche Literaturrecherche in verschiedenen Datenbanken (Web of Science (Science Citation Index Expanded), Medline + PreMedline + BIOSIS + Journals@Ovid; Biological Abstracts / BIOSIS Previews; Current Contents Connect) durchgeführt. Ergänzend wurde eine allgemeine Internetrecherche eingesetzt.

3 Grundsätzliche Probleme bei der oralen Gabe von Vakzinen

Prinzipiell besteht die Möglichkeit, Vakzine oral zu geben. Der derzeitige limitierte Einsatz von oralen Vakzinen liegt an grundsätzlichen Problemen bei Schluckimpfungen: Das Vakzin muss den Wirkort im Darm erreichen und dort eine systemische und mukosale Immunantwort auslösen.

Das Vakzin muss unbeschadet (d.h. nicht verändert) das proteolytische Milieu des Magens überstehen und in aktiver und wirksamer Form in den Darm gelangen. Als Möglichkeiten, der Degradation des Impfstoffes zu begegnen, werden als „Vehikel“, die u. U. miteinander kombinierbar sind, Liposome, Mikropartikel, virusähnliche Partikel oder Mikroorganismen diskutiert (Daniell et al. 2001b; Webster et al. 2003). Aber auch transgene Pflanzen, die ein entsprechendes Vakzin synthetisieren, sollen in Teilen direkt verabreicht werden. Die Zellwände des transgenen Pflanzengewebes sollen das Vakzin schützen. In der Pflanzenzelle gebunden soll das Vakzin unbeschadet in den Darm gelangen und dort sukzessive während des Abbauprozesses des Pflanzengewebes abgegeben werden. Generell müssen Formulierungen des oralen Vakzins eigentlich standardisiert sein. So fordert Brayden (2001) etwa, dass das orale Vakzin in Partikeln kleiner als 1 µm formuliert wird. Für diese muss eine *In-vitro*-Entlassung der aktiven Antigene nachgewiesen werden, d.h. dass die Partikel das Antigen nachweislich auch in künstlichem Medium entlassen. Die Entlassung der Antigene sollte erst nach drei bis sechs Stunden nach der Einnahme erfolgen, d.h. nicht vor der Magenpassage stattfinden.

Eine zweite Schwierigkeit bei der oralen Impfung besteht darin, dass das Antigen in den erforderlichen Konzentrationen durch das Darmepithel gelangt und dort eine der mukosalen und systemischen Immunantworten auslöst. Folgendes Problem besteht bei der Passage des Darmepithels: Die Epithelzellen im Darm regulieren und begrenzen die Aufnahme von Substanzen, darunter auch die von Antigenen. Das Epithel des Magen-Darm-Trakts ist nur durchlässig für kleinste Moleküle. Dies sind in der Regel Verdauungsprodukte. Von den Antigenen, die mit der Nahrung zugeführt werden, werden nur 0,002 % von der Schleimhaut unverändert absorbiert (Jungi 2002). Die spezifischen Antigen-sammelnden M-Zellen machen weniger als 1 % der Darmepithelzellen aus und liegen oft innerhalb der Darmzotten, d.h. sind schlechter zugänglich. Ein weiteres Hindernis für die Aufnahme von oralen Vakzinen besteht in dem Schleim, mit dem das Darmepithel ausgekleidet ist (Moingeon et al. 2002; Ogra et al. 2001; Russell-Jones 2000). Da die Partikelaufnahme durch M-Zellen sehr gering ist, müssen entsprechend hohe Dosen verabreicht werden. Brayden (2001) proklamiert, dass sich aus Ergebnissen mit Mäusen die Faustregel ableiten lässt, dass eine 100fach höhere Dosis des oralen Vakzins im Vergleich zur Injektion eine 100fach geringere Immunantwort bewirkt.

Allerdings basieren diese Aussagen über eine Partikelaufnahme von M-Zellen beim Menschen auf einer schwachen Datengrundlage. Dies liegt vor allem auch daran, dass auf diesem Forschungsgebiet kaum standardisierte Methoden verwendet werden. Die Datenlage zur Partikelaufnahme bei Mäusen ist nach Brayden (2001) wesentlich besser. Deren Ergebnisse, nach denen < 0,01 % biologisch abbaubarer Mikropartikel an die Darmwand binden, lassen sich aber nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen: Beim

Hintergrund: Darm-assoziiertes Immunsystems

Im Darmepithel gibt es spezifische Antigen-sammelnde Zellen, sogenannte M-Zellen. Die M-Zellen nehmen endozytotisch Antigene aus dem Darmlumen auf und transportieren sie weiter zu dem darunter liegenden lymphatischen Gewebe, den Peyer'schen Platten. Darin findet die Antigen-spezifische Stimulation von T-Helferzellen und die Aktivierung von T- und B-Zellen statt. Als Zytokine, Botenstoffe zwischen den Immunzellen, finden sich dabei zumeist der Transforming-growth-factor- β sowie Interleukin-10, die eine Bildung von IgA-Antikörpern anregen. Die IgA-Antikörper werden in das Darmlumen sekretiert und verhindern dort die Interaktion des Pathogens mit der Oberfläche des Darmepithels.

Serumantikörper (IgG) werden in der Regel nicht gebildet. Prinzipiell können die M-Zellen auch die IgG produzierenden Suppressorzellen stimulieren. Es gibt auch Moleküle, die an Darmepithelzellen binden, von diesen aufgenommen und weitergegeben werden. Dadurch gelangen diese Moleküle in den Blutkreislauf und können eine systemische Immunantwort und die Bildung von IgG auslösen. Diese sogenannten Adjuvantien, immunstimulierende Stoffe, wurden besonders bei Pathogenen charakterisiert, die schwere Durchfallerkrankungen auslösen.

Zwischen den verschiedenen mukosalen Abwehrsystemen besteht ein Zusammenhang. IgA-B-Zellen, die im Darm gebildet werden, rezirkulieren ins Blut und wandern auch in die Schleimhaut anderer Organe ein. Umgekehrt erreicht eine nasale Immunisierung eine effiziente gastrointestinale Schutzwirkung. Generell ist die Immunisierung der Schleimhäute an den induzierten Stellen allerdings wesentlich stärker als an weiter entfernten Orten. Insbesondere die mukosale Immunisierung im Urogenitaltrakt scheint recht unabhängig zu sein.

Quellen: Moingeon et al. 2002; Ogra et al. 2001; Russell-Jones 2000.

Menschen wird im Vergleich zu kleinen Tieren eine gegebene Impfdosis stärker im Darm verdünnt. Zudem ist die Durchlaufgeschwindigkeit und die Stärke der Schleimproduktion, sowie die Anzahl der M-Zellen bei Menschen starken interindividuellen Schwankungen unterlegen und teilweise auch vom Alter abhängig (Brayden 2001).

Um die Aufnahme von Antigenen zu verbessern, gibt es die Möglichkeit, Adjuvantien, immunstimulierende Stoffe, hinzuzufügen. Das einzige Adjuvans, das im humanmedizinischen Bereich zugelassen ist, ist Alaun (Aluminiumsalze)⁴. Aluminiumsalze wirken aber nur bei Injektionen als Adjuvans und nicht bei oraler oder nasaler Gabe (Petrovsky & Aguilar 2004). Bei oralen Vakzinen fungieren Adjuvantien nicht nur allgemein als immunstimulierender Stoff sondern auch als Träger, um das gewünschte Antigen durch das Darmepithel zu schleusen. Für diese Aufgabe eignen sich im Grunde bestimmte Proteine von Krankheitserregern, die den Darm besiedeln, wie etwa das Cholera-Toxin. Das Cholera-Toxin verursacht aber lokale oder systemische nachteilige Effekte (Mäkelä et al. 2000). In ihrer nativen Form ist es deshalb in der Humanmedizin nicht einsetzbar. Ein bestimmter

⁴ Die Aluminiumsalze sollen bei Injektionen ein Antigen Depot formen und daraus die Antigene langsam entlassen. Allerdings sind Aluminiumsalze ein schwaches Adjuvans und können allergene Reaktionen hervorrufen (Petrovsky & Aguilar 2004).

nicht-toxischer Stamm des Cholera-Erregers wird derzeit in klinischer Prüfung intranasal auf seine immunstimulierende Wirkung getestet (Webster et al. 2003). Kirk et al. (2004) schlagen die Verwendung von Extrakten aus dem Seifenrindenbaum *Quillaja saponaria* aus der Familie der Rosaceae als orale Adjuvans vor, um damit eine Formulierung mit dem transgenen Pflanzengewebe vorzunehmen. Solche Saponinen-Extrakte sind zumindest in den USA im Bereich der Lebensmittelzusatzstoffe als Schaumbildner in Getränken zugelassen. Der Extrakt „Quil A“, der etwa 25 Saponine aus *Quillaja saponaria* enthält, wird in der Veterinärmedizin als Adjuvans verwendet. Für den parenteralen Gebrauch in der Humanmedizin wird der Saponinen-Extrakt aber als zu toxisch angesehen (Webster et al. 2003). Allgemein muss bei Vakzinen auch das Adjuvans-Antigen-Gemisch toxikologische Tests durchlaufen (Petrovsky & Aguilar 2004).

Für eine routinemäßige Anwendung der oralen Impfung steht nach Brayden (2001) generell eine Standardisierung der Impfmethodik aus. Neben einer standardisierten Formulierung des oralen Vakzins in Partikeln muss nach Brayden (2001) ebenfalls die Rezeptorbindung, also der Mechanismus, wie das Antigen durch das Darmepithel gelangt, geklärt sein. Dazu gehört auch der Beweis der Rezeptorbindung bei Anwesenheit von Schleim. Um ein normiertes orales Vakzin zur Verfügung zu stellen, muss außerdem die Stimulation der mukosalen und systemischen Immunantwort gezeigt und die Bildung spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Erforderlich ist nicht zuletzt, dass ein angemessener Impfschutz, d.h. eine langfristige Immunantwort, nachgewiesen ist (Brayden 2001).

Vermeidung oraler Toleranz

Neben der mukosalen Immunantwort mit Bildung von IgA-Antikörpern oder der systemischen Immunantwort mit der Bildung von Serum-IgG kann es auch zu einer Entwicklung von mukosaler Toleranz kommen. Generell kann eine Zufuhr hoher Antigenmengen eine Nichtreaktion des Immunsystems auf bestimmte Antigene bewirken. Die orale Toleranz ist allerdings ein aktiver Prozess, der mit einer Immunaktivierung beginnt und in eine aktive Immununterdrückung oder ein allmähliches Nichtreagieren auf das Antigen bei herabgesetzter Immunlage münden (Stanley 2002). Die Entwicklung von Toleranz wurde bei einer Reihe von Antigenen demonstriert (Ogra et al. 2001). Auslöser ist zunächst die Dosis des Antigens. Dabei kann orale Toleranz mehrfache Fütterung einer geringen Antigen-Dosis oder durch eine einmalige Fütterung einer hohen Antigen-Dosis ausgelöst werden (Stanley 2002). Die Ursache der Induktion von oraler Toleranz ist darin begründet, wie Antigene prozessiert und den T-Zellen präsentiert werden. Es besteht aber auch ein Zusammenhang zwischen bestimmten Zytokinen und der Ausprägung oraler Toleranz (Ogra et al. 2001). Insgesamt ergaben Untersuchungen zum Zusammenhang von oraler Toleranz und Zytokinen aber widersprüchliche Ergebnisse (Stanley 2002). Nach Shalaby (1995) sollen Liposaccharide, eigentlich Adjuvantien, die Ausprägung von oraler Toleranz fördern. Cholera-Toxin hingegen soll die Ausprägung oraler Toleranz herabsetzen (Moingeon et al. 2002). Die Mechanismen, wie eine orale Toleranz ausgelöst und aufrecht erhalten wird, sind nicht vollständig aufgeklärt. Bisher ist demnach auch nicht geklärt, wie die Gefahr einer möglichen Toleranz gegenüber dem Antigen bei oraler Gabe des Antigens ausgeschlossen werden kann.

4 Stand der Forschung der Produktion von oralen Vakzinen in transgenen Pflanzen dargestellt anhand zweier Fallbeispiele

Anhand von zwei Fallbeispielen soll die Forschung zu oralen Impfstoffen aus transgenen Pflanzen dargestellt werden. Dies sind der Impfstoff gegen Hepatitis B und der Impfstoff gegen enterotoxisches *Escherichia coli*. Die Produktion beider Impfstoffe in transgenen Pflanzen wird schon länger verfolgt, nämlich seit Anfang, respektive Mitte der 1990er Jahre. Es wurden jeweils bereits klinische Prüfungen der Phase I durchgeführt, das heißt, es wurden erste Untersuchungen der Wirksamkeit an einigen wenigen gesunden Probanden durchgeführt.

4.1 Impfstoff gegen Hepatitis B

Hepatitis B ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten. Für das Jahr 2000 liegen Schätzungen der WHO vor, nach der weltweit 5,2 Millionen Personen akut an Hepatitis B erkrankt waren (WHO 2002). Die Zahl der chronischen Träger des Hepatitis-B-Virus wird auf 350 Millionen geschätzt (Poovorawan et al. 2002; Alter 2003). Hepatitis B ist bei 60 bis 80 % der Fälle von primärer Leberzirrhose und Leberzellkarzinomen als Ursache verantwortlich (WHO 2002).

Auf dem Markt erhältlich sind rekombinante Impfstoffe, die mit gentechnisch veränderter Hefe hergestellt werden (Kirk et al. 2004). Dies waren die ersten rekombinanten Impfstoffe, die in der Humanmedizin verwendet wurde. Es sind Untereinheitsimpfstoffe mit dem kleinen Oberflächenantigen HBsAg (*Hepatitis B Surface Antigen*), das Partikel mit der Größe von 22 nm bildet (Ellis & Gerety 1989). Das wichtigste immunogene Epitop des Antigens wird „A Determinant“ genannt (siehe dazu Kapitel 4.1.3).

In den Untersuchungen zur Produktion von Hepatitis-B-Impfstoff in transgenen Pflanzen wurde dementsprechend HBsAg als Antigen gewählt.

4.1.1 Prinzipielle Machbarkeit

Erste Ansätze für dessen Herstellung in transgenen Pflanzen wurden bereits Anfang der 1990er Jahre verfolgt: Mason et al. (1992) transformierten Tabak als Modelnpflanze, um die Durchführbarkeit der Produktion von HBsAg in transgenen Pflanzen auszutesten, da sich Tabakzellen leicht transformieren lassen. Thanavala et al. (1995) untersuchten die Immunogenität der HBsAg aus den zwei transgenen Tabaklinien von Mason et al. (1992) an Mäusen. Dazu wurde aus den transgenen Tabakblättern das gesamte lösliche Protein extrahiert und, entsprechend formuliert, als Injektionslösung verwendet. Die Impfdosis betrug 0,5 µg HBsAg aus transgenem Tabak und in der Kontrollgruppe 0,5 µg HBsAg aus Hefe. Das HBsAg aus transgenem Tabak löste auf einem leicht geringeren Level eine qualitativ ähnliche spezifische Antikörperbildung aus wie der handelsübliche Impfstoff aus Hefe. Thanavala et al. (1995) schlossen daraus auf eine korrekte Faltung des Antigens: Die B- und

T-Zell-Epitope⁵ müssten ähnlich sein wie im Impfstoff aus Hefe. Eine derart indirekte Proteincharakterisierung, also über das Auslösen einer Immunantwort, überwiegt allgemein bei den Untersuchungen zur Produktion von HBsAg in transgenen Pflanzen. Im Vordergrund der meisten Arbeiten stand vor allem das Bestreben, die Synthese des HBsAg-Proteins in transgenen Pflanzen zu erhöhen. Die Arbeit von Mason et al. (1992) stellt die erste Untersuchung zur Produktion von Vakzinen in transgenen Pflanzen dar und wird entsprechend oft vor allem als Machbarkeitsstudie („*Proof of Principle*“) zitiert. Transgene Pflanzen als essbare Impfstoffe herzustellen formulierten Mason et al. (1992) als eigentliches Ziel.

4.1.2 Verwendete Pflanzenarten und Transgenexpression

Mason et al. (1992) verwendeten Tabak, weil sich Tabakzellen leicht transformieren lassen. Wegen des hohen Alkaloidgehalts kann Tabak bei Menschen aber nicht als essbarer Impfstoff verwendet werden. In den meisten anderen Untersuchungen zur Produktion von HBsAg in transgenen Pflanzen wurden deshalb Kartoffeln als Produktionssystem verwendet. Außerdem wurden als Produktionssystem von HBsAg noch Salat (Kapusta et al. 1999; Kapusta et al. 2001) und *Cherry Tomatillo* (Erdbeertomate, *Physalis ixocarpa*, Gao et al. 2003)⁶ verwendet.

Vergleicht man die verschiedenen Untersuchungen zu transgenen Kartoffellinien, fallen zuerst die Schwankungen in der Produktionsmenge von HBsAg zwischen verschiedenen Linien und ebenfalls zwischen Pflanzen einer Transformationslinie auf (siehe Tabelle 1). Dies ist insofern von Bedeutung, als dass das Pflanzengewebe direkt verfüttert wird. In die Tabelle wurden die Untersuchungen von Domansky et al. (1995) und Ehsani et al. (1997) an transgenen Kartoffeln nicht aufgenommen. Domansky et al. (1995) und Ehsani et al. (1997) legten in ihren Untersuchungen vor allem Wert auf gewebsspezifische Unterschiede in der HBsAg-Produktion und gaben keine Expressionsschwankungen an. Die maximale Konzentration von HBsAg lag bei etwa 0,00080 % des gesamten löslichen Proteins (TSP) in Blättern und etwa 0,00060 % TSP in den Knollen (Ehsani et al. 1997).

