



Julie Hélène dos Reis

Plantas como Potenciais Biorreatores de Vacinas Orais

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Maria José Gonçalves e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Julie Hélène dos Reis

Plantas como Potenciais Biorreatores de Vacinas Orais

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Maria José Gonçalves e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

A Tutora da Faculdade,

(Dr.^a Maria José Gonçalves)

A Aluna,

(Julie Hélène dos Reis)

Eu, Julie Hélène dos Reis, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012114546, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de Setembro de 2015.

(Julie Hélène dos Reis)

AGRADECIMENTOS

Para a realização da presente monografia pude contar com indispensáveis apoios e incentivos, sem os quais seria certamente mais difícil esta etapa de finalização do curso e aos quais fico eternamente grata.

À Professora Doutora Maria José Pinho Ferreira Miguel Gonçalves, quero agradecer a sua orientação, disponibilidade, prontidão e sugestões fornecidas.

Por último, dirijo o meu especial agradecimento à minha família e amigos pelo apoio incondicional, incentivo, amizade e paciência demonstrados porque sem eles nada disto seria possível.

ÍNDICE

SIGLAS E ABREVIATURAS.....	6
1.INTRODUÇÃO	9
2. VACINAÇÃO ORAL.....	12
3.LIMITAÇÕES VACINAS ORAIS E COMESTÍVEIS.....	14
4.PLANTAS TRANSGÉNICAS E MÉTODOS DE CONSTRUÇÃO.....	16
4.1.Transferência genética mediada pelo Agrobacterium e Método da biolística.....	16
4.2. Método de transformação de cloroplastos.....	17
5. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	19
6. MUCOSA GASTROINTESTINAL	19
7. VACINAS DE PLANTAS TRANSGÉNICAS	23
7.1.SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS).....	23
7.2HEPATITE B.....	24
8. RISCOS ASSOCIADOS.....	25
10. BIBLIOGRAFIA	28

SIGLAS E ABREVIATURAS

DSP - *Downstream Processing*

FDA - *Food and Drug Administration*

PMF - *Plant Molecular Farming*

WHO - *World Health Organization*

mRNA - *Ácido Ribonucleico mensageiro*

EMA - *European Medicines Agency*

DNA - *Ácido Desoxirribonucleico*

UAE-I - *Ulex europaeus agglutinin I*

Ti - *Tumor inducing*

T-DNA - *Transferred DNA*

VLPs - *Virus-Like Particles*

ISCOMs - *Immune Stimulatory Complexes*

MALT - *Tecido Linfóide Associado à Mucosa*

GALT - *Tecido Linfóide Associado ao Trato gastrointestinal*

BALT - *Tecido Linfóide Associado aos Brônquios*

EAF - *Epitélio Associado aos Folículos*

AIDS - *Síndrome da Imunodeficiência Adquirida*

HIV - *Vírus da Imunodeficiência Humana*

CDR - *Complementarity Determining Regions*

CTB - *subunidade B da Toxina Colérica*

Nef - *Negative Regulatory Factor*

HBV - *Vírus da Hepatite B*

HBsAg - *Antigénio da Superfície do Vírus da Hepatite B*

rHBsAg - *Antigénio recombinante da Superfície do Vírus da Hepatite B*

USDA - *United States Department of Agriculture*

RESUMO

As vacinas orais e comestíveis são preparações imunogénicas que contêm antígenos expressos por plantas transgénicas. As vacinas orais oferecem numerosas vantagens quando comparadas com as vacinas injetáveis, principalmente no que concerne ao combate às doenças infecciosas em países em desenvolvimento, devido ao seu baixo custo de produção e à sua fácil administração sem riscos de contaminação.

A transformação das plantas transgénicas para a produção de componentes vacinais é conseguida através de vários métodos, entre os quais o mais usado é a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, aos quais se seguem os processos de extração e de purificação, *downstream processing* (DSP).

A formação de novas vacinas orais que usam como biorreatores as plantas e que são, deve considerada juntamente com a probabilidade e severidade de potenciais riscos na sua produção e uso.

O sucesso de uso desta tecnologia é altamente dependente na gestão dos riscos pelos fomentadores desta tecnologia, e através de normas qualidade de produção que serão definidas por agências regulamentares.

Palavras Chave: Vacinas Orais, Plantas Transgénicas, Sistema Imune.

ABSTRACT

The oral and edible vaccines are immunogenic preparations containing antigens expressed by transgenic plants. Oral vaccines offer numerous advantages when compared with injectable vaccines, especially with regard to the fight against infectious diseases in developing countries due to its low production cost and easy administration, without contamination risks.

The transformation of transgenic plants for the production of vaccine components is achieved through various methods , among which the most used is the genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens*, to which the following purification and extraction processes , downstream processing (DSP) .

The manufacture of oral vaccines that use as bioreactors plants must be considered alongside the probability and severity of potential risks in their production and use.

Successful use of this technology is highly dependent on risk management by developers of this technology, and through quality standards for production, which will be set by regulatory agencies.

Key words: Oral Vaccines, Transgenic Plants, Immune system.

I. INTRODUÇÃO

As vacinas e as proteínas terapêuticas são os grandes sucessos da medicina moderna, e têm sido usados há várias décadas para prevenir doenças e erradicá-las.

Contudo, o uso de vacinas e proteínas terapêuticas é limitado, devido ao seu custo de produção, distribuição e administração (1).

Em 1982 a primeira proteína terapêutica recombinante, a insulina humana, foi introduzida no mercado e daí começou um novo ramo do desenvolvimento farmacêutico. Até hoje, mais de 130 proteínas recombinantes foram aprovadas pela *US Food and Drug Administration* (FDA) e muitas mais estão em processo de desenvolvimento. Com o aumento do número de proteínas terapêuticas, potenciais organismos usados na produção também aumentaram, tornando a modificação pós-tradução de proteínas um assunto de especial relevância. A diferença mais vincada entre pequenas moléculas de fármacos e proteínas terapêuticas é que estas últimas são dependentes de um organismo hospedeiro para a sua produção, podendo ter influência na estrutura final e ainda afetar a farmacocinética, imunogenicidade e função da proteína, dependendo do processo de produção (2).

A indústria foca prioritariamente o uso de microrganismos e de células de mamíferos, como também células de insetos e animais transgênicos na produção de proteínas farmacêuticas recombinantes. Todos estes sistemas apresentam limites, seja na capacidade de produzir proteínas complexas, seja no alto custo inicial e/ou operacional, como também o tempo que levará para o desenvolvimento do produto desejado (3).

