

## **TEXTE 15/01**

# **„Gene-Farming“: Stand der Wissenschaft, mögliche Risiken und Management-Strategien**

**Gutachten zu „Spezifische Risiken des Gene-Farming in Pflanzen“**

**von**

**Dr. André de Kathen**

## **Zusammenfassung**

### **1. Einführung und Aufgabenstellung**

Seit der Produktion der ersten transgenen Pflanzen Mitte der 80er Jahre ist der Markt für transgene Nutzpflanzen, vor allem in den letzten fünf Jahren, beachtlich gewachsen. Der Marktwert transgener Nutzpflanzen, die in den Jahren 1999 und 2000 weltweit auf etwa 40 Millionen Hektar angebaut werden, erreicht mittlerweile ein Volumen von weit über zwei Milliarden ECU. Andererseits lassen sich diese Zahlen zu jeweils mehr als 95% auf 3 Länder (Argentinien, USA, Kanda), 3 Nutzpflanzen (Baumwolle, Mais, Sojabohne) und 2 Eigenschaften (Herbizid- und Insektenresistenz) zurückführen.

Damit ist natürlich das Potential der Gentechnik nicht erschöpft. Bei den Pflanzen der „ersten Generation“ steht die Verbesserung der agronomischen Eigenschaften im Vordergrund, sogenannter „input traits“. Angestrebt wird die Verbesserung von Ertrag und Ertragsstabilität durch Einbau von Resistenzen gegen biotische (z.B. Bakterien, Pilze, Viren, Insekten und Nematoden) und abiotische (z.B. Salz, Trockenheit) Stressoren. Darüber hinaus existieren bereits Protokolle zur gentechnischen Veränderung für mehr als 60 Pflanzenarten, darunter alle wichtigen Getreide, Leguminosen und auch Wurzel- und Knollenfrüchte, Gemüse und sogar Baumarten. Eine ganze Reihe dieser Pflanzen und Eigenschaften sind in den etwa 6.000 experimentellen Freisetzungen bereits getestet worden.

Weitgehend unbeachtet blieb dabei das Potential transgener Pflanzen als Produktionsstätten für (industrielle) Rohstoffe (Polymere, Öle und Fette, Kohlenhydrate), Enzyme und schließlich auch medizinisch-pharmazeutische Produkte. Bei diesen transgenen Pflanzen der „zweiten und dritten Generation“ steht die Entwicklung und Verbesserung sogenannter „output traits“ im Mittelpunkt. Obwohl bereits seit 1991 Bio-Pharmazeutika und Bio-Diagnostika produzierende, transgene Pflanzen im Freiland angebaut werden, meist als „genefarming“ bezeichnet, liegen nur wenige Informationen zu den eingebrachten Genen vor. Dies ist im wesentlichen darauf zurückzuführen, dass bisher noch keine lizenzierten oder kommerzialisierten Bio-Pharmazeutika aus Pflanzen auf dem Markt sind. Es fehlen auch experimentelle Daten zu möglichen spezifischen Umweltrisiken, da die bisherigen Freisetzungen, soweit bekannt, unter kontrollierten (containment) Bedingungen stattgefunden haben. Vor diesem Hintergrund war es die Aufgabe des vorliegenden Gutachtens:

1. den Stand der Wissenschaft zu dokumentieren,
2. die daraus resultierenden spezifischen Risiken zu identifizieren und zu bewerten,
3. mögliche Maßnahmen zur Minimierung dieser Risiken abzuleiten,
4. mögliche Lücken in der Sicherheitsforschung zu identifizieren.

Da die meisten Datenbanken (APHIS, OECD) nur unzureichende Informationen zur Freisetzung Bio-Pharmazeutika produzierender, transgener Pflanzen bereitstellen konnten und auch die angesprochenen Firmen natürlich eine sehr zurückhaltende Informationspolitik verfolgen, basiert ein großer Teil des Gutachtens zum *Stand der aktuellen wissenschaftlichen Entwicklung (Pflanzenarten/Entwicklungsstand/Arbeitsgruppen/Wirkung)* auf einer umfangreichen Literaturrecherche in 5 verschiedenen Datenbanken und Interviews mit etwa 20 führenden Wissenschaftlern weltweit.

Die Frage nach *spezifischen Risiken, die aus einer zukünftigen, auch großflächigen, Freisetzung dieser Pflanzen für Mensch, Tier, Pflanze und Umwelt zu identifizieren sind*, ist bislang weder experimentell noch theoretisch hinreichend addressiert worden. Hier lassen sich aber konzeptionell drei Risikogruppen unterscheiden:

1. Risiken durch das Produkt,
2. Risiken für das Produkt, bedingt durch Wechselwirkungen mit der Umwelt und durch das Produktionssystem,
3. Risiken für die Umwelt, bedingt durch Produktion/Anbau, Prozessierung, Anwendung oder Beseitigung.

Während die erste Gruppe eher durch die entsprechenden Zulassungsbehörden zu regeln ist (z.B. EMEA), steht vor allem die Analyse und Bewertung der Gruppen zwei und drei im Zentrum des Gutachtens. Da bislang keine experimentellen Daten existieren, sollten die folgenden Fragen den Zugang zu einer umfassenden Risikobetrachtung erleichtern:

- Ist eine Analyse spezifischer direkter Folgen bei Freisetzung möglich?
- Lassen sich sicherheitsrelevante Einflüsse *durch* die belebte/unbelebte Umwelt beschreiben und analysieren?
- Sind daraus resultierende spezifische Risiken *für* Mensch, Tier und Umwelt ableitbar?
- Lassen sich mögliche Szenarien außerhalb der direkten Ursache/Wirkung-Beziehung zumindest beschreiben oder gar bewerten?
- Lassen sich Risikogruppen identifizieren und kategorisieren (z.B. nach Wirkung/Funktion oder Struktur)?