Mit dem Ziel, die Produktionsmenge von HBsAg in Kartoffelknollen zu steigern, verglichen Richter et al. (2000) und Joung et al. (2004) die Auswirkung unterschiedlicher Konstrukte. Generell stellten Richter et al. (2000) und Joung et al. (2004) zwischen verschiedenen Transformationslinien, die mit demselben Konstrukt transformiert worden waren, große Schwankungen in der Expression fest. Solche Unterschiede können von der Anzahl der Konstruktkopien in einer transgenen Pflanze, also von Faktoren auf genetischer Ebene, ebenso wie von epigenetischen Effekten abhängen, die besonders bei der Stilllegung von Genen auffallen (siehe dazu Kapitel 5).

Die unterschiedlichen Konstrukte von Richter et al. (2000) enthielten teilweise eine Sequenz zur Verstärkung der Translation (TEV), alternative Polyadenylierungssignale (des *Soy Vegetative Storage Protein*, *vsp*, oder die *pin*-Sequenz aus der Kartoffel) oder ein Retentionssignal, das HBsAg in das endoplasmatische Retikulum steuert und dort hält (SEKDEL). Die alternativen Polyadenylierungssignale erhöhten die HBsAg-Produktion

⁵ Ein Epitop ist eine Stelle auf einem Antigen, die von einem Antikörper erkannt wird. Man bezeichnet sie auch als antigene Determinante.

⁶ Beide Produktionssysteme haben aber den Nachteil, dass sie nur wenig Protein produzieren und entsprechend große Mengen gegessen werden müssten.

signifikant. Dies weist drauf hin, dass post-translationale Effekte stark auf die Expressionshöhe einwirkten. Das heißt in diesem Fall, dass die einzelnen mRNA-Kopien länger im Cytoplasma intakt blieben und abgelesen wurden. Generell zeigte sich nämlich bei Richter et al. (2000) keine eindeutige Korrelation zwischen dem mRNA-Level und der HBsAg-Proteinkonzentration bei verschiedenen Kartoffellinien, die mit einem Vektor transformiert worden waren. Der Grund dafür könnte ebenfalls in epigenetischen Effekten liegen und zwar, dass große Mengen an Transkripten ab einem bestimmten Schwellenwert eine post-transkriptionelle Stilllegung des Gens auslösen können (Iyer Lakshminarayan et al. 2000).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Joung et al. (2004), die verschiedene Promotoren verglichen. Die Linien mit dem CaMV-35-S-Promotor zeigten zwar eine hohe Transkription, d.h. hohe mRNA-Level. Trotzdem ergaben sie eine niedrige Proteinproduktion. Der Patatin-Promotor als knollenspezifischer⁷ Promotor zeigte im Vergleich einen wesentlich geringeren mRNA-Level, auch bei 3 Transgenkopien in einer Linie, erbrachte aber eine höhere Proteinkonzentration.

Tabelle 1: Expressionsschwankung von HBsAg in transgenen Kartoffellinien.

Quelle	Kartoffellinie und Sequenzen des Konstrukts, die die Expression erhöhen sollen	Expression in Knolle	Anzahl der Transgenkopien	mRNA Level
Richter et al. 2000	HB103: CaMV35S+TEV HB 105: CaMV35S+TEV+SEKDEL HB106: CaMV35S+TEV+vspαS HB107: CaMV35S+TEV+vspαL HB110: CaMV35S+TEV+TPSS HB104: CaMV35S+TEV+VSP3' HB111: CaMV35S+TEV+Ω HB114: CaMV35S+TEV+pinII3'	pHB103: 0,005 - 0,025 % TSP pHB105: 0,01 - 0,049 % TSP pHB106: 0,015 - 0,032 % TSP pHB107: 0,005 - 0,047 % TSP pHB111: 0,007- 0,034 % TSP pHB114: 0,0001 - 0,024 % TSP Maximal: pHB103: 0,33 µg/g pHB104: 6,5µg/g pHB105: 1,25µg/g pHB106: 0,8µg/g pHB107: 2,4 µg/g pHB110: 0 µg/g pHB111: 0,33µg/g pHB114: 16 µg/g Frischgewicht pHB114-16: 0,25 % TSP	Nicht untersucht	Für verschiedene Linien von pHB104 dargestellt; mRNA-Level korreliert nicht mit HBsAg Konzentration.
Kong et al. 2001	pHB114-16	Keine Angabe zur Schwankung; durchschnittlich 8,35 µg/g Frischgewicht	Nicht untersucht.	Nicht untersucht.
Smith et al. 2003	pHB114-16	82 ± 9 µg/g Frischgewicht	4	Nicht untersucht.
Joung et al. 2004	D: Double 35S M: CaMV35S P: Patatin Promotor	D12: 0,03 % ± 0,003 TSP M11: 0,04 % ± 0,06 TSP P5: 0,1 % ± 0,01 TSP P8: 0,11 % ± 0,003 TSP	D12: 3 M11: 3 P5: 1 P8: 1	Beim 35 S Promotor mRNA Level höher und Proteinkonzentration niedriger

Legende: TSP = gesamtes lösliches Protein

Die Kartoffellinie pHB114-16 von Richter et al. (2000) wurde nachfolgend von Kong et al. (2001) und Smith et al. (2003) verwendet. Sie wiesen in ihren Untersuchungen jeweils sehr unterschiedliche Level an HBsAg nach. Da sie dieselben Extraktionsmethoden verwendeten,

⁷ Der Patatin Promotor bewirkt eine Transkription, die sich hauptsächlich auf die Knolle beschränkt. Als Vergleich: Der CaMV 35 S Promotor ist eher ein konstitutiver Promotor und bewirkt in allen Pflanzengewebe eine Transkription.

müssen die Expressionsunterschiede zwischen transgenen Pflanzen einer Linie liegen (siehe Tabelle 1).

Ein weiteres Problem, das sich bei den Versuchen zeigte, war, dass bei hohen Expressionsmengen Schädigungen an den transgenen Pflanzen auftraten. Diejenigen Kartoffel-Linien, die bei Richter et al. (2000) die höchste Expressionsmenge aufwiesen, zeichneten sich durch schlechteres Wachstum aus. Das bedeutet geringere Ernten und damit keinen Nutzen aus der hohen Produktionsmenge an HBsAg. Die Autoren führen dies auf phytotoxische Effekte von HBsAg zurück. Ab welcher Konzentration Schädigungen durch HBsAg an transgenen Kartoffelpflanzen auftreten, ist nicht klar. Generell treten bei hoher Expression heterologer Proteine⁸ immer wieder Schädigungen an den transgenen Pflanzen auf (Langridge 2001). Eine Produktion heterologer Proteine in transgenen Pflanzen ist also nicht beliebig steigerbar.

Die Expressionsschwankungen bei den transgenen Kartoffeln hatten zur Folge, dass die Fütterungsversuche mit Mäusen, bei denen eine Menge von 5 g frischer Knolle gewählt wurde, in sehr unterschiedlichen Impfdosen mündete (siehe dazu Kapitel 4.1.4).

Neben den Untersuchungen an transgenen Kartoffeln führten Smith et al. (2002a u. b, 2003) Untersuchungen an Suspensionskulturen von Soja- und Tabakzellen durch. Smith et al. (2002b) stellten in den Sojazellkulturen eine HBsAg-Produktion bis zu 65 µg/g Frischgewicht fest. Bei den Tabakzellen stellten sie hingegen nur eine Produktion von etwa 9 µg/g Frischgewicht fest, wobei die Produktion stark vom Alter der Zellkulturen abhing. Als Ursache für die geringe Produktion von HBsAg in Tabak nennen die Autoren eine *Down-Regulation* der Transgenexpression, also ebenfalls epigenetische Effekte, die eine Stilllegung des Transgens bewirken, gingen dem aber nicht weiter nach.

4.1.3 Proteincharakterisierung

Für eine Standardisierung von Partikeln, die oralen Impfstoff enthalten, hier bei transgenem Pflanzengewebe, ist es entscheidend zu klären, wie viele Antigene in aktiver bzw. in nicht aktiver Form vorliegen. Bei Pflanzen wird dies vor allem von der intrazellulären Speicherform bestimmt. Bei den Untersuchungen von Thanavala et al. (1995) und Richter et al. (2000) an Mäusen sowie bei den Untersuchungen von Kapusta et al (1999) und Thanavala et al (2000) an Menschen wurde die intrazelluläre Speicherform nicht untersucht; die Proteincharakterisierung blieb hier nur indirekt: Die Autoren charakterisierten das Antigen ausschließlich dadurch, dass es eine Immunantwort auslöste.

Kong et al. (2001) führten als erste elektronenmikroskopische Untersuchungen durch, um den intrazellulären Speicherort des HBsAg in transgenen Kartoffelknollen zu klären. In den Aufnahmen zeigten sich ungewöhnliche membrangebundene, ca. 17 nm große Vesikel, die sich mit Antikörpern spezifisch färben ließen. Solche Partikel werden von polymerisierten HBsAg-Proteinen gebildet⁹. Kong et al. (2001) vermuteten, dass die membrangebundenen Vesikel aus dem endoplasmatischen Retikulum abstammen. Das HBsAg tritt nämlich als Lipoproteinpartikel auf, da es drei hydrophobe Regionen, die durch zwei hydrophile Regionen getrennt sind, enthält. Die hydrophoben Regionen finden sich intrazellulär im oder gebunden an die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) (Mangold et al. 1997).

⁸ Heterologe Proteine: Proteine, die sonst nicht in diesem Organismus synthetisiert werden.

⁹ In den Leberzellen von akut an Hepatitis B erkrankten Patienten und in der gentechnisch veränderten Hefe bilden sich diese Partikel mit einem Durchmesser von 20 bis 22 nm.

Nach Huovila et al. (1992) treten HBsAg-Partikel in Säugerzellen allerdings in „Post-ER, Pre-Golgi“-Kompartimenten auf, die keine Protein-Disulfid-Isomerasen enthalten. Dies ist für die Bildung der oligomeren Partikel, die 20 bis 22 nm groß sind, entscheidend. Ob es sich in den transgenen Pflanzenzellen um vergleichbare Vesikel ohne Enzyme, die spezifisch Disulfidbrücken spalten, handelte, untersuchten Kong et al. (2001) nicht. Dies ist allerdings relevant dafür, wie stabil das HBsAg in den Pflanzenzellen über die Zeit ist.

Smith et al. (2002a und b, 2003) führten weitere Untersuchungen an Suspensionskulturen von Soja- und Tabakzellen durch, um zusätzlich zu elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit poly- und monoklonalen Antikörpern und Gradientenanalyse die intrazelluläre Speicherform aufzuklären. Die monoklonalen Antikörper richteten sich gegen das wichtige immunogene Epitop des HBsAg, das „A Determinant“, während die polyklonalen Antikörper auch andere Oberflächenstrukturen auf dem HBsAg-Protein erkennen, die nicht so stark durch die Konformation spezifiziert sind wie das „A Determinant“. In den Sojazellen konnten von Smith et al. (2002b) nur 6 % des HBsAg, wobei die Gesamtmenge mit polyklonalen Antikörpern bestimmt wurde, von monoklonalen Antikörpern detektiert werden. Bei Tabak waren 37 % der HBsAg-Proteine auch mit monoklonalen Antikörpern nachweisbar. Die Immunogenität des HBsAg scheint also verändert, d.h. dass zumindest die dreidimensionale Struktur des Proteins unterschiedlich zum HBsAg aus der Hefe sein muss. Dies kann teilweise an der unterschiedlichen Partikelbildung liegen, müsste aber weiter untersucht werden. Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation (Rohrzuckergradient) nach verschiedenen Extraktionsprotokollen zeigten Smith et al. (2002b), dass HBsAg innerhalb der Pflanzenzelle kaum in Partikelform vorliegt. Vielmehr formen sich nach Extraktion in dem entsprechenden Detergenz erst die Partikel. Zum größten Teil schien HBsAg in den Pflanzenzellen in der Membran des endoplasmatischen Retikulums gebunden und dadurch geschützt. Fraglich ist nach diesem Ergebnis, wie das in der Membran gebundene HBsAg im Darm entlassen wird und ob es sich dort zu den immunogenen Partikeln formieren kann.

Mit Hilfe der Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass in transgenen Kartoffeln und transgenen Sojazellen auch ein größeres Protein von 27 kD im Vergleich zu 24 kD des HBsAg aus der Hefe auftrat (Smith et al 2002a und b). Dabei könnte es sich um die glykosylierte Form des HBsAg handeln, das auch in Säugerzellen zu einem gewissen Anteil auftritt (Huovila et al 1992). Diese glykosilierte Form fand sich allerdings nicht in den transgenen Tabakzellen. Das HBsAg besitzt zumindest eine Glykosilierungsstelle, wobei das Glucan nicht wichtig für die Immunogenität von HBsAg ist (Gerlich & Bruss 1993; Smith et al. 2002a). Zu klären bliebe trotzdem, ob eventuell eine unterschiedliche Glykosilierung in Pflanzen einen Einfluss auf die Immunogenität haben kann.¹⁰

Bei der transgenen Kartoffellinie HB114-116 fanden Smith et al. (2003) neben HBsAg mit einem höherem Molekulargewicht in den Blättern der Kartoffelpflanzen Partikel mit einem Durchmesser von 14 bis 15 nm, die damit kleiner waren als die Partikel in der Kartoffelknolle. Den Ursachen dafür gingen die Autoren nicht weiter nach. Bei den transgenen Kartoffeln waren 21 % des HBsAg mit monoklonalen Antikörpern nachweisbar.

Smith et al. (2002a) setzten die Versuche zur Stabilität des HBsAg fort und untersuchten

¹⁰ Die ersten Reaktionsschritte der N-Glykosilierung im endoplasmatischen Retikulum sind in Pflanzen und Menschen gleich, dann aber treten Unterschiede in der Spezifität der beteiligten Glycosyltransferasen sowie ein unterschiedlicher Abbau der Zuckerketten auf (Hüsing 2004). Pflanzenproteine besitzen keine terminalen Galactose- und Sialinsäure-Reste. Die α -(1,3)-Fucose bei Pflanzen ist bei Tieren 1,6 verknüpft. Zudem besitzen Pflanzen im Gegensatz zu Säugern die β -(1,2)-Xylose (Ma et al. 2003).

zusätzlich zu den Soja- und Tabakzellkulturen auch transgene Kartoffelknollen und Tomatenfrüchte¹¹. In vergleichenden Extraktionsversuchen variierten sie den Anteil an Detergentien. Dabei verhielt sich das pflanzliche HBsAg nicht so stabil, wie dies die Forscher erwartet hatten. Daraus schlossen sie, dass die pflanzlichen HBsAg in Partikelform nicht so stark quervernetzt ist, wie dies bei aus Plasma isoliertem HBsAg der Fall ist. Das genaue Ausmaß der Quervernetzung der HBsAg-Partikel aus Pflanzen analysierten Smith et al. (2002a) nicht weiter.

Dogan et al. (2002)¹² stellten in ihren Untersuchungen an transgenen Kartoffeln fest, dass die Struktur des HBsAg zusätzlich durch die Lipid-Protein-Interaktion beeinflusst werden kann, d.h. dass seine Konformation in und an der Membran des endoplasmatischen Retikulums jeweils von transgener Pflanze zu Pflanze variieren kann. Allerdings beeinflussen die Art und das Verhältnis der Lipidkomponenten wiederum die Immunogenität des HBsAg (Gavilanes et al. 1982).

Eine bislang ungelöste Frage bei der Produktion von HBsAg in transgenen Pflanzen ist also, zu welchem Anteil das HBsAg aktiv vorliegt und ob es in seiner Assoziation in und an der Membran des endoplasmatischen Retikulums über die Zeit stabil bleibt. Beide Punkte wurden bisher nicht abschließend geklärt. Bislang erscheint es aber so, dass das HBsAg nur zu einem geringen Teil aktiv vorliegt. Fraglich ist, ob im Darm und beim Abbau des Pflanzengewebes sich die immunogenen Partikel des HBsAg formen können oder ob das HBsAg vorher degradiert wird.

Auch die Stabilität von HBsAg innerhalb des Pflanzengewebes ist nicht abschließend geklärt. Insgesamt wird das endoplasmatische Retikulum als oxidierende Umwelt für Proteine beschrieben (Ma et al. 2003). Nach Arakawa et al. (2001) unterstützt das endoplasmatische Retikulum die Bildung von Oligomeren, aber auch eine Akkumulation von chimären Proteinen, d.h. eine Akkumulation von ungewöhnlichen Mischproteinen. Kommt es während der Lagerung zur Schädigung von Zellen, so kann nach den Ergebnissen von Smith et al. (2002a und b) davon ausgegangen werden, dass das HBsAg von pflanzlichen Proteasen, Polyphenoloxidasen und pflanzlichen Phenolen verändert wird.

Deutlich wird an den in diesem Kapteit beschriebenen Ergebnissen allerdings, dass es entscheidend von der Pflanzenart abhängt, wie HBsAg in den transgenen Pflanzenzellen prozessiert und gespeichert wird.

4.1.4 Immunantwort bei Mäusen bei oraler Gabe von HBsAg in transgenen Pflanzen

Die Ergebnisse der bislang durchgeführten Fütterungsversuche an Mäusen zur oralen Gabe von HBsAg in transgenen Pflanzen lassen sich nur schwer vergleichen. Zum einen variiert die Impfdosis. Sie reicht von 750 ng in Lupinenkallus bei Kapusta et al. (1999) bis 42 µg bei Kong et al. (2001) in transgener Kartoffelknolle. Auch das Impfschema variiert: Kapusta et al. (1999) verfütterten einmal eine Portion transgenen Lupinenkallus. Gao et al. (2003) hingegen verfütterten täglich 20 g Erdbeertomaten, die durchschnittlich 1 µg HBsAg enthielten. Nicht klar wurde, über wie viele Tage gefüttert wurde. Lediglich die drei mit transgenen Kartoffeln

¹¹ Die Untersuchungen zur Produktion von HBsAg in transgenen Tomatenlinien sind bisher noch nicht veröffentlicht.