São usadas células mamíferas modificadas para produzir proteínas terapêuticas, que têm a vantagem de resultar em produtos semelhantes aos seus equivalentes naturais. Estas células podem ser produzidas numa escala limitada, mas a sua produção é muito dispendiosa. As bactérias podem ser usadas para produção de proteínas em grande escala, mas os produtos diferem consideravelmente dos produtos naturais. Por exemplo, proteínas que são normalmente glicosiladas em humanos não são pelas bactérias (1).

É importante avaliar diferentes sistemas de produção [Tabela 1] e escolher um que assegure um produto funcional e de baixo custo.

Sistema	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
Bactéria	Regulamentação definida; genética conhecida; fácil e barato de crescer	Proteínas não são secretadas usualmente; contém endotoxinas; não ocorrem modificações pós translacionais.	Insulina (<i>E. Coli</i> –Ely Lilly); hormona de crescimento (Genentech); fator de crescimento; interferão.
Leveduras	Conhecido como “seguro”; histórico de uso; rápido; barato; modificações pós-translacionais.	Glicosilação pode arruinar a bioatividade; segurança; potência; pureza; contém agentes imunogênicos e antigênicos.	Fermentação da cerveja; vacinas recombinantes; vacina hepatite b viral; insulina humana.
Células dos insetos	Modificações translacionais; proteínas enoveladas corretamente; níveis de expressão fracos.	Regulamentação incompleta; crescimento lento; meio caro; infecção por baculovirus (etapa extra); vírus humanos podem infectar as células .	Método relativamente novo; Novavax produz vírus como parículas.
Células humanas	Usualmente as proteínas são enoveladas corretamente; modificações pós-translacionais corretas; bom histórico de regulamentação; única opção no caso de proteínas grandes.	Método caro; crescimento lento; pode conter agentes alergênicos e contaminantes; purificação complicada.	Ativador plasmogênico de tecido; fator VIII (glicoproteína); anticorpos monoclonais (Herceptin).
Animais Transgênicos	Processamento de proteínas complexas; excelentes níveis de expressão; escala fácil; baixo custo de produção.	Pouca experiência em regulamentação: potencial para contaminação viral; escalas demoradas/longas; isolamento/GMP's no local de criação.	Lipase (coelhos, ovelhas; PPL Therapeutics); hormona do crescimento (cabras; Genzyme); fator VIII (gado).
Plantas Transgênicas	Ciclos de desenvolvimento pequenos; fácil armazenamento das sementes; bom nível de expressão; não existe conhecimento sobre vírus de plantas que tenham contaminado humanos.	Apresenta potencial para novos contaminantes (fungos no solo, bactérias e pesticidas); modificações pós translacionais; possibilidade de conter agentes alergênicos.	Vacina cólera (tabaco; Chorogen, Inc.); lipase gástrica (milho; Meristem); Hepatite B (batatas; Boyce Thompson)

Tabela I - Comparação entre sistemas utilizados na produção de medicamentos (3).

A maioria dos genes pode ser expressa em numerosos sistemas por isso é essencial determinar qual o sistema que oferece mais vantagens para produção. O sistema escolhido, idealmente, produziria o material mais produtivo a preço mais baixo. Provavelmente, nenhum sistema será ideal para todas as proteínas mas, algumas ponderações, para cada proteína recombinante produzida, decidirão a escolha do sistema de produção, tais como, segurança do produto, produção, características específicas da proteína, condições de

armazenamento, custos de produção, técnicas de purificação, mercado, preocupações ambientais, percepção pública e concorrência (4).

As plantas oferecem numerosas vantagens na fase de produção, incluindo o baixo custo de infraestruturas e de produção, a diminuição do risco de contaminação por potenciais agentes infecciosos humanos pois estas são incapazes de os replicar, e a incomparável produção agrícola em grande escala. Outra característica chave das plantas é a diversidade de sistemas de produção, que se refletem no uso de diferentes espécies de plantas, tecidos ou células, formas de cultivo e técnicas de expressão, o que pode afetar o rendimento do produto e modificações pós- tradução como a glicosilação (5).

A produção de fármacos recombinantes, proteínas funcionais, enzimas industriais e metabolitos secundários em plantas são denominadas como “*plant molecular farming*” (PMF). Estas são produzidas utilizando a engenharia genética para se conseguir compostos específicos, especialmente proteínas, que são extraídas e purificadas após serem colhidas. As PMF são promissoras fontes mais baratas e disponíveis de fármacos, incluindo proteínas terapêuticas e vacinas (3).

Ainda relevante, as células vegetais apresentam vantagens na produção de proteínas imunogénicas com potencial para produzir novas vacinas disponíveis para o mercado imunológico. O crescente interesse nesta tecnologia levou à avaliação em ensaios clínicos de um certo número de vacinas, algumas delas consideradas perto da comercialização (3).

2. VACINAÇÃO ORAL

As atuais vacinas podem ser definidas como suspensões ou soluções farmacêuticas de uma substância imunogénica, com a finalidade de induzir a imunidade ativa. São um dos meios mais revolucionários usados na prevenção contra milhares de epidemias. Os agentes imunizantes ativos são de praticamente todas as perspectivas, os fármacos mais bem sucedidos e mais poderosos até agora desenvolvidos. A vacinação é o processo pelo qual fármacos imunogénicos são administrados em pacientes antes de serem expostos a uma doença, com a intenção de proporcionar a longo prazo, ou mesmo permanentemente, proteção contra doenças (6).

Atualmente, as doenças infecciosas são a principal causa de mortalidade infantil nos países em desenvolvimento. A principal razão é a falta de vacinas e de outras proteínas terapêuticas, tais como anticorpos monoclonais, de baixo custo e de fácil acesso, que normalmente são fáceis de adquirir em países industrializados (7). Com base em relatórios de 1992 da WHO que afirmam que vacinas para crianças devem ser de baixo custo, de fácil administração e facilmente geradas sob certas condições ambientais, torna-se concebível que vacinas comestíveis com origem de plantas possam ser um dos candidatos mais eficazes para serem administrados em crianças (6). As vacinas orais oferecem vantagens significativas em comparação com as vacinas de administração parentérica no que diz respeito à melhoria dos resultados da vacinação infantil universal. A expressão de antígenos em plantas transgênicas tem a capacidade de proporcionar uma via segura e conveniente para a vacinação oral e assim tornar possível uma alternativa às tradicionais vacinas parentéricas (8).