Ausgehend von den identifizierten oder entwickelten Szenarien galt es auch festzustellen, *welche Maßnahmen zu entwickeln und abzuleiten sind, um eine sichere Handhabung zu gewährleisten*. Zwar lässt sich dies nur von Fall zu Fall definieren, andererseits existieren bereits eine ganze Reihe möglicher Management-Strategien, deren Bedeutung im Zusammenhang mit „gene-farming“ diskutiert wurde:

- *physikalisches* Containment, d.h. die physische Begrenzung von Freisetzung/Anbau, Produktion, Transport, Prozessierung und Entsorgung,
- *biologisches* Containment, d.h. die Minimierung der möglichen unbeabsichtigten Ausbreitung und Exposition der transgenen Pflanzen,
- *prozeß-vermitteltes* Containment, d.h. Produktionsstrategien, die eine Exposition des transgenen Produktes minimieren,
- Management, d.h. Maßnahmen und Methoden zur Überwachung und Identifizierung.

Schließlich sollte das vorliegende Gutachten die Frage beantworten, *welche Forschungslücken, in bezug auf die Sicherheitsforschung, identifiziert werden können und welche Vorschläge für eine weitere Forschung gemacht werden können?*

## 2. Stand der Wissenschaft

Eine Recherche in den Datenbanken von USDA-APHIS (USA) und der OECD über Freisetzungen Bio-Pharmazeutika produzierender, transgener Pflanzen konnte nur einen ersten, sehr groben Eindruck zum Stand der Wissenschaft vermitteln. Aus den Datenbanken lassen sich -zumindest für den Zeitraum bis 1998- folgende Schlüsse ziehen:

- rekombinante Antikörper sind ein sehr wichtiges erstes Produkt aus Pflanzen (von 1993-1998 sind in den USA 43 Anträge gestellt worden, einer wurde abgelehnt, bis auf sechs Anträge wurden alle von der Firma Agracetus gestellt; Holzmann 1994),
- es wurden überwiegend Nutzpflanzen eingesetzt, die auch in der Nahrungs- und Futtermittelproduktion verwandt werden,
- die meisten Freisetzungen fanden in den USA statt,
- nur etwa 10% der Freisetzungen wurden von öffentlichen Forschungsinstitutionen durchgeführt,
- für 75% der Freisetzungen sind die sicherheitsrelevanten (= interessanten) Informationen als vertraulich gekennzeichnet,
- der Begriff „pharmaceuticals“ wird sehr weit und fehlerhaft verwendet.

Für Europa lassen sich im gleichen Zeitraum (bis 1998) nur wenige Freisetzungen ermitteln, die hauptsächlich in Frankreich und Spanien von BiocemSA bzw. Meristem Therapeutics (Limagrain Group) durchgeführt wurden.

Aufschlußreicher war die Analyse der wissenschaftlichen Literatur der Jahre 1994 bis 2000, die sich mit der Produktion bio-pharmazeutischer Produkte in Pflanzen beschäftigen. Die Auswahl der in der Tabelle 1 dargestellten Arbeiten zeigt die Diversität im Hinblick auf die verwendeten Pflanzen (Kartoffel, Spinat, Gurke, Kuherbse, Mais, Tabak, Luzerne, Reis, Gerste, Weizen, Raps, Zuckerrübe, Tomate und Sojabohne) und Produktionssysteme. Die stabile Transformation mittels *Agrobacterium* oder Partikelbeschuß sowie die Methode der Infektion von nicht-transgenen Pflanzen mittels phytopathogener, chimärer Viren (CPMV, TMV, TBSV, AIMV) wurden für die stabile oder transiente Expression Bio-Pharmazeutika kodierender Gene genutzt.

Produziert wurden eine ganze Reihe von Vakzinen gegen mindestens 15 verschiedene tier- oder humanpathogene Viren sowie eine Auswahl von Antikörpern (monoklonale, anti-ideotypische bzw. scFv) zu diagnostischen und immuntherapeutischen Zwecken oder gar als Kontrazeptivum.

Darüber hinaus wurden in Pflanzen auch therapeutisch einsetzbare Enzyme (z.B. Glucocerebrosidase, eines der teuersten Medikamente überhaupt, zur Behandlung der Gaucher Krankheit), Blut- und Milchbestandteile (Lactoferrin, Serumalbumin, Casein) und eine Reihe von Peptidhormonen produziert (z.B. Interleukine, Interferone, Wachstumshormone, Opiate).

Während zu Beginn der Entwicklung noch vergleichsweise niedrige Konzentrationen heterologer Proteine und Peptide erzielt wurden (0,01-0,1% des Gesamtproteinangebotes), werden nun Konzentrationen bis zu 10% erreicht. Damit ist die Gewinnung von Kilogramm-Mengen eines Antikörpers pro Hektar ein realistisches Szenario geworden. Dies ist von besonderer Bedeutung, da ökonomische und marktpolitische Faktoren eine immer größere Rolle für die Beantwortung der Frage spielen, welche Produkte in den nächsten Jahren zu erwarten sind.