¹² Dogan et al. (2002) sehen ihre Untersuchungen allerdings als Vorversuche an, die eine Prozessierung der transgenen Kartoffelknollen und eine Aufreinigung des HBsAg vorsehen.

durchgeführten Fütterungsversuche folgten einem vergleichbarem Impfschema. Richter et al. (2000), Kong et al. (2001) und Joung et al. (2004) verfütterten je 5 g rohe Kartoffelknolle an Tag 0, 7 und 14. Allerdings unterschied sich jeweils die Impfdosis (siehe Tabelle 2).

Da je nach Pflanzenart das HBsAg unterschiedlich gespeichert wird, hat auch dies wiederum Einfluss auf die Immunantwort nach der Fütterung.

Tabelle 2: Fütterungsversuche an Mäusen mit rohen transgenen Kartoffelknollen, die HBsAg exprimierten

Quelle	Impfschema	Impfdosis (pro Gabe an Pflanzenge- webe)	Immunantwort	Bemerkung
Richter et al. 2000	5 g rohe Kartoffelknolle + 10 µg CT; an Tag 0, 7, 14	5,5, µg	HBsAg spezifische Antikörper nach der dritten Fütterung; Maximum von 73,25 mIU/ml in der 4. Woche. In der 10. Woche: Boost mit kommerziellem Impfstoff (0,5 µg) gesetzt: Antikörperanstieg bis zu 1.679,6 mIU/ml	Keine Positivkontrolle.
Kong et al. 2001	5 g rohe Kartoffelknolle + 10 µg CT; an Tag 0, 7, 14	42 µg	Ab dem 14. Tag erste Immunantwort; Maximum von 103mIU/ml in der 7. Woche; Nach der 11. Woche: Antikörpertiter > 10 mIU/ml. Boost durch Injektion mit HBsAg aus Hefe (0,5 µg) in der 16. Woche; Maximum > 3.000 mIU/ml Immunantworten hielten mehr als fünf Monate an Nach parenteraler Impfung mit HBsAg aus Hefe zeigten Mäuse nach Fütterung mit transgener Kartoffel ein Boost-Effekt: Maximum von 1.000 mIU/ml.	Vergleich mit oral verabreichtem Impfstoff aus Hefe löste keine Reaktion aus, keine Positivkontrolle.
Joung et al. 2004	5 g rohe Kartoffelknolle + 10 µg CT; an Tag 0, 7, 14	k. A.	Keine Entwicklung von Antikörpern gegen HBsAg während der Fütterungsversuche; Boost durch Injektion mit HBsAg aus Hefe (0,5 µg) in der 8. Woche; Maximum > 400 und 600 mIU/ml (je nach Transformationslinie) in der 11. Woche	Orale Impfung mit Hefe HBsAg (150 µg); keine Positivkontrolle.

Legende: CT = Cholera-Toxin; Boost: englisch für Anstieg, Verstärkung. Boost-Effekt oder Boosting bedeutet eine Auffrischimpfung, Wiederholungsimpfung oder Weckinjektion. Ein Boosting wird in einem längeren Zeitabstand nach der Grundimmunisierung einer einmaligen Gabe einer geringeren Antigenmenge ausgelöst, um einen langwirkenden Schutz zu erreichen. Ein Boost-Effekt ist durch einen rasch ansteigenden und lang anhaltenden effektiven Antikörper-Spiegel gekennzeichnet.

Bei den Fütterungsversuchen wurde fast immer Cholera-Toxin¹³ als Adjuvans (immunstimulierender Stoff) hinzugegeben, außer bei Gao et al. (2003) und Kapusta et al. (1999). Vergleiche ohne Zugabe von Cholera-Toxin führten nur Kong et al. (2001) durch. In der Gruppe, die transgene Kartoffelknollen ohne Cholera-Toxin erhielten, war die Immunantwort um das 70fache geringer. Die Zugabe von Cholera-Toxin als Adjuvans ist bei Menschen allerdings nicht zulässig, da sie Durchfallerkrankung auslösen kann. Eine Übertragung dieses Versuches auf Testpersonen ist deshalb nicht möglich.

Um die Immunantwort auf HBsAg zu verstärken, exprimierten Joung et al. (2004) in transgenen Kartoffeln nicht nur das HBsAg, sondern auch noch das preS2-Protein, das bei

¹³ Dies liegt vor allem an der B-Untereinheit des Cholera-Toxins, das eine besondere Affinität für bestimmte Oberflächenstrukturen des Darmepithels hat und dadurch durch das Epithel gelangen kann, um eine systemische Immunantwort auszulösen.

Menschen eine Rolle beim Anheften des Virus an Leberzellen spielt. Joung et al. (2004) versprachen sich dadurch eine erhöhte Antikörperantwort. Bei einem Fütterungsversuch an Mäusen zeigte sich keine Reaktion. Erst nach einem Boost mit 0,5 µg Impfstoff aus Hefe konnten Joung et al. (2004) erhöhte Antikörpertiter messen (siehe Tabelle 3).

Bei Kong et al. (2001) und Richter et al. (2000) dagegen löste die Fütterung nach mehreren Wochen eine Antikörperbildung aus. Die Injektion mit herkömmlichem Impfstoff löste zudem in beiden Untersuchungen einen ähnlichen Boost aus. Da Kong et al. (2001) dieselben Kartoffellinien wie Richter et al. (2000) verwendeten, kann dies als unabhängige Wiederholung gewertet werden. Leider wurden von Richter et al. (2000) und Kong et al. (2001) wie auch in anderen Fütterungsversuche mit HBsAg keine Positivkontrolle in Form von Injektionen mit dem Impfstoff aus Hefe ein. Dies ist, wenn sich die Untersuchungen als Grundlagenforschung verstehen, auch nicht erforderlich. Er erschwert aber die Einschätzung der Immunantworten in dem jeweiligen Versuchsdesign.

Gao et al. (2003) lösten mit der HBsAg produzierenden Erdbeertomate keine Entwicklung von Antikörpern gegen HBsAg aus. Die Injektion mit HBsAg aus Hefe in der 3. Woche löste auch keinen Boost aus. Lediglich bei einer anfänglichen Injektion mit herkömmlichem Impfstoff (2 µg HBsAg) wirkte HBsAg produzierende Erdbeertomate als oraler Booster.

Kapusta et al. (1999) detektierten nach einer einmaligen Fütterung mit 5 g HBsAg produzierendem Lupinenkallus einen erhöhten Antikörpertiter, der doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe war. Da sie allerdings keine Positivkontrolle einsetzten, fehlt ein Vergleichsmaßstab.

Als Fazit kann aus den Fütterungsversuchen mit Mäusen gezogen werden, dass transgene Pflanzen, die HBsAg produzieren und mit einem Adjuvans gegeben werden, eine spezifische Immunantwort auslösen können, die qualitativ ähnlich der Immunantwort mit dem Hefe-Impfstoff ist. Ob diese Immunantwort tatsächlich gegen eine Infektion schützen würden, müsste noch getestet werden. Deutlich werden auch die Unterschiede bei verschiedenen Pflanzenarten. Die ausbleibende Immunantwort bei Gao et al. (2003) und Joung et al. (2004) wurden nicht weiter verfolgt. Gao et al. (2003) sahen die Ursache in einer zu geringen HBsAg Konzentration, während Joung et al. (2004) die zu langsame Abgabe von HBsAg aus dem Kartoffelgewebe als Ursache vermuteten.

4.1.5 Immunantwort bei Menschen nach oraler Gabe von HBsAg in transgenen Pflanzen

Um der Idee von essbaren Vakzinen näher zu kommen, transformierten Kapusta et al. (1999) Lupine und Salat. In Salat erreichten Kapusta et al. (1999) eine Expressionsmenge von 1 bis 5,5 ng/g Frischgewicht. Drei freiwillige Testpersonen aßen 200 g Salat¹⁴, was einer Dosis von 0,2 bis 1 µg HBsAg entsprach, und innerhalb von 2 Monaten ein zweites Mal 150 g. Nach der zweiten Immunisierung zeigte eine der Testpersonen eine Immunantwort von 13 mIU/ml, ein zweite Testperson 18 mIU/ml. Bei der dritten Person wurde ein Antikörpertiter von 3 mIU/ml fest gestellt. Warum die dritte Versuchsperson nicht stärker reagierte, blieb unklar. Nach vier Wochen war bei allen drei Testpersonen das Antikörperniveau wieder unter das erforderliche Level von mindestens 10 UI/l, das einen Schutz gegen eine Hepatitis B-Infektion bietet, gesunken. 10 UI/l gelten als der niedrigste

¹⁴ Die Menge entspricht fast einem ganzen Kopf Salat.

protektive Level gegen Hepatitis B. 10 UI/l gelten als „*low positiv control*“, während 100 UI/l eine „*high positive control*“ darstellen. In Untersuchungen zum Hepatitis-Impfstoff aus Hefe betrug der durchschnittliche Antikörpertiter nach drei Impfungen 1.523 UI/l (Hauser et al. 1987).

In 2001 wiederholten Kapusta et al. den Versuch mit zwölf Testpersonen, die dreimal eine Menge von 200 g Salat verzehrten. Im transgenen Salat betrug die Impfdosis mit HBsAg in der ersten Gabe 0,51 µg, in der zweiten Gabe 0,78 µg und in der dritten Gabe 0,94 µg. Nach zwei Gaben zeigten alle sieben Testpersonen, die transgenen Salat gegessen hatten, eine Immunantwort von 1,0 bis 3,6 UI/l, die danach auf fast null zurückging. Nach der dritten Gabe stieg die Immunantwort wieder an, betrug aber maximal bei einer Person 6,3 UI/l.

In beiden Veröffentlichungen wurde nicht dargestellt, ob es sich bei den Antikörpern um protektive Antikörper handelt, die spezifisch an das „*A Determinant*“ binden. Die Untersuchungen sind insgesamt eher als eine Überprüfung der prinzipiellen Machbarkeit zu werten. Eine Möglichkeit der praktischen Anwendung kann daraus nicht abgeleitet werden.

4.1.6 Forschungsdefizite und Ausblick

Die Forschung zur Produktion von HBsAg in transgenen Pflanzen findet an verschiedenen Pflanzenarten statt. Einen Konsens zu einer Pflanzenart als dem besten Produktionssystem gibt es nicht. Die unterschiedlichen Ansätze weisen vielmehr auf die bislang noch ungelösten Probleme hin:

Zum einen ist in transgenen Kartoffeln - aber auch in anderen Expressionssystemen - keine ausreichende Expression erzielt worden, mit der angemessene Portion möglich wäre. Es wurde bislang keine Lösung für das allgemeine Problem der starken Expressionsunterschiede in den transgenen Pflanzen gefunden (siehe Kapitel 5.1).

Wegen der unkontrollierbaren Expressionsschwankung bei ganzen transgenen Pflanzen verweisen manche Untersuchungen auf pflanzliche Zellkulturen, weil dies ein Produktionssystem darstellt, mit dem unter definierten, kontrollierbaren und sterilen Bedingungen gearbeitet werden kann (Kumar et al. 2003). Kumar et al. (2003) untersuchten Suspensionskulturen mit Tabakzellen. Als Vorteile der Zellkulturen sehen Kumar et al. (2003) u.a. an, dass *Gene Silencing* nur in einer begrenzten Anzahl von Zellen vorkommt und sich nicht ausbreiten kann, da keine Signalübertragungen zwischen den Zellen vorkommt. Zudem lassen sich die Zellen leichter in einem hemizygoten Zustand halten. (Bei Homozygotie tritt eher *Gene Silencing* auf.) Höhere Expressionslevel wurden erzielt, wenn das HBsAg ein mikrosomales Retentionssignal enthielt (bis zu 2 µg/g Frischgewicht des Kallus oder 512 ng/mg des gesamten löslichen Proteins). Zudem wurde das HBsAg-Protein auch von den Zellen sekretiert, wenn auch nur in geringen Dosen (1 und 2 ng/ml Medium). Die Proteine wiesen die nötige Partikelform auf. Hierbei muss aber erwähnt werden, dass das Protein eigentlich kein sekretorisches Signal enthielt.

Auch Smith et al. (2002b) lobten die Produktivität besonders von Sojazellen, die eine HBsAg-Ernte von 1.700 µg/g Trockengewicht und 1 mg/l/Tag erbrachten. Von Nachteil ist jedoch die langsame Wachstumsrate bei Sojazellen, die zu einer längeren Kultivierungsphase führen. Smith et al. (2002b) sehen deshalb immer noch die ganze Pflanze als Ziel für einen Produktionsorganismus an.

Um die Menge an Impfstoff in transgenen Pflanzen in Zukunft zu erhöhen, testeten Sojikul et

al. (2003) in Tabakzellkulturen ein Fusionspeptid. Sie fusionierten das HBsAg-Gen mit einem Gen, das für das *Soybean Vegetative Storage Protein* codiert. Beide Proteine wurden als ein Fusionsprotein hergestellt und im Prozessierungsprozess nicht gespalten. Das Speichersignalpeptid erhöhte die Expression von HBsAg auf 226 µg/g des gesamten löslichen Proteins. Allerdings zeigten sich bei Auftrennung der Proteine durch Gelelektrophorese neben dem Monomer auch di-, tri- und tetramere Banden. Das bedeutet, dass das Protein ungewöhnliche Oligomere bildete.

Huang & Mason (2004) testeten eine transiente (vorübergehende) Expression von HBsAg in Blättern von *Nicotiana benthamiana* durch Infiltration mit *Agrobacterium tumefaciens*, das ein für HBsAg codierendes Konstrukt enthielt. U.a. fusionierten sie das HBsAg mit dem grün-fluoreszierenden Protein. Zwei Tage nach der Transfektion wurde das Pflanzenmaterial ausgewertet. Der Ansatz mit reinem HBsAg erbrachte eine Ernte von 74,3 µg/g des gesamten löslichen Proteins. Von dem Fusionsprotein wurden 24,7 µg/g des gesamten löslichen Proteins nachgewiesen. Allerdings wies nur das Fusionsprotein, bei dem das grün-fluoreszierende Protein am N-Terminus von HBsAg fusioniert war, eine korrekte Faltung und Antigenität auf. Dies ist bisher die einzige Untersuchung zu transienter Expression für die Produktion oraler Vakzine in transgenen Pflanzen.

Ein Aspekt, der neben der schwankenden Transgenexpression die Unsicherheit hinsichtlich der Impfdosis erhöht, ist, dass bisher noch unzureichend bekannt ist, wie das Protein im Pflanzengewebe abhängig von der Pflanzenart vorliegt und wie stabil es über die Zeit im transgenen Pflanzengewebe ist.

Ein weiteres Problem bei der oralen Impfung mit HBsAg ist, dass ohne Adjuvans eine nur sehr geringe Immunantwort erzielt wird. Für die orale Route eignen sich als Adjuvantien Toxine aus den Erregern von Durchfallerkrankungen, wie das in den Fütterungsversuchen mit transgenen Kartoffeln zugesetzte Cholera-Toxin. Dies ist aber für eine Anwendung am Menschen nicht zugelassen. Unterschiedliche Ansätze verfolgen das Problem, dass für eine orale Impfung mit transgenen Pflanzen als essbare Impfstoffe gegen Hepatitis B ein Adjuvans zugegeben werden muss:

Kirk et al. (2004) berichten von unveröffentlichten Untersuchungen von Hamilton & Brennan mit transgenen Kartoffeln, die HBsAg produzierten, die mit einem Extrakt aus dem Seifenrindenbaum *Quillaja saponaria* versetzt wurden. Sie wurden an Mäuse, die mit zwei verschiedenen Impfstoffen aus Hefe geimpft worden waren, als Boost verfüttert. Als Vergleich diente Cholera-Toxin als Adjuvans, das den transgenen Kartoffeln zugesetzt wurde. Die Formulierung mit Extrakt aus *Quillaja saponaria* zeigte einen Boosting-Effekt, der bei einem Impfstoff höher lag als bei den transgenen Kartoffeln mit Cholera-Toxin. Ob dies nicht möglicherweise an unterschiedlichen Antigenkonzentrationen in den transgenen Kartoffeln liegen kann, wird bei Kirk et al. (2004) nicht deutlich. Die Menge des Extrakts aus *Quillaja saponaria* betrug 10 mg und verschärft das Dosisproblem bei oralen Vakzinen eher: Auf menschliche Versuchspersonen hochgerechnet, macht dies eine Dosis von 26 g Adjuvans (bei 65 kg) notwendig. Dies ist für Menschen oder große Tiere nicht praktikabel zu verabreichen. Darüber hinaus enthält der Extrakt „Quil A“ *Quillaja saponaria* immer noch etwa 25 verschiedene Saponine, deren Konzentration oder Zusammensetzung je nach Quelle oder Anbieter schwanken kann. Dies steht dem Anspruch nach möglichst hoher

Reinheit eines Vakzins entgegen. Kirk et al. (2004) sehen deshalb den Einsatz von Extrakten aus *Quillaja saponaria* auch nur in Systemen, die weniger komplex sind als Pflanzen.

Ein abschließendes Fazit findet sich in Kapitel 5.