A maior vantagem dos sistemas de expressão em plantas é o seu reduzido custo de produção quando comparado com outros sistemas de produção de vacinas. O elevado custo das atuais vacinas e biofármacos é em grande parte resultado de métodos complexos de produção e distribuição, incluindo significativos custos de sistemas de purificação e fermentação e despesas adicionais com adjuvantes, armazenamento, transporte e fornecimento estéril. Fermentadores e biorreatores podem ser substituídos por salas próprias para o crescimento de plantas, estufas ou então estas podem crescer no campo contendo os genes de interesse, ou ainda pela expressão em tecido vegetais com respetiva colheita antes de se formarem estruturas reprodutivas. Estes métodos levam conseqüentemente à diminuição dos custos nas etapas iniciais de produção. No caso de vacinas orais produzidas a partir de plantas as etapas finais de produção também têm os custos reduzidos. Em vez de a purificação das proteínas atingir elevado grau de pureza, os tecidos das plantas podem ser processados para administração oral sem qualquer custo. A

tecnologia mais relevante já foi desenvolvida em indústrias de alimentação humana e animal e pode agora ser adaptada à produção de proteínas terapêuticas a partir de plantas (9).

Produtos de saúde humana administrados oralmente, evitam os problemas associados ao custo e segurança dos produtos injetáveis. Com a administração oral não são necessárias agulhas, seringas ou pessoal qualificado para a sua respectiva administração. Os custos relacionados com a toma são reduzidos, e as preocupações acerca de contaminações decorrentes devido à eliminação incorreta ou reutilização de seringas usadas deixam de existir. O seu baixo custo e facilidade de administração deve resultar num aumento significativo de pacientes vacinados. Torna-se uma realidade não só nos países em desenvolvimento, onde o acesso à saúde médica é limitado, mas também em países desenvolvidos, quando o paciente necessita de várias inoculações de reforço (6,10). Além disso, as plantas têm a capacidade de expressar mais do que um transgene, possibilitando a administração de vários antígenos em diferentes inoculações no caso de vacinas que precisam de revacinação para produzir células de memória (6).

As vacinas comestíveis provêm de plantas, são administradas por via oral e preparadas usando plantas transgênicas. Estas expressam proteínas antigénicas capazes de induzir imunidade contra várias doenças humanas e animais. A primeira vacina comestível (proteína da superfície do *Streptococcus*) foi obtida a partir da planta do tabaco em 1990, na qual foi encontrado 0,02% da proteína recombinante do total de proteínas solúveis da folha (6).

As vacinas comestíveis são capazes de ativar tanto a imunidade sistémica como o sistema imune da mucosa. Visto que não existem agentes patogénicos humanos ou animais capazes de contaminar as plantas, são excluídas preocupações com contaminações prévias e virais. É possível a formulação de vários componentes vacinais, misturando a semente de linhas transgênicas que expressam diferentes proteínas. Além destas vantagens, as vacinas comestíveis, protegem contra infeções do trato respiratório e digestivo, detêm estabilidade térmica, e ao contrário do que acontece nas companhias farmacêuticas, as plantas transgênicas não necessitam de cadeias de frio para armazenamento, que chegam a custar entre 200 a 300 milhões de dólares por ano para preservar as vacinas. A produção em massa de vacinas comestíveis é também possível, pois as plantas podem ser facilmente reproduzidas quando equiparadas aos animais usados como sistemas de produção de vacinas. Associado a todos estes benefícios está também o baixo risco de contaminação comparando com as vacinas produzidas por bactérias (6).

3.LIMITAÇÕES VACINAS ORAIS E COMESTÍVEIS

Apesar de todas as vantagens supracitadas, existem algumas limitações relacionadas com as vacinas comestíveis. A mais proeminente é a variação da dosagem de acordo com o tamanho do fruto ou parte da planta onde a vacina é processada. A seleção da planta é um processo demorado e os riscos associados a contaminações atmosféricas são elevados. A estabilidade das vacinas produzidas como frutos, que são cozidos antes de serem usadas é imprevisível. O estado em que cada fruto maduro deve ser consumido não é comunicado a cada pessoa que o compra (6).

Um dos problemas mais comuns é o facto de muitos antigénios orais não serem imunogénicos, ou seja, não são reconhecidos como sendo agentes estranhos pelo sistema imune do intestino. São então usados adjuvantes, como por exemplo, a subunidade B recombinante não tóxica da toxina da cólera que é um imunogénio da mucosa frequentemente usado e aplicado na administração de vacinas derivadas de plantas (7).

Como meio de melhorar a administração e a eficácia das proteínas terapêuticas formadas nas plantas tem havido investigações que ajudam no reconhecimento de meios para atingir com maior eficiência as células epiteliais. Embora não muito imunogénica, a lectina UAE-I da planta *Ulex Europaeus* é caracterizada por se ligar às superfícies apicais das células epiteliais e endoteliais e é um dos marcadores clássicos das células epiteliais. Além de ser um agente localizador epitelial, um estudo realizado em 2005 remete que a lectina ligada às partículas origina uma resposta imunológica mais rápida (11).

A maior limitação da expressão de antigénios recombinantes em plantas transgénicas é a obtenção da concentração adequada para conferir uma total imunidade, dada a variedade de proteínas expressas nas diferentes espécies de plantas. De modo a contornar esta variedade, o controlo dos rendimentos da expressão de proteínas será provavelmente necessário para assegurar uma imunização eficaz e consistente (12). Sabe-se que o nível de expressão varia dependendo do estado de desenvolvimento do tecido da planta, da altura do dia e dos fatores reguladores usados, destacando a importância do estado de desenvolvimento das plantas e altura em que foi colhida. Além disso, existem estudos limitados para a determinação da estabilidade das proteínas terapêuticas após a colheita, processamento e armazenamento (9).

Apesar da produção de antigénios, a partir de plantas, ser aceite na comunidade científica e apontada como uma alternativa promissora à produção tradicional de vacinas, algumas questões continuam em aberto; o controlo dos níveis de antigénios produzidos e o licenciamento deste método (9).