Tabelle 1: Arbeiten zur Produktion bio-pharmazeutischer Produkte in transgenen Pflanzen

Jahr/Autor	Krankheit/Erreger	eingef. Sequenz	transform. Pflanze/(Vektor)	Kategorie
Modelska et al. 1994	Tollwut/Rabies Virus	24 kDa-Glykoprotein	Tabak, Spinat (TMV, AIMV)	Vakzin, V
Dalsgaard et al. 1997	Enteritis, Nerz/MEV	VP2 Kapsid-Protein	Kuherbse (CPMV, CVP)	Vakzin, V
Carillo et al. 1998	MKS/FMDV	VP1 Kapsid-Protein	<i>A. thaliana</i> ( <i>Agrobacterium</i> )	Vakzin, V
Tuboly et al. 2000	Diarrhöe, Schwein/TGEV	spike Protein	Luzeerne, Tabak ( <i>Agrobacterium</i> )	Vakzin, V
Castanon et al. 1999	Hämorr.Fieber/HDV	VP60 Kapsid-Prot.	Kartoffel ( <i>Agrobacterium</i> )	Vakzin, V
Eudes et al. 1999*	Diarrhöe, Rind/BVDV	E2 Glykoprotein	Gerste (Plasmid, PB)	Vakzin, V
Rymerson et al. 1999*	PRR-Syndrom/PRRSV	ORF5	Tabak ( <i>Agrobacterium</i> )	Vakzin, V
Allina et al. 1999*	or. Papillomatose/COPV	COPV L1	Tabak ( <i>Agrobacterium</i> )	Vakzin, V
Turpen et al. 1995	Malaria/Plasm. malariae	P.m. Epitop	Tabak (TMV)	Vakzin, H
Brennan et al. 1999a	Lungenentzündung/ <i>P.aer.</i>	Peptid 10, 18	Kuherbse (CPMV, CVP)	Vakzin, H
Brennan et al. 1999b	opportun. Inf./ <i>S.aureus</i>	FnBP D2 Domäne	Kuherbse (CPMV, CVP)	Vakzin, H
Arakawa et al. 1999b	Cholera/ <i>Vibrio cholerae</i>	CT-B Toxin	Kartoffel ( <i>Agrobacterium</i> )	Vakzin, H
Mason et al. 1998	Diarrhöe/ <i>E.coli</i> ETEC	Lt-B Toxin	Kartoffel ( <i>Agrobacterium</i> )	Vakzin, H
Tacket et al. 2000	Diarrhöe/Norwalk-Virus	NV Kapsid-Protein	Kartoffel ( <i>Agrobacterium</i> )	Vakzin, H
Walmsley et al. 2000	Hepatitis B/HB Virus	OF-Antigen	Kartoffel, Tabak ( <i>Agrobacterium</i> )	Vakzin, H
McCormick et al. 1999	B-Zell Lymphom	anti-ideotyp. Antikörp.	Tabak (TMV)	Vakzin, H
Tackaberry et al. 1999	Zytomegalie/hCMV	Glykoprotein B	Tabak ( <i>Agrobacterium</i> )	Vakzin, H
Yusibov et al. 1997	AIDS/HIV	VP3, p24	Tabak, Gurke (TMV, Agro., TBSV)	Vakzin, H
Koo et al. 1999	Encephalomyelitis/MHV	S-Protein Epitop	Tabak (TMV)	Vakzin, H
Ma&Jevnikar 1999	Transplantabstößung	MHC-II	Tabak ( <i>Agrobacterium</i> )	AIR-Vakzin, H
Langridge et al. 1999*	Diabetes/GAD	GAD, Insulin CT-B	Kartoffel ( <i>Agrobacterium</i> )	AIR-Vakzin, H
Zeitlin et al. 1998	Herpes genitalis/HSV-2	MAK	Sojabohne (Plasmid, PB)	plimmun, H
Stoger et al. 2000	Krebs/CEA	humanes scFv	Reis, Weizen (Plasmid, PB)	Diagnostik, H
Briggs et al. 1999*	Herpes simplex/HS1/2	MAK	Mais (Plasmid, PB)	plimmun, H
Ma et al. 1998	Karies/ <i>S.mutans</i>	MAK	Tabak ( <i>Agrobacterium</i> )	plimmun, H
Vaquero et al. 1999	Krebs/CEA	MAK	Tabak (TMV)	Diagnostik, H
Briggs et al. 1999*	-.-/humane Spermien	MAK	Mais (stabil PB)	Kontrazeptiv.
Menassa et al. 1999*	IBD/-.-	Interleukin IL-10	Tabak	Peptidhormon
Staub et al. 2000	Wachstumsstörung/-.-	hSomatotropin	Tabak	Peptidhormon
Chong et al. 1999	Eisenbindung/-.-	hLactoferrin	Kartoffel, Tomate, Reis	VAP-Milch
Arakawa et al. 1999	-.-/-.-	h $\beta$ -Casein	Kartoffel, Tomate	VAP-Milch
Takase et al. 1998	-.-/Regulation, Lactose	h $\alpha$ -Lactalbumin	Tabak	VAP-Milch
Dieryck et al. 1997	Blutersatz/Notfall	h Hämoglobin	Tabak, Mais	VAP-Blut
Sijmons et al. 1990	Blutersatz/Notfall	h Serumalbumin	Kartoffel, Tabak	VAP-Blut
Matsumura et al 1999*	-./-.-	h Interferon $\alpha$ 2b/ $\alpha$ 8	Kartoffel	Peptidhormon
Panahi et al. 1999*	-./-.-	IGF-1	n.b.	Peptidhormon
Sehnke et al. 1999	-./-.-	Pre-Pro-Ricin	Tabak	Zellgift
Erickson et al. 1999*	-./-.-	Schwein pEGF	Tabak	Peptidhormon
Cramer et al. 1996	Gaucher Krankheit/GCB	hGlukocerebrosidase	Tabak	Enzym
Cramer et al. 1996	-./-.-	hProtein C, Blut	Tabak	Koagulation
Hogge et al. 1999*	-./-.-	Hirudin, Blut	Raps	Koagulation