4.2 Impfstoff gegen enterotoxisches *E. coli*

Enterotoxische *Escherichia coli* Bakterien (ETEC) sind die Hauptursache für schwere Durchfallerkrankungen bei Kleinkindern in Entwicklungsländern (WHO 2002). Darüber hinaus sind ETEC neben anderen bakteriellen und viralen Erregern Ursache für den sogenannten Reise-Durchfall. Gegen ETEC gibt es weltweit bisher noch keinen Impfstoff. Ein Impfstoff aus Cholera-Toxin kombiniert mit fünf verschiedenen abgetöteten ETEC-Stämmen befindet sich in der klinischen Phase III.¹⁵ Daneben soll eine neue Impftechnologie, die transkutane Immunisierung, gegen ETEC erfolgreich in Menschen getestet worden sein (WHO 2002).

Das Antigen des ETEC ist die hitzelabile B-Untereinheit LT-B. Diese ist der B-Untereinheit des Choleraerregers zu 80 % ähnlich. Pentamere aus LT-B binden über eine spezifische Interaktion an die Oberfläche des Darmepithels, und zwar an die G_{M1}-Ganglioside (Russell-Jones 2000, Ogra et al. 2001), davon wiederum speziell an G_{M1}-Ganglioside der M-Zellen (u.a. Mäkelä 2000)¹⁶. Die Bindung vermittelt eine Passage durch das Darmepithel, so dass das LT-B in die Blutbahn gelangt und dort eine systemische Immunantwort auslösen kann. Das LT-B kann deshalb selbst als Adjuvans charakterisiert werden. Das bedeutet, dass bei oraler Gabe von LT-B keine zusätzlichen Adjuvantien notwendig sind.

4.2.1 Verwendete Pflanzenarten und Transgenexpression

Das LT-B wurde anfangs in transgenem Tabak und dann vor allem in transgenen Kartoffeln produziert. In der oft zitierten Untersuchung von Haq et al. (1995) wurden Extrakte aus transgenen Tabakblättern und sowie rohe transgene Kartoffelknollen, die LT-B exprimierten, an Mäuse verfüttert. Mit transgenen Kartoffeln, die LT-B produzierten, wurden 1998 die ersten klinischen Studien eines essbaren Impfstoffes durchgeführt. In den letzten Jahren fokussierten verschiedene Untersuchungen in Zusammenarbeit mit der Firma Prodigene auf transgenen Mais als Produktionssystem von LT-B. Maiskörner, auch in roher Form, sind für Menschen zumindest leichter bekömmlich als rohe Kartoffelknollen.

Die Untersuchungen an transgenen Kartoffeln zeigten dieselben starken Schwankungen in der Transgenexpression, wie dies für die Produktion von HBsAg in transgenen Kartoffeln bereits berichtet wurde (siehe Tabelle 3).

Bei einer transgenen Kartoffellinie mit einer hohen LT-B-Produktion stellten Mason et al. (1998) ein verringertes Wachstum und eine schlechtere Ernte fest. Als Ursache nannten die Autoren Positionseffekte¹⁷ der inserierten Konstrukte. Darüber hinaus soll allerdings auch das LT-B selbst einen wachstumsinhibierenden Effekt besitzen. Bei hoher Produktion von HBsAg in transgenen Kartoffeln hatten sich ebenfalls Schädigungen gezeigt.

Mason et al. (1998) berichten, dass nach dreimonatiger Lagerung der transgenen Kartoffeln bei 4°C keine verminderte Wirkung des LT-B festzustellen war. Die Ergebnisse dazu wurden

¹⁵ Für Prüfungen in der klinischen Phase III, die letzte Phase vor einer Zulassung, muss die Wirksamkeit an einem großen Patientenkollektiv unter Einsatz einer Vergleichssubstanz durchgeführt werden.

¹⁶ Die spezifische M-Zellen-Bindung hält Brayden (2001) allerdings für eine unbewiesene Hypothese.

¹⁷ Die Funktion und Regulation eines Gens ist u.a. abhängig von seiner Position im Genom. Transgene werden an verschiedenen Orten im Genom inseriert. Das ist ein Grund, weshalb die Stärke der Genexpression sehr unterschiedlich ausfällt. .

allerdings nicht genauer dargestellt.

Tabelle 3: Expressionsschwankung von LT-B in transgenen Kartoffellinien

Quelle	Besondere Elemente / Struktur des Vektors, die die Expression erhöhen sollen	Expression In Knolle	Anzahl der Transgenkopien	mRNA-Level
Haq et al. 1995	CaMV 35 S + TEV; ER-Retentionssignal	pLTB-110: fast null bis 0,0038 % TSP pPLTK-110: 0,006 – 0,011 % TSP	Nicht untersucht	Nicht untersucht
Mason et al. 1998	CaMV 35 S; Codon optimiert (zur Verbesserung der Translation)	TH110-8: 4,2 - 7,1 µg/g TH110-51: 7,3 - 17,2 µg/g Frischgewicht	Nicht untersucht	Bei den Linien TH110-8 und TH110-51 korrelierte der mRNA-Level mit der HBsAg Konzentration; bei Linien mit geringern HBsAg gab es keine derartige Korrelation.
Tacket et al. 1998	CaMV 35 S; Codon optimiert (zur Verbesserung der Translation)	TH110-51: 3,7 – 15,7 µg/g Frischgewicht	Nicht untersucht	Nicht untersucht
Lauterslager et al. 2001	patatin-Promoter, ER-Retentionssignal; Codon-optimiert für Solanaceen	0,1 -17 µg/g Frischgewicht	Nicht untersucht	Nicht untersucht

Legende: TEV = Sequenz zur Verstärkung der Translation

Die Produktion von LT-B in transgenem Mais testeten zuerst Chikwamba et al. (2002a). Sie verwendeten dazu einen Vektor mit dem Maiskorn-spezifischen Zein-Promotor, einem Codon-optimierten LT-B-Gen sowie dem Polyadenylierungssignal des *Soy Vegetative Storage Protein*. Mit diesem Genkonstrukt stellten Chikwamba et al. (2002a) verschiedene Linien her. 9 Linien wiesen einen Anteil des LT-B von < 0,01 %, 8 Linien von 0,02 bis 0,05 % und 2 Linien von > 0,05 % am gesamten löslichen Protein auf. Chikwamba et al. (2002a) wählten aus verschiedenen Gründen das Korn als Produktionsort für den Impfstoff. Unter anderem werden Proteine in den reifen Samen in spezialisierten Vakuolen aufbewahrt. Diese stellen eine stabile Umwelt dar, da sie innerhalb der Zellen von Enzymen getrennt und geschützt sind. Wie schon bei den o.g. Versuchen mit transgenen Kartoffeln ist auch bei transgenem Mais die große Variation der LT-B Produktion zwischen den Linien ersichtlich. Noch stärkere Expressionsunterschiede ergaben sich in der Körnerernte der nachfolgenden Generationen:

Die erste Körnerernte aus den transgenen Maispflanzen wurde in den Untersuchungen von Chikwamba et al. (2002a u. b) wieder ausgesät. Ein Teil der Pflanzen wurde selbstbestäubt und ein Teil mit nicht-transgenem Pollen bestäubt. In etwa einem Drittel der Körner der R2-Generation stellten Chikwamba et al. (2002a) eine höhere Expression fest als in den Körnern der R1-Generation. In einem anderen Teil der Maiskörner wurde eine Abnahme der Expression von R1 nach R2 fest gestellt. Insgesamt vergrößerte sich die Variation der Transgenexpression. Woran dies im einzelnen liegt, klärten Chikwamba et al. (2002a) nicht weiter auf. Dazu hätten die Kopienanzahl und die Vererbung analysiert werden müssen.

In einer zweiten Untersuchung stellten Chikwamba et al. (2002b) durchgehend eine Erhöhung der LT-B-Expression von den R2-Maiskörnern im Vergleich zu den R1-Maiskörnern fest. In einer Linie war die LT-B-Expression in der R2-Generation bis zu hundertfach höher. Die R2-Körner wiesen einen LT-B-Gehalt von 0,127 bis zu 2,761 % des

gesamten wasserlöslichen Proteins auf. Die R2-Körner säten Chikwamba et al. (2002b) im Freiland aus. In den im Freiland erhaltenen R3-Körnern variierte die LT-B-Expression zwischen 0,19 und 3,66 % des gesamten wasserlöslichen Proteins. Hohe Variationen traten auch zwischen Körnern an einem Kolben auf. Dies stellt besonders dann ein Problem bei der Verwendung oralen Impfung mit transgenem Mais, wenn jeweils ein Korn als Impfdosis verabreicht werden soll.

Die Ursachen dieser großen Unterschiede können zum einen in der Stilllegung der Transgene liegen. *Gene Silencing* des Transgens kann unabhängig über mehrere Generationen hinweg auftreten (Kohli et al. 1999; Ohrend et al. 1991). Post-transkriptionelles *Gene Silencing* ist meiotisch hingegen nicht stabil, das heißt, dass es nicht weiter vererbt wird (Matzke et al. 2001). Im Freiland sind die transgenen Pflanzen im Gegensatz zum Gewächshaus Umwelteinflüssen unterworfen, die ebenfalls epigenetische Effekte hervorrufen können (für Zusammenfassungen siehe Lips 1998 und Pickardt & de Kathen 2002).

Um die Produktion von LT-B in Maiskörnern zusätzlich zu erhöhen, testeten Streatfield et al. (2003) verschiedene Sequenzen, um das LT-B in verschiedene Zellkompartimente zu leiten, nämlich in die Vakuole, an die Zelloberfläche, in das endoplasmatische Retikulum, in den Zellkern, in die Plastiden und (ohne eine spezifische Sequenz) in das Cytoplasma. Die maximale Anreicherung des LT-B wurde in der Vakuole erreicht. Bei solchen transgenen Pflanzen machte das LT-B 12 % des gesamten löslichen Proteins aus. Bei den Proteinen wurde nicht die immunogene Wirkung in Fütterungsversuchen untersucht. Deshalb bleibt fraglich, ob LT-B in der Vakuole, in der diverse pflanzliche Inhaltsstoffe gespeichert werden, in aktiver Form vorliegt und in der Vakuole stabil gelagert ist oder dort möglicherweise degradiert wird. Die stabile Lagerung des LT-B untersuchten Lamphear et al. (2002) in entfetteten Maiskeimlingen, in denen LT-B bis 400 Tage nachweisbar war. Fütterungsversuche wurden nicht dazu nicht durchgeführt.

4.2.2 Proteincharakterisierung

Chikwamba et al. (2003) untersuchten die subzelluläre Speicherform von LT-B in von ihnen hergestellten transgenen Maissamen. Dabei fanden sie das LT-B in den Maissamen ausschließlich in den Stärkekörnern. Über die Hälfte des LT-B im Endosperm soll assoziiert an die Stärke vorliegen. Dadurch, dass das LT-B innerhalb der Stärkekörner gebunden war, zeigte es sich resistent gegen Pepsin-Verdau. Der Mechanismus, wie das LT-B als Zellkern-codiertes Protein in die Stärkekörner exportiert wird, ist noch nicht aufgeklärt.

Ein Vergleich von Extraktionsprotokollen zeigte, dass eine wachsende Inkubationstemperatur zu einer erhöhten Entlassung des LT-B führte, d.h. desto mehr LT-B konnte nachgewiesen werden. Aufgrund dessen waren die Autoren nicht in der Lage, die exakte Menge an monomerem LT-B fest zu stellen. In Bakterien liegt 40 % des LT-B als Pentamer vor. Unklar ist zudem, ob das LT-B in den Stärkekörnern monomer oder als funktionelles Pentamer (mit G_{M1}-Gangliosid-Bindungsstelle) vorliegt.

4.2.3 Immunisierung mit LT-B produzierenden transgenen Pflanzen

Ähnlich wie im ersten Fallbeispiel ergibt sich bei den Fütterungsversuchen mit transgenen LT-B produzierenden Pflanzen kein einheitliches Ergebnis. Vorteilhaft bei ETEC ist, dass bei Mäusen nicht nur die Bildung von Antikörpern untersucht, sondern darüber hinaus auch der

Schutz vor einer Infektion getestet werden kann. Dafür wird den Mäusen das Holotoxin aus dem enterotoxischen *E. coli* oder das Cholera-Toxin oral verabreicht. Sind die Mäuse nicht immun, erleiden sie Durchfall. Dann tritt Wasser in den Darm ein. Das Verhältnis von Darmgewicht zu Restkadaver ist ein Gradmesser für die Immunität.

Im Folgenden werden die Untersuchungen von transgenen Kartoffeln und transgenem Mais getrennt aufgeführt. Da die Speicherung des LT-B von der Pflanzenart abhängt, unterscheiden sich die Ergebnisse zwischen den Fütterungsversuchen mit LT-B aus transgenen Kartoffeln und transgenem Mais deutlich.

4.2.3.1 Transgene Kartoffeln mit LT-B als essbarer Impfstoff

Bei den drei Fütterungsversuchen mit LT-B produzierenden transgenen Kartoffeln waren jeweils die Impfdosis wie auch das Impfschema unterschiedlich. Die Immunantworten waren aber durchgehend schwach. Haq et al. (1995) wie auch Lauterslager et al. (2001) vermuten, dass das LT-B im transgenen Kartoffelgewebe sterisch anders vorliegt oder derart gespeichert ist, dass es bei der Verdauung nicht wirksam wird. Da es keine Untersuchungen dazu gibt, wie das LT-B intrazellulär gespeichert wird und ob es als Monomer oder als immunogenes Pentamer vorliegt, kann nicht geklärt werden, warum die Ergebnisse der Immunantworten, die mit transgenen Kartoffeln erzielt wurde, von den Ergebnissen mit transgenem Mais abweichen.

Tabelle 4: Fütterungsversuche an Mäusen mit rohen transgenen Kartoffelknollen, die LT-B exprimierten

Quelle	Impfschema	Impfdosis (pro Gabe an Pflanzenge- webe)	Immunantwort	Bemerkung
Haq et al. 1995	5 g rohe Kartoffelknolle; an Tag 0,4,21 und 25	15 – 20 µg LT- B	Im Vergleich zu oralem bakteriellen LT-B war bei beiden Ansätzen die Immunantwort qualitativ ähnlich, aber auf geringerem Niveau.	LT-B soll von pflanzlichen Inhaltsstoffen in seiner Reaktivität gestört sein, ob dies sterisch oder chemisch ist, bleibt offen.
Mason et al. 1998	5 g rohe Kartoffelknolle; „an drei aufeinander- folgenden Wochen“	TH110-8: 20 µg TH100-51: 50 µg	IgA und IgG-Titer: bei den transgenen Kartoffeln höher als bei bakterieller LT-B; Immunitätstest durch eine Infektion mit <i>E. coli</i> ; TH110-52 nur partieller Schutz; bakterielles LT-B besserer Schutz;	
Lauterslager et al. 2001	5 g rohe Kartoffelknolle, an Tag 0, 2 und 4	~ 65µg LT-B	Bei Injektion: Vergleichbare Antikörperbildung Bei oraler Gabe der transgenen Knollen allein: keine signifikante Antikörperbildung; nach Injektion mit bakteriellem LT-B und orale Gabe als Booster: signifikanter Boostingeffekt.	Autoren vermuten eine andere Konformation des LT-B in transgenen Kartoffelknollen

Bei ihrem Fütterungsversuch mit LT-B aus transgenen Kartoffeln im Vergleich zu oralen Gabe mit bakteriellem LT-B erhielten Haq et al. (1995) eine qualitative ähnliche, aber wesentlich schwächere Immunantwort. Als Ursache für die schwächere Immunantwort vermuten Haq et al (1995), dass das LT-B möglicherweise durch andere pflanzliche Inhaltsstoffe in seiner Immunogenität gestört war.

In einem Fütterungsversuch von Mason et al. (1998) zeigten die Mäuse, die mit 5 g

transgener Kartoffelknolle an Tag 0, 7 und 21 gefüttert worden waren, einen höheren IgA- und IgG-Titer als Mäuse, die bakterielles LT-B erhalten hatten. Bei einer Testinfektion mit ETEC zeigten die mit bakteriellem LT-B immunisierten Mäuse einen besseren Schutz. Die transgene Kartoffellinie hingegen bewirkte nur einen partiellen Schutz. Die fehlende Korrelation von Antikörpertiter und Schutz gegen Infektion erklären die Autoren damit, dass in Pflanzen die Konformation des LT-B unterschiedlich sein kann, oder dass Epitope in der Nahrung anders präsentiert werden (Mason et al. 1998). In jedem Fall unterscheidet sich die Wirkung des bakteriellen LT-B von dem pflanzlichen LT-B.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Lauterslager et al. (2001): Fütterungsversuche von Lauterslager et al. (2001) bewirkten in Mäusen keine signifikante Antikörperbildung. In Mäusen, die vorher eine Impfung erhalten hatten, wirkte eine orale Dosis allerdings erfolgreich als Booster. Lauterslager et al. (2001) begründen die schwache Immunantwort damit, dass möglicherweise eine zu geringe Dosis gegeben wurde, ziehen aber auch eine Beeinträchtigung von LT-B durch das Kartoffelgewebe in Betracht. Eine weitere Erklärung bestand darin, dass das LT-B am Kartoffelgewebe sterisch anders als das bakterielle LT-B vorliegt. Das LT-B aus den transgenen Knollen wies ein höheres Molekulargewicht auf. Lauterslager et al. (2001) machten dafür das Retentionssignal verantwortlich und gingen den Ursachen nicht weiter nach.

Mit einer LT-B produzierenden Kartoffellinie waren Tacket et al. (1998) die ersten, die an Testpersonen eine klinische Prüfung mit LT-B als orales Vakzin aus transgenen Pflanzen durchführten. Dafür mussten 11 Testpersonen zunächst 50 bzw. 100 g rohe Kartoffel essen. Einige Probanden klagten über Schwindel und Durchfall. 10 Personen (91 %) zeigten einen 4fachen Anstieg im IgG-Antikörpertiter; 6 Personen zeigten einen 4fachen Anstieg im IgA-Titer. Die Immunantwort war „nicht unähnlich“ zu den Ergebnissen, die mit bakteriellem LT-B an Testpersonen erzielt worden war, aber wesentlich niedriger. Ob die mittelmäßige Immunantwort auch vor einer Infektion schützen würde, wurde natürlich nicht geklärt.