A escolha da espécie da planta, os níveis de expressão do transgene e a estabilidade do antígeno produzido são algumas das limitações dos métodos de expressão em plantas transgênicas. Contudo, o controle da expressão do transgene irá depender do promotor, da estabilidade do mRNA e dos codões otimizados da espécie da planta. A estabilidade dos antígenos pode ser mantida a partir de estratégias onde é utilizado o apoplasto como local de secreção de antígenos (13).

Relativamente a limitações regulamentares, apesar das vacinas transgênicas já terem sido referenciadas pela EMA e a FDA, continua a não existir um sistema regulamentar que permita o licenciamento da sua produção (14).

4.PLANTAS TRANSGÊNICAS E MÉTODOS DE CONSTRUÇÃO

4.1.Transferência genética mediada pelo *Agrobacterium* e Método da biolística

PMF (*plant molecular farming*) para serem produzidas necessitam que o DNA que irá codificar as proteínas de interesse seja introduzido nas plantas selecionadas para este fim, para isso ao longo de vários anos, múltiplos métodos têm sido desenvolvidos (12).

Existem dois métodos mais usados para dar origem a linhagens de plantas transgênicas que produzem PMF: sistema de *Agrobacterium* e Biolística. A escolha destes métodos depende de diferentes fatores, tais como a espécie hospedeira selecionada. Outros métodos como a transformação Whiskeer, Electroporação e transformação do protoplasto encontram-se em desuso (10).

Atualmente, há dois métodos direcionados para a produção de vacinas a partir de plantas transgênicas: um é o uso de plantas para produzir proteínas antigênicas em abundância, processando-as em vacinas após a sua separação e purificação; o outro método consiste no uso direto de plantas comestíveis ou tecidos de plantas para congregarem a proteína de interesse usando-a como vacina oral/comestível sem precisar de isolamento e purificação (15,16).

Apesar de numerosas proteínas terapêuticas terem sido expressas em células vegetais, [Tabela 2] ainda permanecem vários desafios (9).

Na Natureza, as células das plantas vivem muitas vezes em íntima associação com certas bactérias, o que pode ser um veículo favorável para a introdução de DNA clonado nas plantas. A bactéria *Agrobacterium tumefaciens* é a mais usada na transformação em espécies monocotiledóneas assim como em dicotiledóneas. O método bolística é menos dependente do genótipo e mais adequado para a transformação nos plastos (2,10).

A *Agrobacterium tumefaciens* é responsável pela formação de tumores (*galls*). Durante a infecção a bactéria transfere parte do seu DNA para a planta, DNA este que é integrado no genoma da hospedeira, causando a produção de tumores e mudanças associadas ao metabolismo da planta. Estudos demonstraram que a maioria dos genes envolvidos na doença causada por esta bactéria não são originários do seu cromossoma, mas de um grande plasmídeo denominado de Ti (= Tumor inducing), mais precisamente, num segmento de DNA do plasmídeo denominado de T-DNA (Transferred DNA) (13).

Aproveitando esta característica inerente a esta bactéria, selecionam-se genes que são colocados no T-DNA do plasmídeo bacteriano para que possam ser integrados nos cromossomas da planta aquando da transferência do T-DNA. A base desta técnica é a

extração do T-DNA da *A. Tumefaciens* e a sua integração no genoma da planta como parte natural do processo infeccioso protagonizado por esta bactéria. Assim, qualquer gene pode ser introduzido numa célula vegetal. Todavia, para aproveitar estas propriedades naturais para a transferência de genes de interesse em plantas é necessário eliminar as características indesejáveis do T-DNA, mantendo a sua capacidade de se integrar no genoma da planta hospedeira (13).

O T-DNA da *Agrobacterium* é transportado até ao núcleo e portanto fica inacessível para ser transferido para os cloroplastos, mas apesar da sua inadequabilidade nos cloroplastos é a técnica de eleição para ser usada nos cereais, como o arroz, milho e trigo, em soja e outros legumes (2).

Agrobacterium rhizogenes é apropriada para a produção de culturas de raízes transgênicas (6).

Para evitar a transferência de sequências vetoriais durante a transformação, a incorporação do gene *bar* (proteína bacteriana) fora das *border sequences* do T-DNA é uma técnica que funciona aquando da transformação pela *Agrobacterium* (6).

4.2. Método de transformação de cloroplastos

Um método alternativo aos supracitados é o método de transformação de cloroplastos (transformação genética direta). Esta alternativa expressa grande quantidade de produtos recombinantes, resultado do número elevado de cloroplastos e das múltiplas cópias de cromossomas que levam a que as células contenham muitas cópias do transgene o que origina taxas elevadas de expressão sem que haja silenciamento génico (6,13).

Source of the protein and target species for the vaccine	Protein or peptide expressed	Plant expression system	Maximum recorded expression level in <i>planta</i>	Integrity, immunogenicity and protective capacity of the vaccine	Refs
Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (humans)	Heat-labile toxin B-subunit	Tobacco	<0.01% TSP ^a	Intact protein forms multimers and is immunogenic when administered orally	14
Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (humans)	Heat-labile toxin B-subunit	Potato	0.19% TSP	Receptor-binding activity and immunogenic and protective when administered orally	14,22,25
Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (humans)	Heat-labile toxin B-subunit	Maize	Not given	Immunogenic and protective when administered orally	30
<i>Vibrio cholerae</i> (humans)	Cholera toxin B-subunit	Potato	0.30% TSP	Intact protein forms multimers, has receptor-binding activity and is immunogenic and protective when administered orally	18,19
Hepatitis B virus (humans)	Envelope surface protein	Tobacco	<0.01% TSP	Virus-like particles form and extracted protein is immunogenic when administered by injection	15,23
Hepatitis B virus (humans)	Envelope surface protein	Potato	<0.01% FW ^b	Immunogenic when administered orally	31
Hepatitis B virus (humans)	Envelope surface protein	Lupin (<i>Lupinus</i> spp.)	<0.01% FW	Immunogenic when administered orally	27
Hepatitis B virus (humans)	Envelope surface protein	Lettuce	<0.01% FW	Immunogenic when administered orally	27
Norwalk virus (humans)	Capsid protein	Tobacco	0.23% TSP	Intact protein and virus-like particles form, immunogenic when administered orally	16
Norwalk virus (humans)	Capsid protein	Potato	0.37% TSP	Virus-like particles form and immunogenic when administered orally	16,26
Rabies virus (humans)	Glycoprotein	Tomato	1.00% TSP	Intact protein	17
Human cytomegalovirus (humans)	Glycoprotein B	Tobacco	<0.02% TSP	Immunologically related protein	32
Rabbit hemorrhagic disease virus (rabbits)	VP60	Potato	0.30% TSP	Immunogenic and protective when administered by injection	28
Foot-and-mouth disease virus (agricultural domestic animals)	VP1	<i>Arabidopsis</i>	Not given	Immunogenic and protective when administered by injection	20
Foot-and-mouth disease virus (agricultural domestic animals)	VP1	Alfalfa	Not given	Immunogenic and protective when administered by injection or orally	24
Transmissible gastroenteritis coronavirus (pigs)	Glycoprotein S	<i>Arabidopsis</i>	0.06% TSP	Immunogenic when administered by injection	21
Transmissible gastroenteritis coronavirus (pigs)	Glycoprotein S	Tobacco	0.20% TSP	Intact protein and immunogenic when administered by injection	29
Transmissible gastroenteritis coronavirus (pigs)	Glycoprotein S	Maize	<0.01% FW	Protective when administered orally	30