AIR: Autoimmunreaktion; VAP: Value added protein; plimmun: passive Immunisierung; H: Humanmedizin; V: Veterinärmedizin; h: humanes; MAK: monoklonaler Antikörper; Virusbezeichnungen: siehe Abkürzungsverzeichnis; \*: Beitrag während der „International Molecular Farming Conference“, London, Kanada, 29. August - 1. September 1999

### **3. Mögliche spezifische Risiken**

Zunächst erscheint der unkontrollierte Anbau von (transgenen) Bio-Pharmazeutika produzierenden Pflanzen -falls er überhaupt erfolgt- durchaus mit spezifischen Risiken verbunden zu sein. Erstens existieren nur wenige oder gar keine Daten zur Umweltwirkung des (großflächigen) Anbaus von Medizinalpflanzen, zweitens werden bisher überwiegend „klassische“ Nutzpflanzen verwendet, die als „Medizinalpflanzen“ unbekannt sind, drittens beschränkt sich die Analyse möglicher Wirkungen und Nebenwirkungen bio-pharmazeutischer Produkte auf definierte Applikationsformen und eine entsprechend indizierte Personengruppe (oder Tiergruppe) und viertens kommt mit der beabsichtigten therapeutisch-medizinischen Wirkung des Produktes ein Faktor hinzu, der bei einer Risikobewertung wohl zu berücksichtigen wäre. Darüber hinaus ist eine Vielzahl von Pflanzenarten, viralen Expressionssystemen und Produkten zu analysieren und zu bewerten. Obwohl eine Reihe von Freisetzungen, hauptsächlich in den USA, transgener Pflanzen und rekombinanter Viren dokumentiert sind, ist die Anzahl der „Environmental Assessments“ verschwindend gering und der Zugang recht schwierig.

Konzeptionell lassen sich Risiken durch das Produkt, Risiken für das Produkt und Risiken für die Umwelt differenzieren. Die Analyse möglicher *Risiken durch das Produkt* kann dabei auf die Informationen und experimentellen Daten zurückgreifen, die bei der Entwicklung des Produktes erhoben wurden. In aller Regel sind die bio-pharmazeutischen Produkte ja nicht neu. Neu ist im wesentlichen das Produktionssystem. Dies ist ein kritischer Punkt, da bei einem Anbau weder die Art der Applikation kontrollierbar ist, noch die „Konsumenten“ beschränkt werden können (die Anwendung erfolgt quasi ohne ärztliche Kontrolle und ohne Rezept).

*Risiken für das Produkt* entstehen zum einen durch Wechselwirkungen der produzierenden Pflanze mit der belebten und unbelebten Umwelt. Hier ist zu fragen, ob biotische und/oder abiotische Faktoren oder das Anbauverfahren auf die Expressionssstabilität Einfluß nehmen oder ob Modifikationen denkbar sind. Von Bedeutung ist dies, falls die Pflanze als solche zu einem Medizinprodukt oder Medikament wird (dies wäre von der Zulassungsbehörde für Medikamente zu bewerten) oder wenn die Umweltfaktoren während des Anbaus zu signifikanten Veränderungen des Produktes führen, dann wäre eine Folgenabschätzung nicht nur für das Produkt, sondern auch für mögliche Varianten erforderlich (dies wäre von der Genehmigungsbehörde für Freisetzungen zu bewerten). Ein weiteres Risiko für das Produkt ist die Auswahl des Produktionssystems. Pflanzen verwenden andere Glykosylierungsmuster für Proteine und differieren auch in der Nutzung bestimmter Basentriplets, die für die Aminosäureabfolge (die Primärstruktur des Proteins) entscheidend sein kann. Hier kann es zum Kettenabbruch kommen, zum Einbau zusätzlicher Protease-Schnittstellen oder zu Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur (z.B. Disulfidbrücken).

*Risiken für die Umwelt* setzen voraus, dass für die Pflanzen eine Exposition wahrscheinlich ist. Angesichts der dokumentierten Wirkungen pharmazeutischer Produkte kommt daher neben der Bewertung von „Wirkungsrisiken“ auch der Bewertung von „Expositionsrisiken“ (bzw. Mechanismen, die diese minimieren sollen) eine besondere Bedeutung zu. Aus diesem Grund ließ sich auch die oben beschriebene Konzeption in der Risikoanalyse und Risikobewertung nicht durchhalten. Im Vorgriff auf eine mögliche Klassifizierung der bio-pharmazeutischen Produkte nach Funktion und Struktur wurden daher folgende Risikoszenarien eingehender betrachtet:

- veränderte Proteinstruktur,
- modifizierte und kryptische Funktionen,
- indirekte Wirkungen,
- Re- und Neukombination von Nukleinsäuren.