4.2.3.2 Transgener Mais mit LT-B als essbarer Impfstoff

Insgesamt wurden drei Fütterungsversuche an Mäusen mit transgenem, LT-B produzierendem Mais durchgeführt (siehe Tabelle 5; Streatfield et al. 2001; Chikwamba et al. 2002a und Lamphear et al. 2002). Es wurde bei allen drei Fütterungsversuchen eine spezifische Antikörperbildung ausgelöst. Die Immunantworten wurden jeweils in unterschiedlichen Einheiten dargestellt. In der Tabelle sind die Werte deshalb nur in Relation zu den unterschiedlichen Dosen und, soweit verwendet, zur Positivkontrolle mit bakterieller LT-B ausgedrückt. Die Impfschemata wie auch die verabreichte Impfdosis variierten.

Streatfield et al. (2001) lösten mit einer Dosis von 50 und von 5 µg LT-B in transgenen Maiskörnern eine systemische Immunantwort aus, die vergleichbar zu der Immunantwort war, die durch 50 µg bakterielles LT-B ausgelöst wurde. Die Bildung von IgA-Antikörpern war sogar höher als in der Gruppe des bakteriellen LT-B. Streatfield et al. (2001) loben diese erhöhte mukosale Immunantwort, gehen dem aber nicht weiter nach. Die Immunantwort schützte effektiv vor einer Infektion durch das Holotoxin von ETEC. Streatfield et al. (2001) gaben nicht die genaue Menge an verfütterten Körnern oder mögliche Unterschiede in der Transgenexpression an.

Einen effektiven Infektionsschutz fanden auch Chikwamba et al. (2002a). Sie infizierten die

mit transgenen Maispellets immunisierten Mäuse mit dem Cholera-Toxin und dem Holotoxin des enterotoxischen *E. coli*. Dabei bewirkte der transgene Mais einen fast gleichen Schutz wie bakterielles LT-B. Bei Infektion mit Cholera-Toxin schien der Schutz durch transgenen Mais variabler. Für diese Fütterungsversuche verwendeten Chikwamba et al. (2002a) die sogenannten R2-Körner. Sie verabreichten je 1 g transgenes Maispellet und als Kontrolle nicht-transgenes Maispellet, das mit 10 µg bakteriellem LT-B versetzt war, am Tag 0, 3, 7 und 21. Die IgG-Bildung war in der Gruppe, die transgenen Mais erhalten hatte, fast gleich hoch wie bei den mit bakteriellem LT-B gefütterten Mäusen. Die IgA-Produktion war nach dem Konsum von transgenen Maispellets, wie bei Streatfield et al. (2001), signifikant höher als bei bakteriellem LT-B, insbesondere am letzten Tag der Messung. Die Autoren vermuten dazu, dass das LT-B in Maispellets langsamer entlassen wurde oder dass in den transgenen Maispellets mehr LT-B, als durch den ELISA¹⁸-Test festgestellt, enthalten war.

Tabelle 5: Fütterungsversuche an Mäusen mit transgenen Maiskörnern, die LT-B exprimierten

Quelle	Impfschema	Impfdosis (pro Gabe an Pflanzengewebe)	Immunantwort	Bemerkung
Streatfield et al. 2001	Körner; k. A. über die Menge; an Tag 0, 7 und 21	5 oder 50 µg	Erhöhter IgG-Spiegel ab Tag 13 bei 50 und 5 µg Dosis; 50 µg in transgenem Mais löste die gleiche Immunantwort wie 50 µg bakterielles LT-B aus; IgA-Antwort bei 50 und 5 µg durch transgenen Mais höher als durch bakterielles LT-B; Bei Infektion mit LT bewirkt transgener Mais einen Schutz.	Nicht klar, wie die 50 µg bakterielles LT-B verabreicht wurde. Vergleich mit bakteriellem LT-B fehlt.
Chikwamba et al. 2002a	1 g Pellet aus gemahlene Maiskörnern; an Tag 0, 3, 7 und 21	10 – 13 µg	IgG-Bildung fast gleich hoch wie bei bakteriellem LT-B; die IgA-Produktion war signifikant höher als bei bakteriellem LT-B, insbesondere am letzten Tag der Messung 27 Bei Infektion mit LT oder CT wurde durch den transgenen Mais ein fast gleicher Schutz wie durch bakterielles LT erreicht; bei Infektion mit CT schien der Schutz durch transgenen Mais variabler.	Kontrolle: Maispellet mit 10 µg bakteriellem LT-B.
Lamphear et al. 2002	Entfettete Maiskeimlinge; 62,5 mg, 6,3 mg und 0,65 mg (Mengenangabe nicht sehr deutlich); an Tag 0, 7 und 21	33 µg, 3,3 µg und 0,33 µg LT-B	Hohe IgG-Antwort bei 33 und 3,3 µg; bei 0,33 µg geringe Immunantwort; am Tag 42 doppelt so hoch wie Kontrollgruppe; IgA Anstieg nur bei 33 und 3,3 µg LT-B höher als in der Kontrollgruppe	Keine Positivkontrolle durch bakterielles LT-B

Lamphear et al. (2002) verfütterten entfettete Maiskeimlinge, die in Messungen die höchste LT-B-Konzentration im Vergleich zu den ganzen Körnern, der Kleie oder frischen Maiskeimlingen gezeigt hatte. Sie verfütterten Dosen von 62,5 mg, 6,3 mg und 0,65 mg entfetteten Maiskeimlingen, die 33 µg, 3,3 µg und 0,33 µg LT-B enthielten, an Tag 0, 7 und 21. Bei allen Dosen zeigten die Mäuse eine systemisch Immunantwort. Der IgA-Anstieg, in Fäkalien gemessen, war bei den Impfdosen von 33 und 3,3 µg LT-B höher als in der Kontrollgruppe. Lamphear et al. (2002) setzten allerdings keine Positivkontrolle in Form von

¹⁸ ELISA = Enzyme-linked Immunosorbant Assay (Enzym-gekoppelte Immunreaktion): Bestimmung der Konzentration von Antigenen über spezifische Antikörper, die wiederum mit einer enzymatischen Reaktion sichtbar gemacht werden.

bakterieller LT-B ein. Sie führten auch keine Untersuchungen zum effektiven Impfschutz durch.

2004 veröffentlichten Tacket et al. Untersuchungen mit transgenem Mais, der LT-B an der Zelloberfläche akkumulierte, an Menschen als Probanden. Dazu wurden Maiskeimlinge isoliert, getrocknet und entfettet. 9 Testpersonen erhielten daraus jeweils drei Portionen von 2,1 g, die jeweils 1 mg LT-B enthalten sollten. Davon entwickelten sieben (=78 %) Personen einen vierfachen Anstieg im Anti-LT-B-IgG-Titer und vier von neun (=44 %) einen Anstieg im IgA-Titer (anti-LT-B). Diese eher geringen Reaktionen entsprechen früheren Ergebnissen der gleichen Arbeitsgruppe mit transgenen Kartoffeln (Tacket et al. 1998). Nach Tacket et al. (2004) kann eine solche Impfung nur einen kurzfristigen Schutz vor ETEC bieten. Das generelle Problem bei der Impfung gegen ETEC besteht zudem darin, dass es unterschiedliche Stämme bei diesem Bakterium geben kann. Wie diese sich im Einzelnen unterscheiden, ist nicht klar. Der Impfstoff, der sich zur Zeit in Entwicklung befindet, arbeitet deshalb mit fünf verschiedenen abgetöteten ETEC-Stämmen (WHO 2002).

4.2.4 Forschungsdefizite und Anwendung

Die Forschung zur Produktion von LT-B in transgenen Pflanzen findet an verschiedenen Pflanzenarten statt. Dabei scheint transgener Mais insgesamt ein geeigneteres Produktionssystem als transgene Kartoffeln zu sein. Die Gründe, warum transgene Kartoffelknollen LT-B in einer Form synthetisierten, die nur niedrige Immunantworten und nur partiellen Schutz bewirkten, wurden nicht weiter verfolgt, obwohl dies Aufschluss darüber geben könnte, wodurch die Produktion eines Antigens in bestimmten Pflanzen, in dem Fall Kartoffeln, behindert wird.

Bei Mais hingegen ist das Ausmaß der Expressionsunterschiede noch nicht ausreichend untersucht. Die Untersuchungen zu der LT-B-Expression in verschiedenen Generationen, die im Freiland verstärkt auftraten, macht deutlich, dass gleichmäßiges Saatgut wie auch standardisierte Anbaubedingungen für eine gleichmäßige Antigenproduktion nötig sind.

Eine Impfung mit LT-B gegen ETEC angesichts verschiedener Stämme ist möglicherweise nur kurzfristig oder nur partiell wirksam. Tacket et al. (2004) schlagen vor, dass das LT-B als Adjuvans verwendet werden kann, das mit anderen Antigenen verabreicht wird. Einen ähnlichen Ansatz verfolgen einige Autoren, indem sie LT-B direkt an ihr Zielprotein fusionieren. Walmsley et al. (2003) fusionierten LT-B als Adjuvans an ein immunokontrazeptives Epitop in transgenen Tomaten. Sie untersuchten dabei aber zunächst nur die Expressionshöhe des LT-B-Fusionsproteins und fanden zwischen verschiedenen Früchten einer Pflanze große Unterschiede. Rigano et al. (2004) synthetisierten ein Fusionsprotein aus LT-B mit einem Tuberkulose-Antigen in *Arabidopsis thaliana*. Die Bildung von Pentameren, die für die Immunogenität des LT-B entscheidend ist, soll dabei nicht die Immunogenität des Tuberkulose-Antigen beeinträchtigt haben. Rigano et al. (2004) führten keine Fütterungsversuche durch.

5 Sind transgene Pflanzen für die Produktion von oralen Vakzinen geeignet?

Im Prinzip ist die Produktion von oralen Vakzinen in transgenen Pflanzen möglich. Die Auswertung der beiden Fallbeispiele zur Produktion von HBsAg und LT-B in transgenen Pflanzen zeigt aber deutlich, dass die Möglichkeit, das Vakzin im transgenen pflanzlichen Gewebe zu verabreichen, zahlreiche limitierende Faktoren hat. Zum einen kann in transgenen Pflanzen bislang keine stets gleich hohe Produktion eines Vakzins gewährleistet werden. Zudem wurde bisher nur unzureichend geklärt, in welchem Verhältnis von aktiver und inaktiver Form die Vakzine im transgenen Pflanzengewebe vorliegen. Zuletzt sind mögliche Modifikationen des Vakzins in den Pflanzenzelle durch Enzyme oder sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe noch nicht hinreichend untersucht.

Eine direkte Gabe des Pflanzengewebes ist demnach nicht ratsam. Vielmehr sollte eine Aufbereitung eines Vakzins angestrebt werden, damit eine standardisierte Impfdosis garantiert und der Impfschutz gesichert werden kann. Eine Extraktion und Aufreinigung des Vakzins aus transgenen Pflanzen entspricht zudem dem für Impfstoffe generell geforderten Kriterium der Reinheit (Milstien et al. 2002).

5.1 Schwankende Transgenexpression

Neben Tabak als Modellpflanze wurden die Untersuchungen zur Produktion von HBsAg und LT-B durchgehend an Nahrungsmittelpflanzen durchgeführt, weil das Ziel jeweils war, transgenes Pflanzengewebe als essbaren Impfstoff herzustellen. Dann allerdings darf die Antigenproduktion und damit die Impfdosis keinen Schwankungen unterliegen.

HBsAg wie auch LT-B wurde in transgenen Kartoffeln hergestellt. Die transgenen Kartoffeln zeigten aber durchgehend eine große Schwankungsbreite in der Transgenexpression: Die HBsAg-Konzentration schwankte bei Pflanzen um das 10fache (Kong et al. 2001; Smith et al. 2003). Zwischen verschiedenen Linien erreichten die Unterschiede Größenordnungen eines Faktor von bis zu 5000 (Richter et al. 2000). Bei der Produktion von LT-B in transgenen Kartoffeln zeigten sich nicht ganz so starke Unterschiede. Allerdings wurden auch nicht viele verschiedenen Linien, die mit dem gleichen Vektor transformiert worden waren, in ihrem Expressionsniveau vergleichend dargestellt. Die Schwankungen der LT-B-Konzentration bei transgenen Pflanzen einer Linie betragen etwa das 10fache (siehe Tabelle 3).

Bei transgenem LT-B produzierendem Mais zeigten sich besonders in den Körnern aus nachfolgenden Generationen enorme Schwankungen (Chikwamba et al. 2002a u. b). Während die Körner der ersten Ernte eine geringe LT-B-Konzentration aufwies, die sich um einen Faktor von 7 unterschied, betragen die Unterschiede in der R2- und R3-Generation den Faktor 20.

Die Verwendung von unterschiedlichen Vektoren in den verschiedenen Nutzpflanzen, die durchschnittlich die Transgenexpression erhöhten, verringerte die Schwankungsbreite der Transgenexpression aber nicht wesentlich.

Eine Stabilisierung der Transgenexpression erscheint schwierig, da diese durch genetische

und epigenetische Effekte beeinflusst wird. Eine schwankende Transgenexpression kann teilweise durch den epigenetischen Effekt des *Gene Silencing*, also der teilweisen oder sukzessiven Stilllegung eines Gens, erklärt werden. Bei transgenen Pflanzen werden sowohl transkriptionelles als auch post-transkriptionelles *Gene Silencing* beschrieben. Die Inaktivierung eines Transgens kann während der Entwicklung progressiv auftreten (Ohrend et al. 1991). *Silencing* des Transgens kann unabhängig über mehrere Generationen hinweg auftreten (Kohli et al. 1999; Morino et al. 1999; Ohrend et al. 1991; Vain et al. 1999). Das *Gene Silencing* von Transgenen kann allerdings reversibel sein (Morino et al. 1999). Post-transkriptionelles *Gene Silencing* ist meiotisch nicht stabil, das heißt, dass es nicht weiter vererbt wird (Matzke et al. 2001). Die Inaktivierung von transgenen Konstrukten hängt stark von der Anzahl der Kopien und der Komplexität des Transgenlocus ab (Elomaa et al. 1995; Jakowitsch et al. 1999; Pawlowski et al. 1998; Vaucheret et al. 1998). Charrier et al. (2000) genügten zwei Transgene an verschiedenen Orten im Genom, um *Gene Silencing* auszulösen. Das *Silencing* wird dabei durch die Sequenzhomologien ausgelöst, unabhängig davon, wie hoch die Expression war.

Verschiedene Umweltbedingungen können zusätzlich Einfluss auf die Transgenexpression nehmen. Bei Untersuchungen zu transgenen Pflanzen finden sich wenige Angaben zum Effekt von Umwelteinflüssen auf die Transgenexpression und noch weniger auf die Pflanzengesundheit. Als einflussnehmende Umwelteinflüsse wurden Kulturbedingungen, Licht und Temperatur ausgemacht: u.a. Temperatur: Neumann et al. (1997) und Köhne et al. (1998) in transgenem Tabak; Licht: Dorlhac De Borne et al. (1994) in transgenem Tabak; Anbaubedingungen: Dymock et al. (1991) bei transgener Kartoffel; Brandle et al. (1995) und Palauqui & Vaucheret (1995) in transgenem Tabak. Umwelteinflüsse mögen mit einer Rolle gespielt haben, dass bei Chikwamba et al. (2002b) in den R3-Maiskörnern, die von transgenen Pflanzen stammten, die im Freiland angebaut wurden, sich die LT-B-Konzentration um das 20fache unterschied. Bei diesen Ergebnissen muss von einem Anbau von transgenen Pflanzen als essbare Impfstoffe im Freiland schon aus Gründen der Produktqualität abgeraten werden.

An den zwei diskutierten Fallbeispielen zeigt sich, dass die Transgenexpression nicht beliebig steigerbar ist. Für die Produktion von oralen Vakzinen in transgenen Pflanzen als essbare Impfstoffe bedeutet das, dass kaum die für Schluckimpfungen erforderliche hohe Konzentration erreicht werden kann. Andere Systeme zur Steigerung der Produktion heterologer Protein in transgenen Pflanzen bestehen in der Plastidentransformation oder in der transienten Expression. Bei oralen Vakzinen gibt es generell nur wenige Untersuchungen zu solchen Transformationen, z. B. die erwähnte transiente Expression von HBsAg in *Nicotiana benthamiana* (Huang & Mason 2004). Chloroplasten-Transformationen wurden durch Daniell et al. (2001a) und Tregoning et al. (2003) an transgenem Tabak durchgeführt. Daniell et al. (2001a) exprimierten die B-Untereinheit des Cholera-Toxins und erreichten eine Akkumulation von bis zu 4,1 % des gesamten löslichen Proteins. Kumar & Daniel (2004) produzierten auch ein Anthrax-Antigen in Chloroplasten; das Produktionssystem ist aber nur unzureichend dargestellt und entzieht sich damit einer Bewertung. Tregoning et al. (2003) erreichten in transgenen Tabakblättern eine deutlich höhere Expression von bis zu 27 % des gesamten löslichen Proteins. Die Schwankungen in der Transgenexpression waren vergleichbar hoch wie bei den Kerntransformationen¹⁹. Wie auch bei Kerntransformationen zeigte die Linie mit der höheren Transgenexpression phänotypische Abweichungen, vor

¹⁹ In verschiedenen Linien betrug die Schwankung 18 - 27 % und 7-10 % des gesamten löslichen Proteins.

allem chlorotische Blätter. Auch hier zeigt, sich dass die Expression eines heterologen Proteins im pflanzlichen System nicht beliebig steuerbar ist. Eventuell wird eine hohe Expression aus Produktionssicht durch eine mangelnde Fruchtbarkeit der Pflanzen oder eine niedrige Ernte konterkariert.