^aTSP, total soluble protein.
^bFW, fresh weight.

Tabela 2- Proteínas com aplicações para vacinas animais e humanas e expressas por plantas transgênicas (17).

5. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Contrariamente à utilização de métodos standarizados, como plataformas de células animais ou microrganismos, para produção de proteínas recombinantes na indústria biofarmacêutica, a utilização de plantas como sistemas de expressão proteica, pode oferecer um processo de manufactura economicamente rentável. Contudo, são vários os desafios inerentes ao estabelecimento de procedimentos para obtenção de proteínas biofarmaceuticas a partir de plantas (5).

Embora o alto nível de expressão de proteínas, é necessário fornecer meios para um alto rendimento dos sistemas de produção vegetais, e também uma eficiente recuperação das proteínas recombinantes (13).

Os principais desafios denotam-se nas etapas finais, denominados de *downstream processing* (DSP). Tal, deve-se à fisiologia vegetal; entre várias espécies de planta denota-se que a expressão proteínas intracelular ocorre em várias partes da planta. Deste modo, a extração proteica no DSP, e sua purificação, fica comprometida pela presença de contaminantes solúveis, derivados da própria planta (5).

As tecnologias apontadas no DSP, de forma a acelerar e simplificar o processo de extração são: centrifugação, filtração, floculação e métodos combinados de extração sólido-líquido com purificação ou decantação. Outro método para obtenção das proteínas recombinantes, é usufruir dos seus marcadores específicos; contudo a transposição deste método para a escala comercial é ainda utópica (5).

Em suma, os métodos de extração e purificação das proteínas produzidas a partir de plantas, podem basear-se nos métodos utilizados em células animais ou a partir de microrganismos; o elemento crucial é identificar os contaminantes solúveis, específicos de cada espécie da planta utilizada, na fase DSP, de forma a ajustar o método selecionado. A standarização dos procedimentos do DSP resultará na viabilização da obtenção de proteínas recombinantes a partir de plantas à escala industrial (5,18).

6. MUCOSA GASTROINTESTINAL

A mucosa gastrointestinal representa a área mais imunologicamente ativa do ser mamífero. É ainda composta por componentes especializados do sistema imunitário inato, que fornecem células responsáveis pela captação dos antígenos e pelo processamento e secreção de sinais pró-inflamatórios, e também por componentes especializados do sistema imunitário adaptativo que são responsáveis pela identificação do antígeno, funções específicas efetoras e pela memória imunológica [Figura 1] (8,19).

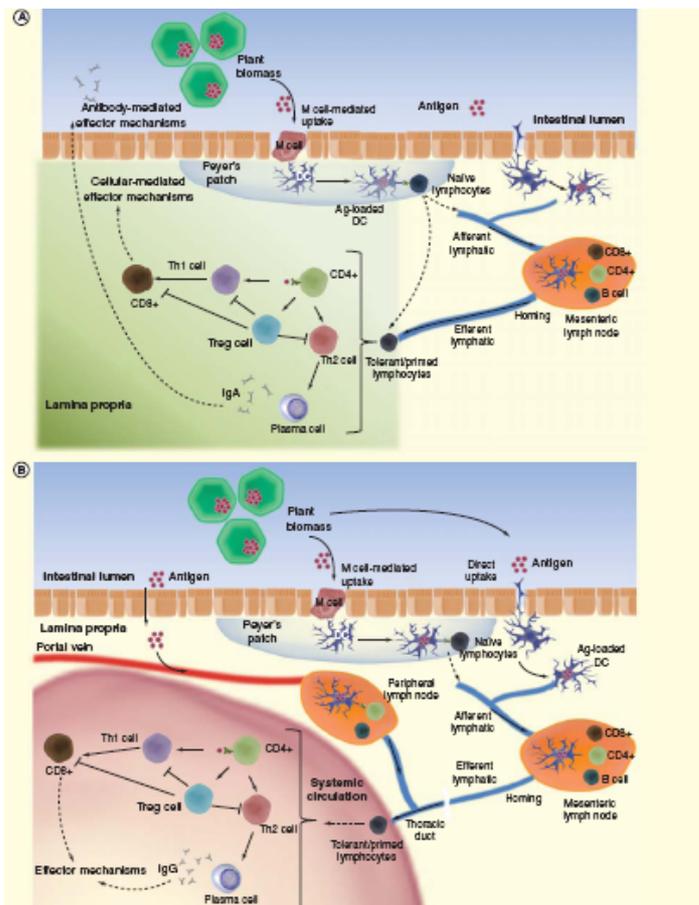


Figura 1- Esquema do mecanismo envolvido na resposta imune da imunização oral por vacinas derivadas de plantas (19).

Células do sistema inato e adaptativo fazem parte deste tecido especializado, para o protegerem de agentes patogénicos que atingem o organismo. Uma vez que estas células efectoras estão localizadas na mucosa, apraz concluir que proporcionam a oportunidade de induzir uma resposta imune na área onde o agente patogénico é introduzido através do uso de vacinas orais que atuam na mucosa (19).

O contato dos antígenos com o meio ácido do estômago e a duração da imunização oral podem comprometer a integridade dos imunogénicos, que em situações normais seriam eficazes na imunização parental (19).