*Veränderungen der Proteinstruktur und Proteinfunktion* resultieren aus Transkriptions- und Translationsfehlern bei Expression in heterologen Systemen, aus Fehlern bei der Proteinfaltung und aus abweichenden Glykosylierungsmustern. Für alle Faktoren sind Beispiele genannt. Sie lassen sich in die ersten beiden Gruppen des oben genannten Konzeptes einordnen (Risiko durch und für das Produkt). Ob und wie diese Faktoren für eine Bewertung möglicher Umweltrisiken von Relevanz sind, läßt sich bisher nicht belegen, zumal davon auszugehen ist, dass nur solche Fälle für eine Freisetzung/einen Anbau in Frage kommen, für welche eine spätere Anwendung gesichert ist. Fraglich ist, ob dieses Kriterium ausreicht. Mit anderen Worten, ist eine unter dem Gesichtspunkt einer Anwendung erlaubte „Fehlertoleranz“ hinreichend, um auch mögliche Umweltwirkungen auszuschließen?

Im Hinblick auf mögliche Umweltwirkungen ist die Suche nach *kryptischen, modifizierten oder unerwarteten Funktionen* wesentlich interessanter. Auch hier belegen einige Beispiele, dass die eingebrachten Gene durchaus auch Funktionen im heterologen System übernehmen oder realisieren können, die bisher nicht oder nur unzureichend betrachtet worden sind. So ist zunächst nicht davon auszugehen, dass die Expression von Neuropeptiden oder die bestimmter Enzyme des menschlichen Pathogen-Abwehrsystems eine Wirkung in der Pflanze selbst vermitteln. Dafür gibt es allerdings auch Gegenbeispiele, wie die Interferon-vermittelte Virusresistenz, die Lactoferrin-vermittelte Toleranz gegen mikrobielle Infektionen sowie der Pathogen-induzierte Zelltod durch Expression des menschlichen 2'-5'-Adenylat-Systems. Mit anderen Worten, die Analyse und Bewertung möglicher Umweltrisiken beschränkt sich nicht allein auf die Identifizierung von Risiken für Nichtzielorganismen, sondern muß ggf. auch nach „Fitness“-relevanten Eigenschaften suchen, die durch die Produktion von Bio-Pharmazeutika möglicherweise vermittelt werden.

Mit *indirekten Wirkungen* sind solche gemeint, die aus der Produktion und Anwendung dieser transgenen Pflanzen resultieren, ohne sich direkt auf das Produkt zu beziehen. Auch dies ist in erster Linie für eine Bewertung möglicher Umweltrisiken nicht relevant. Für eine Gesamtbewertung des Risikos für die im Gentechnikgesetz beschriebenen Rechtsgüter allerdings schon, einschließlich der Vorteile, die aus einer kostengünstigen und raschen Produktion von Bio-Pharmazeutika für die tierische und menschliche Gesundheit erwachsen können. Hier sind auch die Risiken für die Gesundheit der Menschen zu bewerten, die z.B. an der „konventionellen“ Produktion von Vakzinen arbeiten, also menschliche Zellkulturen nutzen. Hinzu kommen Risiken, die aus veränderten Eßgewohnheiten, medizinischen Behandlungen oder veränderter landwirtschaftlicher Praxis resultieren.

Eine Verbindung mit der Diskussion -mittlerweile schon als „klassisch“ zu bezeichnende Risiken- über Viren, ergibt sich aus der Verwendung phytopathogener Viren sowie aus der Produktion von Vakzinen in transgenen Pflanzen. Hier stellt sich die Frage, ob die Expression subgenomischer Sequenzen human- oder tierpathogener Viren in Pflanzen oder phytopathogenen, chimären Viren -durch Re- und/oder Neukombination- zu neuen und möglicherweise virulenteren Viren führt. Nach dem Stand der Wissenschaft ist die Rekombination eines latenten Pararetrovirus, z.B. mit einem Vakzin-Gen, denkbar. Allerdings würde dies nur dann zur Rekonstitution des latenten Virus führen, wenn das Vakzin-Gen eine fehlende

Funktion vermittelt. Umgekehrt müßte ein latentes Pararetrovirus dem Vakzin-Gen oder dem Transkript genau die Funktionen zur Verfügung stellen, die das Vakzin-Gen selbst zur Rekonstitution eines tier- oder humanpathogenen Virus braucht. Offen ist dann die Frage einer systemischen Ausbreitung in der Pflanze sowie die eines Infektionsweges zu Mensch und/oder Tier. Es ist davon auszugehen, dass die hohe Mutationsrate der Viren, ihre kurzen Replikationszyklen und die Rekombination zwischen ihnen zur schnellen Adaption und Variabilität beiträgt. Offensichtlich läßt der Selektionsdruck unter gegebenen Umständen nur bestimmte Formen/Sequenzen/Strukturen zu. Im Hinblick auf die mögliche Entwicklung neuer Viren oder auf die „Revitalisierung“ latenter Viren existiert bisher kein sinnvolles Szenario oder eine logische Kette von Ereignissen, welche die Existenz eines Risikos belegen oder rechtfertigen könnte.