5.2 Unzureichende Proteincharakterisierung

Die Untersuchungen von Smith et al. (2002a u. b) zu HBsAg und Chikwamba et al. (2003) zu LT-B zeigen, dass die Bestimmung der subzellulären Speicherform des Vakzins sehr wichtig ist, um Aussagen über die Impfdosis treffen zu können. Generell scheint HBsAg in transgenen Pflanzen in und an die Membran des endoplasmatischen Retikulums gebunden zu sein und nicht in Form der immunogenen Partikel vorzuliegen. Dennoch unterschied sich der Anteil aktiver HBsAg bei verschiedenen Pflanzenarten.

Die subzelluläre Speicherung von LT-B in transgener Kartoffel wurde nicht untersucht. Möglicherweise lag es dort auch an Stärke assoziiert vor, wie dies Chikwamba et al. (2003) für LT-B in Maiskörnern feststellen. In welchem Verhältnis das LT-B in den Stärkekörnern als Monomer oder als funktionelles Pentamer vorliegt, klärten die Autoren nicht auf.

Von der subzellulären Speicherform hängt ab, ob das Vakzin in aktiver Form vorliegt und in welchem Verhältnis aktive und inaktive Form auftreten. Nicht zuletzt wird dadurch auch die Stabilität des Vakzins in aktiver Form bestimmt. Die Fallbeispiele zeigen, dass die Stabilität der Vakzine im transgenen pflanzlichen Gewebe bisher nicht ausreichend erforscht wurde. Bei allen Pflanzenarten blieb unklar, in welcher Form das Pflanzengewebe im Darm das Antigen entlässt.

Die Proteincharakterisierung wurde in den Fallbeispielen meistens über einen ELISA-Test durchgeführt. Nach Crommelin et al. (2003) zeigen die verschiedenen Techniken zur Analyse der räumlichen Struktur von Proteinen immer nur einen Teil der Gesamtinformation. Kombinationen von verschiedenen Techniken zur Proteincharakterisierung könnten dafür eine bessere Aufklärung bringen.

Bei der Auswertung der beiden Fallbeispiele fand keine Untersuchung der Glykosylierung der Proteine statt. Smith et al. (2003) bestimmten die Glykosylierung von HBsAg in transgenen Kartoffeln und transgenen Sojazellen allein durch das höhere Molekulargewicht. HBsAg besitzt eine potentielle Glykosylierungsstelle. Deren Glykosylierung beeinflusst nicht die Immunogenität (Smith et al. 2003). Für eine optimale Proteincharakterisierung sollte Änderungen im Molekulargewicht allerdings stärker nachgegangen werden.

Bei anderen Antigenen, bzw. anderen viralen Glykoproteinen, kann Glykosylierung durchaus die Immunogenität beeinflussen (Chargelegue et al. 2001). Wichtig wird eine Untersuchung der Glykosylierung dann, wenn das Antigen nicht im endoplasmatischen Retikulum gespeichert wird, sondern in den Golgi-Apparat gelangt, in die Zellwand eingelagert oder sekretiert wird. Schließlich treten Unterschiede in der Glykosylierung zwischen Pflanzen und Tieren erst nach dem endoplasmatischen Retikulum auf. Auch die beteiligten Glykosyltransferasen unterscheiden sich in der Spezifität. Zudem tritt ein unterschiedlicher Abbau der Zuckerketten auf (Hüsing 2004). Pflanzenproteine besitzen keine terminalen Galactose- und Sialinsäure-Reste. Die α -(1,3)-Fucose bei Pflanzen ist bei Tieren 1,6 verknüpft. Zudem besitzen Pflanzen im Gegensatz zu Säugern die β -(1,2)-Xylose (Ma et al. 2003).

Ein gesundheitliches Risiko, etwa allergische Reaktionen, durch die unterschiedliche Glykosylierung von oralen Vakzinen wird nicht diskutiert.²⁰ Dies liegt auch an dem Konzept, dass die oralen Vakzine in transgenen Pflanzen als essbare Impfstoffe in regulären Nahrungsmittelpflanzen produziert werden, deren eventuelle Allergenität ausreichend bekannt ist.

5.3 Unterschiedliche Ergebnisse zur Immunisierung

Dass zu wenig über die Antigene in den transgenen Pflanzen bekannt ist, zeigen auch die heterogenen Ergebnisse der Untersuchungen zur Immunisierung.

Über 30 Publikationen zeigen, dass oral verabreichte Antigene als essbare Impfstoffe in transgenem Pflanzengewebe in Mäusen zu einer Immunantwort führen (Brayden 2001). Solche Immunantworten konnten zwar reproduziert werden, eine Bestätigung in größeren Tieren und Menschen blieb aber aus.

Im Fallbeispiel von LT-B beispielsweise erbrachten die Fütterungsversuche von Mason et al. (1998) und Lauterslager et al. (2001) konträre Ergebnisse. Mason et al. (1998) konnten nach oraler Gabe von LT-B produzierenden Kartoffelknollen spezifische Antikörperbildung nachweisen. Bei den Fütterungsversuchen von Lauterslager et al. (2001) lösten die transgenen Kartoffelknollen nur nach parenteraler Impfung einen Boost aus. Ähnliche Unterschiede wurden auch bei HBsAg deutlich. Während die Fütterung roher Kartoffelknollen bei Richter et al. (2000) und Kong et al. (2001) bereits die Bildung von HBsAg-spezifischen Antikörpern auslöste, erreichten Joung et al. (2004) erst nach parenteraler Impfung einen Boost.

Antigene aus unterschiedlichen transgenen Pflanzenarten als essbare Impfstoffe lösen in Mäusen teilweise unterschiedliche Immunantworten aus. Der Schutz vor einer Infektion durch enterotoxisches *E. coli* oder Cholera-Toxin war nach den Fütterungsversuchen von Mason et al. (1998) mit transgenen LT-B produzierenden Kartoffelknollen nicht vorhanden. Chikwamba et al. (2002a) dagegen konnten nach Fütterung von transgenen LT-B produzierenden Maiskörnern einen Infektionsschutz nachweisen.

Aus diesen Ergebnissen resultiert zudem die Frage, ob andere Bestandteile der transgenen Pflanzen hemmende oder fördernde Wirkung auf die Immunogenität der Antigene besitzen. Speziell die Frage, wie stabil die Antigene in den transgenen Pflanzen gelagert werden können, ist noch nicht abschließend geklärt. In den zwei Fallbeispielen wurde dies nur vereinzelt untersucht. Lamphear et al. (2002) lagerten transgene Maiskeimlinge mit LT-B bei 4 und 23°C über 400 Tage und maßen das LT-B mit ELISA, führten aber keine Fütterungsversuche durch, um die Immunogenität abzusichern.

Auch eine erfolgreiche Immunantwort in Mäusen kann nicht auf eine mögliche Immunisierung in Menschen übertragen werden. Dies liegt nicht nur an den Unterschieden in der Dosis und im Impfschema, sondern auch an inhärenten Unterschieden des Immunsystems (Webster et al. 2003). Tatsächlich erbrachten Studien an Testpersonen aus der klinischen Phase I keine überzeugenden Ergebnisse (siehe Tabelle 5). Die Immunantworten sind durchgehend als gering einzustufen. In den meisten Fällen war die

²⁰ Bei der Produktion von Antikörpern in transgenen Pflanzen, die den Menschen injiziert werden sollen, wird eine unterschiedliche Glykosylierung stärker thematisiert und untersucht. Dabei werden auch die Möglichkeiten der Humanisierung der Glykosylierung in transgenen Pflanzen näher untersucht (siehe etwa Gomord et al. 2004).

Dosis an Pflanzengewebe unpraktikabel oder, wie bei rohen Kartoffelknollen, für die Testpersonen unangenehm. Offen bleiben muss zudem, ob die detektierte geringe Immunantwort vor Infektionen schützen würde. Eingehendere und standardisierte Vergleiche stehen noch aus.

Tabelle 6: Untersuchungen der klinischen Phase I mit oralen Vakzinen in transgenen Pflanzen

Quelle	Antigen	Verabr. Pflanzengewebe; Menge	Impf-dosis	Test-per-sonen	Bemerkung
Tacket et al. 1998	B-Untereinheit des enterotoxischen <i>Escherichia coli</i>	rohe Kartoffelknolle; 100 g, bzw. 50 g an Tag 0, 7, 21	3,7 – 15,7 µg/g Frischgew.	14	n = 6: 100 g transgene Kartoffel; n = 5: 50 g transgene Kartoffel; n = 3 herkömmliche Kartoffel Immunantwort „nicht unähnlich“ zu den Ergebnissen, die in anderen Untersuchungen mit bakteriellem LT-B an Testpersonen erzielt wurden, aber wesentlich niedriger; 10 Personen entwickelten einen 4fachen IgG-Anstieg; 8 LT-neutralisierende Antikörper; 4 Personen einen 4fachen IgA Anstieg; Testpersonen klagten über Schwindel.
Tacket et al. 2004	B-Untereinheit des enterotoxischen <i>Escherichia coli</i>	Entfette Maiskeimlinge; 2,1 mg an Tag 0, 7, 21	1 mg	13	n = 9: transgenes Material; n = 4: Kontrollgruppe; 7 von 9 Personen: 4facher IgG Anstieg; 4 von 9: 4facher IgA Anstieg
Tacket et al. 2000	Kapsidprotein des Norwalk-Virus	rohe Kartoffelknolle; 150 g an Tag 0, 7 und 21	~ 215 – 751 µg	24	n = 20: transgene Kartoffel; Hälfte aller Testpersonen klagte über Schwindel, Krämpfe und Übelkeit; 19 Testpersonen: Anstieg IgA; 7: Anstieg in IgG; insgesamt aber geringe Immunantwort; nötige Immunantwort, die einen Impfschutz bewirkt, ist nicht bekannt.
Kapusta et al. 1999	Oberflächenantigen des Hepatitis B-Erregers	Salatblätter; 200 g an Tag 0 und innerhalb von 2 Monaten: 150 g	0,1 – 0,5 µg/100 g Frischgew.	5	2 von 3 der Testpersonen mit transgenen Salat: Antikörpertiter 13 und 17 mU/ml = geringe Immunantwort, nach der zweiten Gabe.
Kapusta et al. 2001	Oberflächenantigen des Hepatitis B-Erregers	Salatblätter; 200 g an Tag 0, 7 und 28	0,51 µg 0,78 µg und 0,94 µg	12	n = 7: transgener Salat: in der vierten Woche Antikörpertiter 1,0 – 3,6 mU/ml; nach der dritten Gabe ~2,2 – 6,3 mU/ml.
Thanavala et al. 2000	Oberflächenantigen des Hepatitis B-Erregers	rohe Kartoffelknolle	k. A.	45	Die orale Gabe der transgenen Kartoffel diente als Boost; die Testpersonen hatten bereits parenterale Impfungen erhalten; Veröffentlichung stellt keine Ergebnisse dar; Ergebnisse sind der Öffentlichkeit bisher nicht zugänglich.
Yusibov et al. 2002	Epitope des Glykoproteins und Zellkernproteins des Tollwutvirus	rohe Spinatblätter; 150 g an Tag 0, 14 und 28	5 mg	19	3 von 5 Personen, die Tollwut geimpft waren, entwickelten einen Boost Effekt; 4 von 9 naiven Testpersonen: IgG, 2 davon und 1 andere Personen: IgA Anstieg; keine Bildung von neutralisierenden Antikörpern.

Nach Kirk et al. 2004 wurden von Thanavala et al. eine weitere Studie der klinischen Phase I mit dem Oberflächenantigen des Hepatitis-B-Erregers durchgeführt. Diese ist aber noch nicht veröffentlicht. (Thanavala et al. 200X in Druck, nach Kirk et al. 2004).

Die geringe Immunantwort in den Untersuchungen der klinischen Phase I mag auch daran liegen, dass keine Adjuvantien zugegeben wurden, weil bisher kein orales Adjuvans eine Zulassung besitzt (Petrovsky & Aguilar 2004). Da ein Adjuvans-Antigen-Gemisch eigene toxikologische Untersuchungen benötigt, könnte dies ein weiteres Hindernis für transgenes Pflanzengewebe darstellen. Pflanzengewebe mit der Vielzahl an sekundären Inhaltsstoffen, das ein Antigen in schwankender Höhe produziert, das mit einem Adjuvans versetzt wird, ist ein standardisiertes Produkt nur schwer vorstellbar.

5.4 Unklare Abgrenzung zur Ausbildung oraler Toleranz

Die Frage, wie eine orale Toleranz vermieden werden kann, wenn die Antigene in Form von essbaren Impfstoffen mit Nahrung und in größeren Mengen zugeführt werden, blieb unbeantwortet. In den Untersuchungen der beiden Fallbeispiele äußerten sich lediglich Chikwamba et al. (2002a) zu der Möglichkeit der oralen Toleranz. Die Autoren sehen keinen Anzeichen dafür, dass die orale Gabe von LT-B in Mais eine Toleranz induzieren könnte, da über die gesamte Fütterungsperiode zunehmend Antikörper gebildet wurden.

Versuche, die Autoimmunerkrankungen über Immuntoleranz therapieren sollen, wurden im gleichen Design wie die Fütterungsversuche mit oralen Impfstoffen in transgenen Pflanzen als essbare Impfstoffe durchgeführt. Danach wurden Mäusestämme, die eine Veranlagung zum Diabetes Typ I aufwiesen, mit transgenen Kartoffeln gefüttert, die Insulin oder Glutamat-Decarboxylase produzierten. Diese Proteine waren an die Cholera-B-Untereinheit gekoppelt. Dies unterdrückte oder verzögerte in den Mäusen die Autoimmunreaktion (Ma et al. 1997; Langridge 2001). Eigentlich soll das Cholera-Toxin, als Adjuvans eingesetzt, eher die Ausbildung von Immuntoleranz unterdrücken (Ogra et al. 2001). Andere Autoren erzielten bei ähnlichen Versuchen an Mäusen gegenteilige Ergebnisse, nämlich dass oral verabreichte Antigene die betreffende Autoimmunkrankheit verstärkten (Bellmann et al. 1998).

Nach Webster et al. (2003) ist es zwar bei Menschen wesentlich „schwieriger“, Toleranz gegenüber eigenen Proteinen und auch Fremdproteinen auszulösen, und man benötigt wahrscheinlich sehr hohe Dosen – die generelle Unklarheit zur Abgrenzung von oraler Toleranz stellt die Sicherheit von oralen Vakzinen in transgenen Pflanzen, die als essbare Impfstoffe verabreicht werden sollen, aber grundsätzlich in Frage. Nach Streatfield & Howard (2003) oder Carter & Langridge (2002) soll die Ausprägung oraler Toleranz bei essbaren Impfstoffen dadurch ausgeschlossen werden, dass für alle oralen Vakzine in transgenen Pflanzen die genaue erforderliche Menge sowie das passende Impfschema entwickelt und fest gelegt wird. Dies wird aber wegen der hohen Schwankungen bei der Produktion des Antigens schwierig zu erreichen sein.

5.5 Anwendungsorientierte Diskussion

Diese oben diskutierten Probleme finden sich derart nicht in den Diskussionen der einzelnen Arbeitsgruppen wieder. In den Veröffentlichungen werden die Untersuchungen vielmehr anwendungsorientiert diskutiert, mit dem Ziel, dass die transgenen Pflanzen als essbare Impfstoffe vergeben werden sollen. Tabelle 6 gibt über diese Argumente und ihre Relevanz einen Überblick.

Dabei wird als Vorteil etwa die Stimulierung der Immunprozesse an Schleimhäuten durch orale Verabreichung des Impfstoffes genannt, was aber vielmehr das Prinzip der oralen Impfung darstellt. Der Vorteil, dass die transgenen Pflanzen eine vor Denaturierung durch Wärme und vor Verdauung im Magen schützende Umgebung für den oralen Impfstoff bereitstellen, birgt den Nachteil, dass eine standardisierte Dosis nicht gewährleistet werden kann. Es werden auch potentielle Vorteile der Produktion von oralen Vakzinen in transgenen Pflanzen angeführt, die auch in anderen Produktionssystemen realisiert werden können, beispielsweise die Herstellung eines Multikomponenten-Impfstoffes. Yu & Langdridge (2001) hatte den Versuch unternommen, in transgenen Kartoffeln die Antigene verschiedener

Durchfallerreger zusammen zu produzieren²¹. Ein alternatives Produktionssystem stellen abgeschwächte Shigella-Erreger dar, die ETEC-Antigene produzieren. Dieser Multikomponenten-Impfstoff soll gegen beide Erreger schwerer Durchfallerkrankungen immunisieren (WHO 2002).

Die ökonomischen Vorteile, wie unter anderem kostengünstige Produktion des Rohmaterials, teilweise Verzicht auf Kühlkette möglich, können nicht abschließend bewertet werden. Dies hängt davon ab, ob transgene Pflanzen als essbare Vakzine tatsächlich Marktreife erlangen. Um eine standardisierte Impfdosis zu gewährleisten, müssten die transgenen Pflanzen unter standardisierten Bedingungen, z. B. in einer Klimakammer, angebaut werden, um die Expressionsunterschiede des Vakzins einzuschränken. Zudem sind bei einem Anbau im freien Feld die Anbauauflagen möglicherweise so aufwändig, dass dies die Produktionskosten stark erhöht. Der Verzicht auf eine Kühlkette hängt davon ab, welche transgene Pflanzenart das orale Vakzin produzieren soll, da Salat beispielsweise ohne Kühlkette nicht lange haltbar ist.