O sistema imune na mucosa dos mamíferos consiste num conjunto de linfócitos que juntamente com células do sistema imune inatas estimulam a defesa do hospedeiro nestes tecidos. Além das células que integram o sistema imune da mucosa, as moléculas que são produzidas por estas mesmas células contribuem também para a imunidade total contra agentes estranhos potencialmente imunogénicos. A defesa da mucosa é mediada pela imunoglobulina A secretada e citocinas (19).

Tendo em consideração a estabilidade e proteção dos antígenos da vacina oral contra pH ácido e enzimas digestivas do estômago, os antígenos devem agregar-se em estruturas ordenadas, como partículas semelhantes a vírus, VLPs ou obter proteção a partir da encapsulação em lipossomas, microesferas, ISCOMs (*immune stimulatory complexes*) e niossomas. Além disso, tem havido estudos que remetem para a proteção dos antígenos expressando o gene que codifica a proteína de interesse em agentes patogénicos comensais ou agentes patogénicos atenuados entéricos, ambos apresentando resistência ao ambiente ácido gastrointestinal (20).

A formulação de vacinas orais tem sido um desafio devido, não só, às dificuldades advindas acerca da degradação dos antígenos, mas também devido à natureza tolerogénica do sistema imune da mucosa e aos riscos envolvidos no uso de plantas alimentares (19).

A tolerância ou a falta de resposta imunológica contra bactérias e antígenos não patogénicos são a característica fundamental do sistema imune da mucosa maioritariamente causadas pelas células T através da produção de mediadores solúveis. Este tipo de tolerância é considerado o maior mecanismo de defesa imunitária pelo qual potenciais respostas imunes prejudiciais contra antígenos são evitadas. Embora a indução da tolerância imunitária seja um processo complexo, sabe-se que a dosagem está estreitamente relacionada com a mesma. Doses mais elevadas com um período de administração longo foram empregues com sucesso na indução da tolerância imunitária. Algumas vacinas com origem de plantas usaram este método como meio de suprimir as respostas imunitárias responsáveis por doenças auto imunes e alergias (19).

A tolerância oral é um processo ativo, que funciona criando linfócitos T específicos para antígenos que suprimem a estimulação imunitária. É portanto definida como a supressão das respostas imunitárias celulares e humorais para antígenos administrados oralmente. Para além desta ação supressora por parte das células T, a anergia e a eliminação de células T têm sido descritas como mecanismos de tolerância oral subjacente. Consequentemente, esta tolerância por parte da mucosa intestinal protege-a de respostas imunitárias inflamatórias prejudiciais. A ativação que acontece no processo de indução da tolerância oral é importante para a maturação do sistema imune. Uma deficiência na formação da ação supressora das células T contra antígenos existentes na alimentação e bactérias comensais pode levar à hipersensibilidade a alimentos e à doença celíaca. Devido à grande variedade de antígenos envolvidos, surge a anulação de diferentes tipos de respostas imunes, entre as quais a hipersensibilidade retardada e a produção de anticorpos (21).

Quando uma ação imune efetora é pretendida para fins profiláticos ou terapêuticos, é requerida uma imunização oral que supere e que de certa maneira evite a ativação das células T regs de modo a que não ocorra a indução da tolerância aos agentes patogênicos (19).

Após serem administrados os antígenos devem alcançar a mucosa para aí serem processados e induzirem uma ação imunitária, que é conseguida através dos elementos que fazem parte do tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal (19).

No que diz respeito à constituição da mucosa conclui-se que os linfócitos da mucosa estão organizados em estruturas que cobrem todo o tecido da mucosa, a que se dá o nome de tecido linfóide associado à mucosa (MALT). O tecido MALT pode ter várias designações dependendo da área onde se encontra, tais como tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal (GALT) e tecido linfóide associado aos brônquios (BALT). O órgão mais importante do tecido GALT, são as placas de Peyer, que podem ser vistas microscopicamente como aglomerados linfóides com centros foliculares no íleo do intestino delgado nos humanos (22).

As placas de Peyer estão organizadas como aglomerados linfóides com centros foliculares, rodeados por uma camada epitelial de células chamada de epitélio associado aos folículos (EAF), que difere da camada epitelial presente nas restantes vilosidades intestinais. Apesar de não possuir nenhum elemento secretor, o EAF contém células especializadas encontradas primariamente nas placas de Peyer, as células M. As células M são desprovidas de um citoesqueleto rígido, e o seu processo permite que interajam com linfócitos e células dendríticas circundantes. Estas células têm a função de capturar e transportar vírus e bactérias, assim como outras partículas. Pensa-se que a apresentação dos antígenos às

células T não é feita pelas células M, uma vez que estas só funcionam como um portal de entrada de antígenos na zona folicular das placas de Peyer. Por sua vez as células dendríticas capturam os antígenos e microorganismos que são transportados no lúmen pelas células M, migrando para zonas de células T nos folículos das placas de Peyer ou para nódulos linfáticos mesentéricos. Vários estudos identificaram tanto as placas de Peyer como os nódulos linfáticos mesentéricos como zonas de ativação e apresentação dos antígenos às células T respondendo à administração de antígenos administrados oralmente em ratos. Contudo, também têm sido detectados antígenos nos gânglios linfáticos esplênicos e periféricos, levando à ativação de células T, o que leva a crer que respostas imunes sistêmicas em órgãos linfoides periféricos sem mucosa podem ser conseguidas pela administração oral de antígenos (14).

A ligação a uma molécula alvo ou a uma proteína transportadora mostrou resultar num aumento da imunogenicidade de subunidades vacinais orais (23).

7. VACINAS DE PLANTAS TRANSGÊNICAS

7.1 SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS)

O Síndrome da Imunodeficiência Adquirida infeta e causa a destruição dos linfócitos TCD4. A proteína Tat do Virus tipo I da imunodeficiência humana (HIV-1) é um potente transativador transcricional. A proteína Tat é importante na replicação viral, transmissão e desenvolvimento da doença. Na ausência desta proteína, nenhuma ou uma quantidade insignificante de estruturas proteicas são expressas, e portanto nenhum vírus infeccioso é formado. Desta maneira, a proteína Tat do HIV-1 é uma potencial e promissora candidata a ser usada como vacina (6, 7).