Da offensichtlich nur wenige oder gar keine Arbeiten zur Analyse und Bewertung der Risiken des Anbaus transgener, Bio-Pharmazeutika produzierender Pflanzen existieren, wurde überprüft, ob aus den Untersuchungen zum Eintrag nicht-biotischer Pharmazeutika Schlußfolgerungen gezogen oder Anleitungen gewonnen werden können. Offensichtlich existieren jedoch keine Arbeiten, die sich mit den Umweltwirkungen des großflächigen Anbaus von Medizinalpflanzen beschäftigen. Interessant sind jedoch eine Reihe von Studien zur Wirkung und zur Persistenz pharmazeutischer Produkte, die durch Krankenhaus- oder Schlachthausabwässer sowie durch die Ausbringung von Gülle und Mist in die Umwelt gelangen, vor allem in aquatische Systeme. Zwar ließen sich daraus Hinweise für eine Analyse und Bewertung biotischer Pharmazeutika gewinnen, andererseits handelt es sich um völlig andere Stoffklassen, nämlich Proteine und Peptide. Weder zur Eintragsmenge (z.B. aus Pflanzen in den Boden), noch zur Persistenz (im Boden und aquatischen Systemen) gibt es verlässliche Zahlen oder Schätzungen. Diese liegen allerdings auch nur eingeschränkt für die „konventionell“ erzeugten Produkte vor - hier sind allerdings mit der Produktion in tierischen und menschlichen Zellkulturen auch ganz andere Risikoszenarien denkbar.

Abschließend bemühte sich das Gutachten um eine Strukturierung der identifizierten möglichen Risiken - unter der Voraussetzung, dass transgene, Bio-Pharmazeutika produzierende Pflanzen überhaupt großflächig und weitgehend unkontrolliert angebaut werden. Ein, nach Ansicht aller befragten Experten, eher unwahrscheinliches Szenario. Eine Klassifizierung bio-pharmazeutischer Produkte ist danach durchaus möglich und stellt eine vorauselnde Rückkopplung von Bewertung und Analyse dar, wie sie für nahezu alle Folgenabschätzungen faktisch angewandt werden. In Übereinstimmung mit der Bewertung des Effektes nicht-biotischer Pharmazeutika (dazu gehören Steroide, Aminoglykoside oder Minerallien) läßt sich auch für Bio-Pharmazeutika produzierende Pflanzen ein Fragenkatalog zu Exposition und Wirkung erstellen. Dieser wäre sicherlich für eine Strukturierung und Harmonisierung der Risikoanalyse und Risikobewertung recht hilfreich.

#### **4. Risiko-Management**

Wegen der immanenten Wirkung pharmazeutischer Produkte verschiebt sich vermutlich der Schwerpunkt einer Folgenabschätzung von einer Bewertung des Produktes (Wirkungsanalyse) mehr zur Analyse der Stabilität und Wirksamkeit von Strategien zur Minimierung oder Vermeidung der Exposition (Expositionsanalyse). Folgerichtig beschränkt sich die Dokumentation von Strategien zum Risikomanagement im wesentlichen auf Maßnahmen zur Minimierung der Exposition. Dies kann durch organisatorische Maßnahmen bei der Freiset-

zung realisiert werden oder durch eine Reihe von "Containment"-Techniken. Denkbar sind ein *physikalisches* Containment, ein *biologisches* Containment, ein *prozeß-vermitteltes* Containment sowie Methoden, die eine Identifizierung und eine Überwachung/ein *Monitoring* erlauben. Die Tabelle 2 faßt einige der möglichen Management-Strategien zusammen.

Tabelle 2: Kategorisierung und Beschreibung von möglichen Maßnahmen zu Minimierung der Umwelt-Exposition bio-pharmazeutischer Produkte transgener Pflanzen

Kategorie	Methodik
<b>Organisation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➢ Restriktion auf bestimmte Flächen oder bestimmte Zeiten,</li> <li>➢ Auswahl geeigneter Pflanzen und Produktionssysteme,</li> <li>➢ landwirtschaftliche Verfahren,</li> <li>➢ größere Minimaldistanzen zu anderen Pflanzen,</li> <li>➢ kontrollierte Zugänge.</li> </ul>
<b>Biologisch</b>	<p>Minimierung der Ausbreitung:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➢ Terminator-Technologie,</li> <li>➢ Parthenokarpie,</li> <li>➢ männliche Sterilität,</li> <li>➢ Expression in bestimmten Organen, Organellen, zu bestimmten Zeiten.</li> </ul> <p>bei Viren:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➢ Verwendung von Defektkonstrukten,</li> <li>➢ gezielte Einschränkung des Wirtsspektrums.</li> </ul>
<b>Prozeß-vermittelt</b>	Induzierbare Promotoren, die eine Expression unter Freilandbedingungen ausschließen.
<b>Nachweis und Monitoring</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➢ Information über Produktion und Prozessierung,</li> <li>➢ Verwendung von dominanten Markergenen,</li> <li>➢ Entwicklung von hochauflösenden Nachweisverfahren,</li> <li>➢ Entwicklung eines hocheffizienten Informationsmanagements.</li> </ul>

Natürlich unterscheiden sich die einzelnen Verfahren und Methoden durch die vermittelte Sicherheit, ihre Durchführbarkeit, ihren Erfahrungshorizont und den mit ihrer Anwendung bzw. Entwicklung verbundenen Kosten. Selbstverständlich sind Kombinationen möglich und muß im Einzelfall entschieden werden, welches Verfahren -oder welche Kombination- dem erwarteten oder identifizierten Risiko (unter Berücksichtigung des möglichen Nutzens für Umwelt und Gesundheit) entspricht.