Besonders häufig wird die Forschung mit den Argumenten begründet, dass abgelegene Regionen armer Länder einfacher und kostengünstiger mit oralen Impfstoffen in transgenen Pflanzen als essbare Impfstoffe versorgt werden kann. Dabei sollten vor allem die generellen strukturellen und ökonomischen Probleme bedacht werden, weshalb Impfstoffe nicht den Weg zu ihren Zielgruppen finden (siehe dazu Hüsing 2004, Kapitel 10.2.2.3).

Auch drohender Bioterrorismus soll mit oralen Vakzinen aus transgenen Pflanzen bekämpft werden. Ob bei drohendem Bioterrorismus eine aktive Impfung der Zivilbevölkerung durchgeführt werden kann oder auf passive Impfungen zurückgegriffen werden wird, ist bisher eine theoretische Diskussion. Da die Lagerfähigkeit von oralen Vakzinen in transgenen Pflanzen noch nicht hinreichend untersucht ist, kann diese Idee nicht abschließend besprochen werden.

Die hohe Sicherheit durch Abwesenheit von Humanpathogenen in Pflanzen ist richtig, obwohl es zumindest einen Hinweis gibt, dass auch Pflanzenpathogene Wirbeltiere befallen und dort rekombinieren können (Gibbs et al. 1999). Dafür sind andere Sicherheitsfaktoren nicht abschließend geklärt, wie etwa das Risiko der Ausprägung oraler Toleranz.

²¹ Yu & Langdridge (2001) brachten in Kartoffeln einen Vektor ein, der für zwei Fusionsproteine codierte. Ein Fusionsprotein bestand aus der B-Untereinheit des Cholera-Toxins und einem Antigen aus dem Rotavirus. Das andere Fusionsprotein setzte sich aus einem bestimmten Kolonisierungsfaktor von ETEC und einem Teil der A-Untereinheit des Cholera-Toxins, das kein Epitop enthält, zusammen. Vier von zehn Mäusen entwickelten Antikörper gegen drei Antigene. Andere Mäuse entwickelten Antikörper nur gegen ein Antigen. Bisher haben Yu & Langdridge bisher keine weiteren Untersuchungen zum Multikomponenten-Impfstoff veröffentlicht.

Tabelle 7 (nach Hüsing 2004; modifiziert): Potenzielle Vorteile von transgenen Pflanzen als Produktionssystem für essbare (orale) Impfstoffe

Potenzielle Vorteile transgener Pflanzen zur Produktion von oralen Vakzinen, nach Langringe 2001, Sala et al. 2003, Streatfield & Howard 2003; Webster et al. 2003	Relevanz
Fähigkeit zur Synthese komplexer und korrekt post-translational modifizierter Proteine	Prinzipiell ja, dies ist aber auch bei Zellkulturen tierischen und pflanzlichen Ursprungs, sowie in Hefe möglich.
Stimulierung der Immunprozesse an Schleimhäuten durch orale Verabreichung des Impfstoffes	Dies ist das Prinzip der oralen Impfung.
Pflanze stellt eine vor Denaturierung durch Wärme und vor Verdauung im Magen schützende Umgebung für den oralen Impfstoff bereit.	Prinzipiell ja. Eine standardisierte Dosis kann allerdings nicht hergestellt werden.
Fähigkeit zur gleichzeitigen Synthese verschiedener Antigene (Kombinationsimpfstoffe, komplexere Untereinheiten-Impfstoffe)	Prinzipiell ja. Die Produktion von Multikomponenten-Impfstoffen wird aber auch in anderen Ansätzen verfolgt.
Fähigkeit zur schnellen Maßstabsvergrößerung und schnellen Produktion sehr großer Mengen	Angesichts der schwankenden Transgenexpression, die u.a. durch Umweltbedingen ausgelöst werden kann, muss eine Maßstabsvergrößerung unter kontrollierten Bedingungen erfolgen.
Kostengünstige Produktion des Rohmaterials (transgene Pflanze)	Sollen die transgenen Pflanzen als essbare Impfstoffe verabreicht wird, müssten die transgenen Pflanzen unter standardisierten Bedingungen, z. B in einer Klimakammer, angebaut werden, um die Expressionsunterschiede des Vakzins einzuschränken. Ob dies eine kostengünstige Produktion darstellen kann, ist fraglich. Bei einem Anbau im freien Feld sind die Anbauauflagen möglicherweise aufwändig, dass dies die Produktionskosten stark erhöht.
Kostengünstige Produktion, falls Aufarbeitung entfallen kann, da Teile der transgenen Pflanze direkt als Impfstoff verzehrt werden	U.a. wegen der schwankenden Transgenexpression und der Forschungslücken, in welchem Verhältnis der aktiven und inaktiven Form das Vakzin im Pflanzengewebe vorliegt, ist es unwahrscheinlich dass eine Aufarbeitung entfällt. Deshalb ist dieser potentielle Vorteil bisher irrelevant.
Gute Lager- und Transportierbarkeit des impfstoffhaltigen Pflanzenmaterials	Dies muss noch untersucht und bestätigt werden. Die Lager- und Transportierbarkeit hängt aber vor allem vom Pflanzengewebe ab.
Teilweise Verzicht auf Kühlkette möglich.	Ob dies bei einer kommerziellen Nutzung möglich ist, muss noch untersucht und bestätigt werden.
Orale Verabreichung des Impfstoffes, dadurch hohe Akzeptanz, hohe Sicherheit, verringerte Kosten, geringere Ansprüche an Qualifikation des Impfpersonals.	Irrelevant, siehe Impfbericht der WHO 2002.
Hohe Sicherheit durch Abwesenheit von Humanpathogenen in Pflanzen sowie orale Impfstoffverabreichung	Es gibt zumindest einen Hinweise, dass auch Pflanzenpathogene Wirbeltiere befallen und dort rekombinieren können (Gibbs et al. 1999). Andere Sicherheitsfaktoren sind allerdings nicht abschließend geklärt, wie etwa das Risiko der Ausprägung oraler Toleranz.
Gute Eignung bei Gefahr terroristischer Anschläge mit Biowaffen, da gut lagerbar und große Impfstoffmengen schnell und kostengünstig herstellbar.	Da die Lagerfähigkeit noch nicht hinreichend untersucht ist, kann dieses Argument nicht abschließend evaluiert werden. Bei terroristischen Anschlägen scheint aber eine passive Impfung parenteral durch Antikörper als wahrscheinlichere Strategie.

5.6 Ausblick und alternative Routen zur mukosalen Immunisierung

Generell muss eine differenzierte Bewertung erfolgen, bei welchen Krankheiten eine Impfung über die orale Route überhaupt sinnvoll ist. Angesichts der eingangs erwähnten generellen Schwierigkeiten der oralen Impfung scheint die Entscheidung über die wirksamste Impfstrategie zur mukosalen Immunisierung noch offen. Um eine mukosale Immunisierung auszulösen, besteht auch die Möglichkeit, die Antigene in Aerosolen auf Mund- und Atemwegsschleimhäute zu applizieren (Bellanti et al. 2001). Die nasale Impfung bewirkt einen Schutz der Nasenschleimhaut und der Lungen, aber auch entfernter Schleimhäute, und soll zudem auch eine systemische Antwort bewirken. Dies wird bei der oralen Impfung wohl nicht immer in gleichem Maße erreicht (Phalipon & Sansonetti 2000). Auch die Möglichkeit der rektalen und genitalen Impfung zur mukosalen Immunisierung wird erforscht (Phalipon & Sansonetti 2000; Plotkin 2001).

Trotz der zahlreichen bisher ungelösten Probleme der Produktion von oralen Vakzinen in transgenen Pflanzen als essbare Vakzine, ist dies ein Thema, zu dem es zukünftig noch zahlreiche weitere Forschungsarbeiten geben wird. Dies belegen unter anderem die zahlreichen US-amerikanischen, kanadischen und weltweiten Patente, die teilweise auf Vektoren, die eine Produktion von bestimmten Antigenen in transgenen Pflanzen gewährleisten sollen, teilweise aber auch auf das Prinzip eines essbaren Produktes vergeben wurden (Gilad et al. 2001)²².

Dennoch erscheinen Ergebnisse, die über eine prinzipielle Machbarkeit von transgenen Pflanzen als essbare Vakzine im Bereich der Humanmedizin hinaus gehen werden, unwahrscheinlich, da kein standardisiertes Produkt aus transgenem Pflanzengewebe in Aussicht ist. Statt dessen wird eher der Aufwand der Aufbereitung der Antigene aus dem transgenen Pflanzengewebe untersucht werden müssen. Insofern erscheint uns die Aussicht von Hüsing (2004) eher unwahrscheinlich, dass es im humanmedizinischen Bereich ein erster Schritt sein könnte, Impfstoffe aus transgenen Pflanzen als Bestandteil von Impfschemata einzusetzen, in denen sie etablierte, zu injizierende Impfstoffe ergänzen (z. B. als Booster).

Möglich ist allerdings, dass die orale Impfstoffe aus transgenen Pflanzen als essbare Impfstoffe für Tiere auf den Markt kommen können (Hüsing 2004). Die Zulassungsbedingungen im Bereich der Veterinärmedizin sind nicht so streng wie in der Humanmedizin, etwa was die Toxikologie von Stoffen angeht.

Bei der Forschungsförderung sollte darauf geachtet werden, dass alternative Ansätze bewahrt und im gleichen Umfang gefördert werden. Zwischen den Alternativen muss nach allen zu berücksichtigenden Gesichtspunkte der nachhaltigste Weg gewählt werden können.

²² Was die beiden Fallbeispiele anbelangt, ist die Expression von HBsAg wie auch LT-B in transgenen Pflanzen mit einem Patent belegt (Mason et al. 2000 und Arntzen et al. 2001). Inwieweit die zahlreichen Patentanmeldungen auf eine Kommerzialisierung von essbaren Impfstoffen hinweisen oder möglicherweise in der Forschung vor allem dazu dienen „Claims“ (Ansprüche) abzustecken, kann hier nicht geklärt werden. Für letztes spricht, dass es in beiden Fallbeispielen ausschließlich Untersuchungen jeweils von einer kleinen Gruppe von Institutionen gibt.

Zusammenfassung

Das vorliegende Gutachten untersucht die Produktion von oralen Impfstoffen in transgenen Pflanzen, die Wirksamkeit und Eignung von Impfstoffen für die orale Verabreichung im Allgemeinen sowie die Dosierbarkeit oraler Impfstoffe bei Verzehr von „Impfstoff-Pflanzen“ als essbare Impfstoffe im Besonderen.

Generell stellen die Schleimhaut im Gastrointestinaltrakt und die Schleimhaut der Atemwege die „Eingangspforte“ für die meisten Humanpathogene dar. Der mukosalen Immunisierung, d. h. dem Impfschutz der Schleimhaut selber, wird deshalb ein großes Potential zur Krankheitsprävention eingeräumt. Eine mukosale Immunisierung wird an den Schleimhäuten selbst ausgelöst. Die orale Route ist dabei eine von mehreren Möglichkeiten. Transgene Pflanzen (bzw. das transgene Pflanzengewebe), die orale Vakzine produzieren, sollen dabei als „Vehikel“ für die antigen wirkenden Untereinheiten fungieren, damit das Antigen unbeschadet in den Darm gelangt.

Der derzeitige limitierte Einsatz von oralen Vakzinen liegt an grundsätzlichen Problemen bei Schluckimpfungen: Das Vakzin muss den Wirkort im Darm erreichen und dort eine systemische und mukosale Immunantwort auslösen. Die Degradation des Antigens während der Magen-Darm-Passage, der Schleim, der die Darmwand auskleidet sowie die geringe Dichte der Antigen-sammelnden M-Zellen im Darm sind zum einen Gegenstand hoher interindividuelle Schwankungen und sind zum anderen der Grund für die notwendigen Dosen bei oralen Vakzinen im Vergleich zur injizierten Vakzinen.

Die zwei Fallbeispiele, nämlich die Impfstoffproduktion in transgenen Pflanzen gegen Hepatitis B und der Impfstoff gegen enterotoxisches Escherichia coli, zeigen, dass nach wie vor das Ziel verfolgt wird, die transgenen Pflanzen als essbare Impfstoffe herzustellen.

Die Möglichkeit, das Vakzin im transgenen pflanzlichen Gewebe zu verabreichen, hat aber zahlreiche limitierende Faktoren. Zum einen kann in transgenen Pflanzen bislang keine stets gleich hohe Produktion eines Vakzins gewährleistet werden. Vielmehr treten große Unterschiede in der Expression des Antigens zwischen verschiedenen Transformationslinien wie auch zwischen Pflanzen einer Linie auf. Bei transgenem Mais zeigen sich zusätzliche Verschiebungen in der Höhe der Transgenexpression über verschiedene Generationen hinweg. Eine Stabilisierung der Transgenexpression ist allerdings schwierig, da diese durch genetische und epigenetische Effekte beeinflusst wird, die auch durch Umwelteinflüsse bestimmt werden.

Das Erreichen einer standardisierten Impfdosis wird, so zeigen die beiden Fallbeispiele, zusätzlich dadurch erschwert, dass bisher nur unzureichend geklärt ist, in welchem Verhältnis von aktiver und inaktiver Form die Vakzine im transgenen Pflanzengewebe vorliegen.

Auch die heterogenen Ergebnisse der Untersuchungen zur Immunisierung, die in Fütterungsversuchen an Mäusen wie auch durch Tests mit menschlichen Probanden erzielt wurden, zeigen, dass über die Antigene in transgenen Pflanzen noch zu wenig bekannt ist. Es ergaben sich unterschiedliche Immunreaktionen bei derselben Pflanzenart, was an den schwankenden Impfdosen liegen mag, andererseits ergaben sich unterschiedliche Immunreaktionen, wenn das Antigen in verschiedenen Pflanzenarten verabreicht wurde.

Möglicherweise haben andere Bestandteile der transgenen Pflanzen hemmende oder fördernde Wirkung auf die Immunogenität der Antigene oder verändern diese.

Unbeantwortet blieb bisher auch die Frage, wie eine orale Toleranz vermieden werden kann, wenn die Antigene in Form von essbaren Impfstoffen mit Nahrung und in größeren Mengen zugeführt werden.

Eine direkte Gabe des Pflanzengewebes ist demnach insgesamt nicht ratsam. Vielmehr sollte eine Aufbereitung des Vakzins angestrebt werden, damit eine standardisierte Impfdosis garantiert und der Impfschutz gesichert werden kann. Eine Extraktion und Aufreinigung des Vakzins aus transgenen Pflanzen entspricht zudem dem für Impfstoffe generell geforderten Kriterium der Reinheit.

Die Diskussion der Ergebnisse zur Produktion von oralen Vakzinen in transgenen Pflanzen als essbare Impfstoffe erfolgt allerdings bereits sehr anwendungsorientiert, und es wird zukünftig noch zahlreiche weitere Forschungsarbeiten zur Produktion von oralen Vakzinen in transgenen Pflanzen als essbare Vakzine geben.

Dennoch erscheinen Ergebnisse, die über eine prinzipielle Machbarkeit von transgenen Pflanzen als essbare Vakzine im Bereich der Humanmedizin hinaus gehen werden, unwahrscheinlich, da kein standardisiertes Produkt aus transgenem Pflanzengewebe in Aussicht ist. Statt dessen wird eher der Aufwand der Aufbereitung der Antigene aus dem transgenen Pflanzengewebe untersucht werden müssen. Insgesamt sollte eine differenzierte Bewertung erfolgen, bei welchen Krankheiten eine Impfung über die orale Route überhaupt sinnvoll ist. Eine mukosale Immunisierung kann auch über eine Applikation der Antigene in Aerosolen auf Mund- und Atemwegsschleimhäute ausgelöst werden.

Bei der Forschungsförderung sollte zudem darauf geachtet werden, dass alternative Ansätze bewahrt und im gleichen Umfang gefördert werden. Zwischen den Alternativen muss nach allen zu berücksichtigenden Gesichtspunkte der nachhaltigste Weg gewählt werden können.