A glicoproteína gp160 é precursora dos péptidos gp120 e gp41 e apresenta uma elevada importância no ciclo de vida do retrovírus, permitindo a ligação aos recetores celulares e controlando a fusão entre o vírus e as membranas celulares durante a infeção. O loop V3 da gp120 do HIV-1 liga-se diretamente a uma sequência proteica dos linfócitos que contém uma região semelhante às CDR (*complementarity determining regions*) das imunoglobulinas. Assim o loop V3 da glicoproteína gp120 poderá ser útil como antígeno de uma vacina na neutralização de anticorpos prevenindo a ligação do HIV-1 aos recetores das células TCD4 (6).

No caso da vacina em que o antígeno é a proteína Tat, há a fusão do DNA complementar com a porção c-terminal da subunidade b da toxina colérica (ctxB-tat) e introdução nas células da planta *Solanum tuberosum*, pela técnica da *Agrobacterium tumefaciens*. A síntese e a junção de monómeros CTB-Tat em oligómeros biologicamente ativos usando tecidos de tubérculos de batata, demonstram a viabilidade de usar antígenos virais patogênicos sintetizados em plantas comestíveis, para a imunização contra a infecção do HIV-1. As respostas celulares e humorais da proteína Tat do HIV-1 oferecem um atraso na progressão da doença em humanos e em macacos (6).

No caso de o antígeno se tratar do loop V3 da glicoproteína gp120 do envelope, a fusão dos genes CTB-gp120 pode ser expressa e introduzida numa planta comestível. O loop V3 pode assim ser usado para neutralizar os péptidos imunogênicos do HIV-1. Contudo, além destas duas proteínas serem duas promissoras vacinas contra o HIV-1, acredita-se que a proteína Nef (*Negative Regulatory Factor*) também o seja, pois as respostas imunitárias que acontecem quando em contacto com esta proteína viral ajudam a controlar o início da infecção viral e reduzem a carga viral e propagação (6).

7.2 HEPATITE B

De acordo com estimativas feitas pela WHO, 2 bilhões de pessoas por todo o mundo têm ou tiveram suspeitas de infecção pelo vírus da hepatite B. Cerca de 360 milhões de pessoas estão cronicamente infetadas, e ocorrem aproximadamente 600,000 mortes devido a doenças acarretadas pelo vírus, como a cirrose ou carcinoma hepatocelular. Em acréscimo a estes dados 4,5 milhões de novas infecções de HBV ocorrem por ano.

Uma alternativa à imunização parental é o desenvolvimento de vacinas que podem ser administradas oralmente, por isso uma possível opção para a imunização oral do HBV é a expressão de antígenos em plantas transgênicas. A expressão em tecidos de plantas transgênicas apresentam as vantagens discutidas anteriormente, como a capacidade de estimular a imunidade humoral e da mucosa, resultando na proteção mais eficaz do que a imunização parental (7,14).

Várias equipas de investigação expressaram a proteína HBsAg (antígeno de superfície) em vários tecidos de plantas. O primeiro documento publicado em 1992 demonstrou que as folhas da planta do tabaco são capazes de expressar um antígeno da vacina viral. Com base nesses resultados foi feito um estudo em que se usou extrato purificado de folhas de tabaco e frações concentradas de HBsAg foram usadas para imunizar ratinhos. A resposta serológica de anticorpos anti-HBs incitada pela proteína recombinante derivada da planta do

tabaco, rHBsAg, foi qualitativamente semelhante à obtida pela imunização com rHBsAg proveniente da levedura. Este estudo indica-nos que a proteína rHBsAg derivada da planta do tabaco possui as propriedades necessárias para induzir as respostas específicas das células B e T contra o antígeno(14,24).

Além deste estudo foram realizados outros com o objetivo de avaliar a imunogenicidade oral do HBsAG, a partir de tubérculos da batata, e comparar o seu efeito protetivo anti-HbsAg com a vacina licenciada da hepatite, em ratinhos. Ao grupo experimental foram administradas 42 microgramas de HBsAg por dose de tubérculo de batata, associado a um adjuvante de mucosa. Este estudo permitiu concluir a necessidade de um adjuvante de mucosa de forma a haver imunogenicidade oral a HbsAg nos ratinhos e determinou que as vacinas de plantas transgênicas têm o potencial de atuar como reforço oral em ratos já imunizados com uma dose parentérica de rHBsAg (14).

A partir do mesmo tipo de tubérculo de batata, foi, posteriormente, desenvolvido um estudo piloto em humanos previamente imunizados com a vacina. Com o objetivo de avaliar a imunogenicidade para o HBsAg, verificou-se um aumento do anti-HBsAg no soro de 62,5% dos voluntários. Tal, permite correlacionar a proteção a partir da administração oral do tubérculo de batata contra o vírus da hepatite B. Contudo é apontada a necessidade de novos estudos, de forma a avaliar a correlação com adjuvantes da mucosa de forma a aumentar a eficácia imunizadora (14).

8. RISCOS ASSOCIADOS

A produção de vacinas em plantas transgênicas foi proposta pela primeira vez em 1990, no entanto nenhum produto foi ainda comercializado.

Existem vários riscos com potencial impacto no ambiente e na saúde humana. Os riscos para o ambiente incluem a transferência de genes e a exposição a antígenos. Os riscos para a saúde humana incluem a tolerância oral, alergias, dosagem insuficiente, a exposição do trabalhador e a exposição não intencional de antígenos na cadeia alimentar (25).

Seis principais riscos foram identificados como potenciais preocupações devido aos métodos de produção de vacinas a partir de plantas:

Alergias: os produtos transgênicos podem ser submetidos a processos pós-tradução quando comparados com o agente patogênico natural, o que poderá induzir novas reações alérgicas quando ingeridos. O uso de adjuvantes orais para estimular a mucosa pode provocar reações de hipersensibilidade a outras proteínas;

Efeitos prejudiciais para o ambiente: a perda ou degradação de componentes celulares pode ter implicações alérgicas e toxicológicas desconhecidas;

Tolerância Oral: Se o antígeno é administrado frequentemente ou em doses pequenas repetidas, o sistema imune da mucosa torna-se insensível à vacina não conseguindo combater a doença;

Transferência de Genes: A transferência do antígeno para os alimentos convencionais através da hibridação genética ou contaminação do produto pode levar à tolerância oral;

Dosagem: Uma quantidade insuficiente de antígenos pode não estimular uma resposta imunológica suficiente para combater a doença. A frequência ou a dosagem incorreta pode levar à intolerância e à ineficácia da vacina;

Exposição do trabalhador: O contacto ou a inalação de materiais da planta durante a produção podem levar à intolerância ou a reações alérgicas (25).