## 5. Schlußfolgerung und Forschungsbedarf

Auf den ersten Blick scheint eine besondere Analyse und Bewertung möglicher Risiken bei der Produktion von Bio-Pharmazeutika in transgenen Pflanzen durchaus gerechtfertigt. Folgende Gründe sprechen dafür:

- rekombinante pharmazeutische Produkte in Pflanzen sind ein junges Forschungsfeld, die Erfahrung ist gering,
- pharmazeutische Produkte beabsichtigen eine Wirkung auf Mensch,
- einige Produktionssysteme nutzen Nahrungs- oder andere Nutzpflanzen,
- für die Bewertung möglicher Wirkungen und Nebenwirkungen dient der kranke Patient als Referenz; dies gilt nicht für die Bewertung von Risiken die aus dem Anbau resultieren können,
- Bio-Pharmazeutika produzierende Pflanzen sind „vermehrungsfähig“.

Auf den zweiten Blick wird deutlich, dass die Produktion pharmazeutisch wirksamer Substanzen in Pflanzen insgesamt in der Regel nicht von einer Folgenabschätzung oder Umweltverträglichkeitsprüfung begleitet wird. So hat die Produktion von Medikamenten, Düften,

Farben und Geschmacksstoffen in Pflanzen und die Modifikation entsprechender Sekundärstoffwechselwege durch Züchtung und Mutation eine lange Geschichte, Umweltfolgenabschätzungen sind jedoch rar. Löst man eine Risikobetrachtung von den politischen und regulatorischen Vorgaben, so ist schwerlich zu vermitteln, warum eine in ihrem Alkaloidgehalt modifizierte Tabakpflanze (durch Züchtung und Selektion, d.h. weitgehend unkontrolliert) ohne Umweltfolgenanalyse freigesetzt werden kann, während die transgene, Kollagen produzierende Pflanze einer besonderen Betrachtung bedarf. Mit anderen Worten, es gibt nur sehr wenige Referenzen oder Angelpunkte, die für eine Bewertung eines identifizierten Risikofaktors herangezogen werden können.

Im Hinblick auf mögliche Forschungsprojekte und -programme sollte deshalb nicht allein auf transgene Pflanze abgehoben werden. Da es ebenso an Referenzen mangelt, die eine Bewertung erleichtern oder gar erst ermöglichen, können eine ganze Reihe von Fragen auch in „nicht-transgenen“ Szenarien beantwortet werden - so z.B. lassen sich Vakzine, Peptidhormone und Antikörper in Krankenhaus- und Schlachtereiabwässern nachweisen und ist eine Umweltwirkung festzustellen? Oder, welche Bedeutung hat z.B. die phylogenetische Verwandschaft von Tospoviren mit Hantaviren oder die Verwandschaft des Blumenkohlmosaikvirus mit dem Hepatitis B Virus? Ein entscheidendes Förderkriterium muß sein, ob die entsprechenden Projekte informative Daten liefern, dass heißt Daten, die für eine Risikoanalyse und eine Risikobewertung auch relevant sind.

Mögliche spezifische Risiken resultieren auch nicht allein aus dem Anbau transgener, Bio-Pharmazeutika produzierender Pflanzen. Mit der (Wieder-)entdeckung präventiver medizinischer Maßnahmen, dem zunehmenden Wissen über die Langzeitwirkungen bestimmter Bestandteile unserer Nahrung (epidemiologische Analysen verknüpft mit der weiteren Aufklärung physiologischer Wirkketten) und dem Bedürfnis nach aufgewerteten Nahrungsmitteln (Stichworte: „Nutraceuticals“ und „Functional Food“) wird auch der Bereich der Manipulation des Sekundärstoffwechsels in Zukunft von großem Interesse sein. Zu vermuten ist eine Verlagerung der Produktion von Additiven (z.B. Vitaminpräparate) in pflanzlichen Zell- und Organkulturen hin zu einer Modifikation der Pflanze selbst („Golden Rice“ ist nur ein Anfang). Der Autor empfiehlt daher die Organisation eines Fachgesprächs mit Vertretern verschiedener Disziplinen (Pharmakologie, Toxikologie, Veterinär- und Humanmedizin, Ökologie, Molekularbiologie, Biochemie) unter Einbeziehung von Vertretern aus Wissenschaft, Industrie und Nicht-Regierungsorganisationen, die sich mit den formulierten Fragestellungen, aber eben auch mit den dargestellten Randgebieten, (insbesondere „nutraceuticals“ und „functional food“) eingehend auseinandersetzen. Das vorliegende Gutachten könnte dazu eine Grundlage liefern.

# Summary

## 1. *Introduction and Objective*

Since the mid 80ies, when the first transgenic plant was produced, the market for transgenic crops has grown remarkably, especially in the last five years. The market volume for transgenic crops, grown on almost 40 million ha, exceeded 2 billion US\$ in the year 1999 and 2000. On the other hand, with respect to these numbers, USA, Argentina and Canada account for more than 95% of the area, cotton, maize and soybean account for more than 95% of the crops and insect- and virus-resistance account for more than 95% of the traits.

However, this does not reflect the potential of plant genetic engineering. The transgenic crops of the so-called "first generation" have improved agronomic traits, or "input traits". Higher yield and better yield-stability was envisaged by introducing resistances against biotic (e.g. bacteria, fungi, viruses, insects and nematodes) and abiotic (e.g. salt, drought) stressors. Now, transformation protocols have been developed for more than 60 plant species, among them all important cereals, legumes and also root and tuber crops, vegetables and, indeed, trees. Many of these plants and traits have been tested in more than 6.000 experimental releases.