6 Literatur

- Alter MJ (2003): Epidemiology and prevention of hepatitis B. *Semin. Liver Dis.* 23 (1): 39-46.
- Arakawa T, Yu J, Langridge WHR (2001): Synthesis of a cholera toxin B subunit-rotavirus NSP4 fusion protein in potato. *Plant Cell Rep.* 20 (4): 343-348.
- Arntzen CJ, Mason HS, Haq TA (2001): Oral immunization with transgenic plants. *Unites States Patent.* US 6,194,560 B1. Feb. 27, 2001.
- Bellantini JA, Zeligs BJ, de Inocencio JM, Omidvar BM, Omidvar J, Awasum M (2001): Alternative routes of immunization for prevention of infectious diseases: A new paradigm for the 21st century. *Allergy Asthma Proc.* 22 (3): 173-176.
- Bellmann K, Kolb H, Rastegar S, Jee P, Scott FW (1998) : Potential risk of oral insulin with adjuvant for the prevention of Type I diabetes: A protocol effective in NOD mice may exacerbate disease in BB rats. *Diabetologia* 41: 844-847.
- Brandle JE, McHugh SG, James L, Labbe H, Miki BL (1995): Instability of transgene expression in field grown tobacco carrying the *csrl-1* gene for sulfonylurea herbicide resistance. *Bio-Technology* 13: 994-998.
- Brayden DJ (2001): Oral vaccination in man using antigens in particles: current status. *Europ. J. Pharmac. Sci.* 14 (3): 183-189.
- Carter, JE, Langridge, WHR (2002): Plant-based vaccines for protection against infectious and autoimmune diseases. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21 (2): 93-109.
- Chargelegue D, Obregon P, Drake PMW (2001): Transgenic plants for vaccine production: expectations and limitations. *Trends Plant Sci.* 6 (11): 495-496.
- Charrier B, Scollan C, Ross S, Zubko E, Meyer P (2000): Co-Silencing of homologous transgenes in tobacco. *Mol. Breeding* 6: 407-419.
- Chikwamba R, Cunnick J, Hathaway D, McMurray J, Mason H, Wang K (2002a): A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Transgenic Res.* 11 (5): 479-493.
- Chikwamba R, McMurray J, Shou HX, Frame B, Pegg SE, Scott P, Mason H, Wang K (2002b): Expression of a synthetic *E-coli* heat-labile enterotoxin B sub-unit (LT-B) in maize. *Mol. Breeding* 10 (4): 253-265.
- Chikwamba RK, Scott MP, Mejia LB, Mason HS, Wang K: (2003): Localization of a bacterial protein in starch granules of transgenic maize kernels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (19): 11127–11132.
- Crommelin DJA, Storm G, Verrijck R, de Leede L, Jiskoot W, Hennink WE (2003): Shifting paradigms: biopharmaceuticals versus low molecular weight drugs. *Internat. J. Pharmaceut.* 266: 3-16.
- Daniell H, Lee S-B, Panchal T, Wiebe PO (2001a): Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J. Mol. Biol.* 311: 1001-1009.
- Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K (2001b): Medical molecular farming: production of anti-bodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants". *Trends Plant Sci.* 6 (5): 219-226.
- Dogan B, Mason HS, Richter L, Hunter JB, Shuler ML (2000): Process options in hepatitis B surface antigen extraction from transgenic potato. *Biotechnol. Prog.* 16 (3): 435-441.
- Domansky N (1995): Organ-Specific Expression of Hepatitis B Surface Antigen in Potato. *Biotechnol. Lett.* August 1995 17: 863-866.
- Dorlhac de Borne F, Vincentz M, Chupeau Y, Vaucheret H (1994): Co-suppression of nitrate reductase host genes and transgenes in transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* 243: 613-621.
- Dymock D, Risiott R, de Pater S, Lancaster J, Tillson P, Ooms G (1991): Regulation of *Agrobacterium tumefaciens* T-cyt gene expression in leaves of transgenic tomato (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) is strongly influenced by plant culture conditions. *Plant Mol. Biol.* 17: 711-725.

- Ehsani P, Khabiri A, Domansky NN (1997): Polypeptides of hepatitis B surface antigen produced in transgenic potato. *Gene* 190 (1): 107-111.
- Ellis RW, Gerety RJ (1989): Plasma-derived and yeast derived hepatitis B vaccines. *Am. J. Infect. Control* 17 (3): 181-189.
- Elomaa P, Helariutta Y, Griessbach RJ, Kotilainen M, Seppänen P, Teeri TH (1995): Transgene inactivation in *Petunia hybrida* is influenced by the properties of the foreign gene. *Mol. Gen. Genet* 248: 649-656.
- Fooks AR (2000): Development of oral vaccines for human use. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2 (1): 80-86.
- Gao Y, Ma Y, Li M, Cheng T, Li S-W, Zhang J, Xia N-S (2003): Oral immunization of animals with transgenic cherry tomatillo expressing HBsAg. *World J. Gastroenterol.* 9 (5): 996-1002.
- Gavilanes F, Peterson DL, Gonzales-Ros JM (1992): Structure of hepatitis B surface antigen. *J. Biol. Chem.* 257: 7770-7777.
- Gerlich WH, Bruss V (1993): Functions of hepatitis B virus proteins and molecular targets for protective immunity. In: Ellis RW, Dekker M (Ed.): *Hepatitis B Vaccines in Clinical Practice*. New York 1993: 41-82.
- Gibbs MJ, Weiller GF (1999): Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96: 8022-8027.
- Gilad MK, Galun E, Mitchell L, Giladi H, Gauss-Mueller V, Galun E (2001): Immunization through oral administration of a vaccine with an edible product. Canadian Patent Application. Ca 2412343 A1 2001/12/20.
- Gomord V, Sourouille C, Fitchette A-C, Bardor M, Pagny S, Lerouge P, Faye L (2004): Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. *Plant Biotechnology Journal* 2: 83-100.
- Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ (1995): Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268: 714-716.
- Hauser P, Voet P, Simeon E (1987): Immunological properties of recombinant HBsAg produced in yeast. *Postgrad. Med. J.* 63 (Suppl. 2): S83-S91.
- Huang Z, Mason HS (2004): Conformational analysis of hepatitis B surface antigen fusions in an *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Biotechnol. J.* 2 (3): 241-249.
- Huovila A-P, Eder AM, Fuller SD (1992): Hepatitis B Surface Antigen Assembles in a Post-ER, Pre-Golgi Compartment. *J. Cell Biol.* 118: 1305-1320.
- Hüsing B (2004): Gentechnisch veränderte Pflanzen als Produktionssysteme für pharmazeutische Wirkstoffe. Bericht an den Deutschen Bundestag – vorgelegt dem Büro für Technikfolgenabschätzung des Deutschen Bundestages. Oktober 2004.
- Iyer Lakshminarayan M, Kumpatla SP, Chandrasekharan MB, Hall TC (2000): Transgene Silencing in monocots. *Plant Mol Biol* 43: 323-346.
- Jakowitsch J, Papp I, Moscone EA, van der Winden J, Matzke M, Matzke AJM (1999): Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters in trans. *Plant J.* 17: 131-140.
- Joung YH, Youm JW, Jeon JH, et al. (2004): Expression of the hepatitis B surface S and preS2 antigens in tubers of *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Rep.* 22 (12): 925-930.
- Jungi TW (2002): Das Darm-assoziierte Immunsystem. Skript der Universität Bern. <http://www.cx.unibe.ch/ivv/immunol/Scripten/13.pdf> [abgerufen am 14.12.2004].
- Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, Pniewski T, Letellier M, Lisowa O, Yusibov V, Koprowski H, Plucienniczak A, Legocki AB (1999): A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J.* 13: 1796-1799.
- Kapusta J, Modelska A, Pniewski T, et al. (2001): Oral immunization of human with transgenic lettuce expressing hepatitis B surface antigen. *Adv. Exp. Med. Biol.* 495: 299-303.
- Kirk DD, Rempel R, Pinkhasov J, Walmsley AM (2004): Application of *Quillaja saponaria* extracts as oral adjuvants for plant-made vaccines. *Expert Opin. Biol. Ther.* 4 (6): 947-958.

- Kohli A, Gahakwa D, Vain P, Laurie DA, Christou P (1999): Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. *Planta* (208): 88-97.
- Köhne S, Neumann K, Puhler A, Broer I (1998): The heat-treatment induced reduction of the pat gene encoded herbicide resistance in *Nicotiana tabacum* is influenced by the transgene sequence. *Journal of Plant Physiology* 153: 631-642.
- Kong QX, Richter L, Yang YF, Arntzen CJ, Mason HS, Thanavala Y (2001): Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (20): 11539-11544.
- Kumar GBS, Ganapathi TR, Revathi CJ, et al. (2003): Expression of hepatitis B surface antigen in tobacco cell suspension cultures. *Protein Express. Purific.* 32 (1): 10-17.
- Kumar S, Daniell H (2004): Engineering the chloroplast genome for hyperexpression of human therapeutic proteins and vaccine antigens. *Methods Mol. Biol.* 267: 365-383.
- Lamphear BJ, Streatfield SJ, Jilka JA, et al. (2002): Delivery of subunit vaccines in maize seed. *J. Control Release* 85 (1-3): 169-180.
- Langridge WHR (2001): Essbare Impfstoffe. *Spektrum der Wissenschaft* Januar 2001: 64-68.
- Lauterslager TGM, Florack DEA, van der Wal TJ, Molthoff JW, Langeveld JPM, Bosch D, Boersma WJA, Hilgers LAT (2001): Oral immunization of naïve and primed animals with transgenic potato tubers expressing LT-B. *Vaccine* 19: 2749-2755.
- Lips J (1998): Pleiotrope Effekte und genetische Stabilität transgener Pflanzen. In: Schütte G, Heidenreich B, Beusmann V (1998): Nutzung der Gentechnik im Agrarsektor der USA - Die Diskussion von Versuchsergebnissen und Szenarien zur Biosicherheit. UBA-Texte 47/98: 121-156.
- Ma S-W, Zhao D-L, Yin Z-Q, Mukherjee R, Singh B, Qin H-Y, Stiller CR, Jevnika AM (1997): Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance. *Nat. Med.* 3: 793-796.
- Ma JKC, Drake PMW, Christou P (2003): The Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins in Plants. *Nature Rev. Genet.* 4: 794-805.
- Ma S-W, Zhao D-L, Yin Z-Q, Mukherjee R, Singh B, Qin H-Y, Stiller CR, Jevnika AM (1997): Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance. *Nat. Med.* 3: 793-796
- Mäkelä H (2000): Vaccines, coming of age after 200 years. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 9-20.
- Mangold CMT, Unckell F, Werr M, Streeck RE (1997): Analysis of intermolecular disulfide bonds and free sulfhydryl groups in hepatitis B surface antigen particles. *Arch. Virol.* 142 (11): 2257-2267.
- Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ (1998): Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* 16: 1336-1343.
- Mason HS, Lam DM-K, Arntzen CJ (1992): Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 11745-11749.
- Mason HS, Thanavala Y, Arntzen CJ, Richter E (2000): Expression of immunogenic hepatitis B surface antigens in transgenic plants. World Intellectual Property Organization. WO 00/37610. 29 June 2000.
- Matzke MA, Matzke AJM, Kooter J (2001): RNA: Guiding Gene silencing. *Science* 293: 1080-1082.
- Milstien J, Dellepiane N, Lambert S (2002): Vaccine quality – can a single standard be defined? *Vaccine* 20: 1000-1003.
- Moingeon P, de Taisne C, Almond J (2002): Delivery technologies for human vaccines. *Br. Med. Bull* 62: 29-44.
- Morino K, Olsen O-A, Shimamoto K (1999): Silencing of an aleurone-specific gene in transgenic rice is caused by a rearranged transgene. *The Plant Journal* 17: 275-285.
- Neumann K, Droege-Laser W, Köhne S, Broer I (1997): Heat treatment results in a loss of transgene-encoded activities in several tobacco lines. *Plant Physiology* 115: 939-947.

- Ogra, PL, Faden, H, Welliver, RC (2001): Vaccination strategies for mucosal immune responses. Clin. Microbiol. Rev. 14 (2): 430-???.
- Ohrend, Kuhlmann I, Doerfler W (1991): Spreading of DNA methylation across integrated foreign (Adenovirus type 12) genomes in mammalian cells. J. Virology 65: 4301-4308.
- Palauqui JC, Vaucheret H (1995): Field trial analysis of nitrate reductase co-suppression. A comparative study of 38 combinations of transgenic loci. Plant Molecular Biology 29: 149-159.
- Pawlowski WP, Torbert KA, Rines HW, Somers DA (1998): Irregular pattern of transgene silencing in allohexaploid oat. Plant Mol. Biol. 38: 597-607.
- Petrovsky N, Aguilar JC (2004): Vaccine adjuvants: Current state and future trends. Immunol. Cell Biol. 82 (5): 488-496.
- Phalipon A, Sansonetti P (2000): Mucosal vaccination is finding a place among the current vaccine strategies. m/s2000 médecine / sciences 16 (8-9): 905-911.
- Pickardt T, de Kathen A (2002): Verbundprojekt "Grundlagen für die Risikobewertung transgener Gehölze". Literaturstudie zur Stabilität transgen-vermittelter Merkmale in gentechnisch veränderten Pflanzen mit dem Schwerpunkt transgene Gehölzarten und Stabilitätsgene. Texte des Umweltbundesamtes 53/02.
- Plotkin, SA (2001) : Lessons learned concerning vaccine safety. Vaccine 20: S16-S19 Suppl. 1.
- Poovorawan, Y, Chatchatee, P, Chongsrisawat, V (2002): Epidemiology and prophylaxis of viral hepatitis: A global perspective. J. Gastroen. Hepatol. 17 (Suppl.): S155-S166.
- Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS (2000): Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. Nature Biotechnology 18 November 2000: 1167-1171.
- Rigano MM, Alvarez ML, Pinkhasov J, Jin Y, Sala F, Arntzen CJ, Walmsey AM (2004): Production of a fusion protein consisting of the enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit and a tuberculosis antigen in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Rep. 22 (7): 502-508.
- RKI - Robert Koch Institut (2004): RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte. Poliomyelitis. Im November 2004 aktualisierte Fassung, Erstveröffentlichung im Epid. Bull. 27/2000. http://www.rki.de/INFEKT/INF_A-Z/RAT_MBL/POLIOMYELITIS.PDF.
- Russell-Jones GJ (2000): Oral vaccine delivery. J. Controlled Release 65(1-2):49-54.
- Sala F, Rigano MM, Barbante A, Basso B, Walmsley AM, Castiglione S (2003): Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. Vaccine 21 (7-8): 803-808.
- Shalaby WS (1995): Development of oral vaccines to stimulate mucosal and systemic immunity: barriers and novel strategies. Clin. Immunol. & Immunopath. 74(2): 127-134.
- Smith ML, Keegan ME, Mason HS, Shuler ML (2002a): Factors important in the extraction, stability and in vitro assembly of the hepatitis B surface antigen derived from recombinant plant system. Biotechnol. Prog. 18 (3): 538-550.
- Smith ML, Mason HS, Shuler ML (2002b): Hepatitis B surface antigen (HbsAg) expression in plant cell culture: kinetics of antigen accumulation in batch culture and its intracellular form. Biotechnol. Bioeng. 80: 812-822.
- Smith ML, Richter L, Arntzen CJ, Shuler ML, Mason HS (2003): Structural characterization of plant-derived hepatitis B surface antigen employed in oral immunization studies. Vaccine 21 (25-26): 4011-4021.
- Sojikul P, Buehner N, Mason HS (2003): A plant signal peptide-hepatitis B surface antigen fusion protein with enhanced stability and immunogenicity expressed in plant cells. P. Natl. Acad. Sci. USA 100 (5): 2209-2214.
- Stanley S (2002): Oral tolerance of food. Curr. Allergy Asthma Rep. 2: 73-77.
- Streatfield SJ, Howard JA (2003): Plant-based vaccines. Internat. J. Parasitol. 33 (5-6): 479-493.
- Streatfield SJ, Jilka JM, Hood EE, Turner DD, Bailey MR, Mayor JM, Woodard SL, Beifuss KK, Horn ME, Delaney DE, Tizard IR, Howard JA (2001): Plant-based vaccines: unique advantages. Vaccine 19: 2742-2748.

Streatfield SJ, Lane JR, Brooks CA, Barker DK, Poage ML, Mayor JM, Lamphear BJ, Drees CF, Jilka JM, Hood EE, Howard JA (2003): Corn as a production system for human and animal vaccines. *Vaccine* 21 (7-8): 812-815.

Tacket CO (2004): Plant-derived vaccines against diarrhoeal diseases. *Expert Opin. Biol. Ther.* 4 (5): 719-728.

Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Clements JD, Levine MM, Arntzen CJ (1998): Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat. Med.* 4 (5): 607-609.

Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM, Arntzen CJ (2000) Human Immune Responses to a Novel Norwalk Virus Vaccine Delivered in Transgenic Potatoes. *J. Infect. Dis.* 182: 302-305.

Tacket, CO, Pasetti, MF, Edelman, R, et al. (2004): Immunogenicity of recombinant LT-B delivered orally to humans in transgenic corn. *Vaccine* 22 (31-32): 4385-4389.

Thanavala Y, Yang Y-F, Lyons P, Mason HS, Arntzen C (1995): Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3358-3361.

Thanavala, Y, Scott, A, Pal, S, et al. (2000): Phase I clinical trial of orally delivered hepatitis B surface antigen expressed in potato tubers. *FASEB J* 14 (6): A1199-A1199 Suppl. 20.

Tregoning J, Nixon P, Kuroda H, Svab Z, Clare S, Bowe F, Fairwater N, Ytterberg J, van Wijk KJ, Dougan G, Maliga P (2003): Expression of tetanus toxin fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acid Research* 31 (4): 1174-1179.

Vain P, Worland B, Kohli A, Snape JW, Christou P, Allen GC, Thompson WF (1999): Matrix attachment regions increase transgenic rice plants and their progeny. *The Plant Journal* 18 (3): 233-242.

Vaucheret H, Elmayan T, Thierry D, van der Geest A, Hall T, Conner AJ, Mlynarova L, Nap JP (1998): Flank matrix attachment regions (MARs) from chicken, bean, yeast or tobacco do not prevent homology-dependent trans-silencing in transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* 259: 388-392.

Walmsley AM, Alvarez ML, Jin Y, Kirk DD, Lee SM, Pinkhasov J, Rigano MM, Arntzen CJ, Mason HS (2003): Expression of the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as a fusion protein in transgenic tomato. *Plant Cell Rep* 21 (10): 1020-1026.

Webster DE, Gahan ME, Strugnell RA, Wesselingh SL (2003): Advances in oral vaccine delivery options: what is on the horizon? *American Journal of Drug Delivery* 1 (4): 227-240.

WHO (2002): State of the World's Vaccines and Immunization. World Health Organisation (WHO). Genf: 1-97. <http://www.who.int/vaccines-documents/>.

Yu J, Langridge WHR (2001): A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nat Biotechnol* 19 (6): 548-552.

Yusibov V, Hooper DC, Spitsin S, Fleysh N, Kean RB, Mikeeva T, Deka D, Karasev A, Cox S, Randall J, Koprowski H (2002): Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine* 20 (25-26): 3155-3164.