Todos os riscos identificados são regulados nos EUA pela USDA (*United States Department of Agriculture*) ou pela FDA. As características específicas da administração oral destes produtos só pode ser percebida através de ensaios de segurança pré-clínicos e clínicos da vacina, que são pedidos pela FDA no desenvolvimento de vacinas e processo de licenciamento (25).

9. CONCLUSÃO

Vacinas derivadas de plantas podem superar muitas das limitações atribuídas à produção, distribuição e administração das vacinas tradicionais. Além disso, as vacinas produzidas a partir de plantas transgênicas apresentam processos de fabricação baratos, fácil armazenamento, e acrescentando ao facto de estarem livres da contaminação com agentes patogênicos provenientes de animais, também estão longe dos riscos associados à administração de injetáveis.

Atualmente existem provas e estudos que demonstram a eficácia da imunização oral em modelos animais e ainda recentes demonstrações afirmam a obtenção de altos rendimentos através de métodos de expressão de futuros antígenos candidatos a serem vacinas de uso humano. A engenharia genética pode ser usada como meio de produção de vacinas orais para a proteção contra uma grande variedade de doenças infecciosas.

Apesar de todos os factos acima mencionados e mesmo havendo tantos exemplos de plantas capazes de expressar e produzir vacinas, perguntas como o porquê de ainda não ter sido feita a transição para o mercado, ou o porquê das vacinas orais da planta do tabaco, apesar dos bons resultados de produção, ainda não se encontrarem no mercado ou ainda “Quais as possíveis razões para as empresas não terem optado por esta tecnologia e estes produtos?” permanecem sem resposta e deixam dúvidas sobre o futuro da exploração nesta área.

10. BIBLIOGRAFIA

1. AKTORIES K, FAKULTA M, COMPANS RW, COOPER MD, ROAD C, AG IG, ET AL. - **Current Topics in Microbiology and Immunology** Volume 346 Series Editors Current Topics in Microbiology and Immunology. 2010.
2. WARZECHA H. - **Biopharmaceuticals from plants: a multitude of options for posttranslational modifications.** *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2008;25(October 2014):315–30.
3. ROCHA DR DA, MARIN VA. - **Transgênicos - Plantas Produtoras de Fármacos (PPF).** *Cien Saude Colet.* 2011;16(7):3339–47.
4. METT V, FARRANCE CE, GREEN BJ, YUSIBOV V. - **Plants as biofactories. Biologicals** Elsevier Ltd; 2008;36(6):354–8.
5. BUYEL JF, TWYMAN RM, FISCHER R. - **Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins.;** 2015.
6. JAIN A, SAINI V, KOHLI DV. - **Edible Transgenic Plant Vaccines for Different Diseases..** 2013;14(6):594–614.
7. HEFFERON K. - **Plant-derived pharmaceuticals for the developing world.** *Biotechnol J.* 2013;8(10):1193–202.
8. LUGADE A A, KALATHIL S, HEALD JL, THANAVALA Y. - **Transgenic plant-based oral vaccines.** *Immunol Invest.* 2010;39(4-5):468–82.
9. DANIELL H, SINGH ND, MASON H, STREATFIELD SJ. - **Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals.** *Trends Plant Sci.* 2009;14(12):669–79.
10. HOWARD J A, HOOD E. - **Biotechnology and Biopharmaceutical.** *Advances.* 2005;85.
11. PELOSI A, SHEPHERD R, WALMSLEY AM. - **Delivery of plant-made vaccines and therapeutics.** *Biotechnol Adv [Internet].* Elsevier Inc.; 2012;30(2):440–8.
12. GOLDSTEIN D A., THOMAS J A. - **Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants.** *QJM - Mon J Assoc Physicians.* 2004;97(11):705–16.
13. FISCHER R, STOGER E, SCHILLBERG S, CHRISTOU P, TWYMAN RM. - **Plant-based production of biopharmaceuticals.** *Curr Opin Plant Biol.* 2004;7(2):152–8.
14. THANAVALA Y, LUGADE A A. - **Oral transgenic plant-based vaccine for hepatitis B.** *Immunol Res.* 2010;46(1-3):4–11.
15. HAN M, SU T, ZU YG, AN ZG. - **Research advances on transgenic plant vaccines.** *Acta Genet Sin.* 2006;33(4):285–93.
16. TACKET CO. - **Garden-variety vaccines: antigens derived from transgenic plants.** *Expert Rev Vaccines.* 2004;3(5):529–31.

17. DANIELL H, STREATFIELD SJ, WYCOFF K. - **Medical molecular farming: Production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants.** Trends Plant Sci. 2001;6(5):219.
18. TWYMAN RM, SCHILLBERG S, FISCHER R, - **transgenic plants in the biopharmaceutical market** Publications A. 2005;1–34.
19. ROSALES-MENDOZA S, SALAZAR-GONZÁLEZ J A. - **Immunological aspects of using plant cells as delivery vehicles for oral vaccines.** Expert Rev Vaccines [Internet]. 2014;13(6):737–49.
20. ABOUL-ATA AAE, VITTI A, NUZZACI M, EL-ATTAR AK, PIAZZOLLA G, TORTORELLA C, ET AL. - **Plant-based vaccines: Novel and low-cost possible route for mediterranean innovative vaccination strategies** [Internet]. 1st ed. Advances in Virus Research. Elsevier Inc.; 2014. 1-37 p.
21. JUNG C, HUGOT J-P, BARREAU F. - **Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine.** Int J Inflam. 2010;2010:823710.
22. KWON KC, VERMA D, SINGH ND, HERZOG R, DANIELL H. - **Oral delivery of human biopharmaceuticals, autoantigens and vaccine antigens bioencapsulated in plant cells.** Adv Drug Deliv Rev [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;65(6):782–99.
23. SALA F, RIGANO MM, BARBANTE A, BASSO B, WALMSLEY AM, CASTIGLIONE S. - **Vaccine antigen production in transgenic plants: Strategies, gene constructs and perspectives.** Vaccine. 2003;21(7-8):803–8.
24. YANO A, TAKEKOSHI M. - **Transgenic plant-derived pharmaceuticals – the practical approach** 2004;1565–8.
25. KIRK DD, MCINTOSH K, WALMSLEY AM, PETERSON RKD. - **Risk analysis for plant-made vaccines.** Transgenic Res. 2005;14(4):449–62.