Largely ignored, or yet not recognised, is the potential of transgenic crops as production plant -or bioreactor- for industrial raw materials (polymers, oil, carbohydrates), enzymes (industrial and medicinal purposes) and medical and pharmaceutical products. These transgenic "second and third generation" plants, focus on improving or generating so-called "output traits". Since 1991, transgenic plants producing bio-pharmaceuticals and bio-diagnostics have been released into the environment, often described as "gene-farming". Until now, there is no licensed, transgenic, plant-derived product on the market and therefore, there is also only limited information available on the introduced genes and no experimental data on potential, specific environmental risks. With this background, the current report aims at:

1. documenting the "state-of-the-art",
2. identifying and evaluating resulting potential and specific risks,
3. deriving potential measures for minimising those risks,
4. identifying possible gaps in (bio-)safety research.

The search in release databases (including those of APHIS and OECD) does only provide very few details on field releases of transgenic, bio-pharmaceuticals producing plants. Since products are not commercialised, corporates follow a very restricted information policy. Therefore, most of the information provided in the "state-of-the-art" report is based on a substantial literature survey in 5 different databases and interviews with about 20 leading scientists in this area. The question on specific risks, resulting from a potential future large-scale release of these crops for humans, animals, plants and environment, hasn't been addressed sufficiently, neither experimentally nor theoretically. This might be due to the fact, that it is still in question if these uncontrolled releases ever happen. However, the report identified, conceptionally, three groups of risks:

1. risks inherited by the product,
2. risks for the product, resulting from interaction with the environment,

### 3. risks for the environment, resulting from production, processing, application or disposal.

Whereas the first issue has to be dealt with by the respective drug approving agencies (in Europe: EMEA), analysing the second and third group is within the focus of environmental risk assessment. Since data and information is limited, answering the following questions were thought to facilitate initial steps towards assessing potential risks:

- Is it possible to predict and identify specific, direct impacts of the product upon field release?
- Is it possible to identify and analyse environmental factors, relevant for the safety assessment?
- From there, can we deduce specific risks for humans, animals and the environment?
- Is it possible to describe or even evaluate scenarios, beyond the direct cause-effect relationship?
- Is it possible to identify and categorise potential risks (e.g. according to function or structure)?

Proceeding from the identified or developed scenarios, the second task was to determine potential measures, enabling the safe use and release of these transgenic crops. Although, this has to be defined case-by-case, there are a number of management strategies available, which have been discussed in the context of "gene-farming":

- physical containment, i.e. the physical restriction of release, transport, processing and disposal,
- biological containment, i.e. minimising unintentional release and exposure by biological measures (including recombinant approaches),
- process-mediated containment, i.e. production strategies, minimising exposure,
- management, i.e. measures/procedures facilitating surveillance and identification.

Finally, the current report had to identify research gaps, with special emphasis on safety issues, and had to formulate prime targets for respective research.

## **2. State-of-the-Art**

The search in the USDA-APHIS and OECD-databases on releases of transgenic crops producing bio-pharmaceuticals only provided a first, very rough impression on the "state-of-the-art" of research and development in this field. This is mainly due to the fact, that details on the genetic modification are very difficult to get. However, the following conclusions can be drawn from this search:

- recombinant antibodies are the most important products of "gene-farming" (from 1993-1998, 43 applications are documented for the USA, one was rejected and all except six, were submitted by Agracetus),
- crop plants were used, which are also used for food and feed,
- most releases took place in the USA,
- only about 10% of the applications were filed by public research institutions,
- for 75% of the applications, details on the construct used are classified as confidential business information,
- there is a substantial misuse of the term "pharmaceuticals".

Table 1: Selected reports on the production of bio-pharmaceuticals in transgenic plants

Year/Author	Disease/Cause	introduc. sequence	transgenic species/(vector)	category
Modelska et al. 1994	Rabies/Virus	24 kDa-glycoprotein	tobacco, spinach (TMV, AIMV)	vaccine, V
Dalsgaard et al. 1997	Enteritis, Mink/MEV	VP2 capsid protein	cowpea (CPMV, CVP)	vaccine, V
Carillo et al. 1998	MKS/FMDV	VP1 capsid protein	<i>A. thaliana</i> ( <i>Agrobacterium</i> )	vaccine, V
Tuboly et al. 2000	diarrhea, pigs/TGEV	spike protein	lucerne, tobacco ( <i>Agrobacterium</i> )	vaccine, V
Castanon et al. 1999	haemorr. fever/HDV	VP60 capsid prot.	potato ( <i>Agrobacterium</i> )	vaccine, V
Eudes et al. 1999*	diarrhea, cow/BVDV	E2 glycoprotein	barley (plasmid, PB)	vaccine, V
Rymerson et al. 1999*	PRR-syndrome/PRRSV	ORF5	tobacco ( <i>Agrobacterium</i> )	vaccine, V
Allina et al. 1999*	or. papillomatosis COPV	COPV L1	tobacco ( <i>Agrobacterium</i> )	vaccine, V
Turpen et al. 1995	malaria/ <i>Plasm. malariae</i>	P.m. epitope	tobacco (TMV)	vaccine, H
Brennan et al. 1999a	pneumonia/ <i>P. aeruginosa</i>	peptid 10, 18	cowpea (CPMV, CVP)	vaccine, H
Brennan et al. 1999b	opportun. inf./ <i>S. aureus</i>	FnBP D2 domain	cowpea (CPMV, CVP)	vaccine, H
Arakawa et al. 1999b	cholera/ <i>Vibrio cholerae</i>	CT-B toxin	potato ( <i>Agrobacterium</i> )	vaccine, H
Mason et al. 1998	diarrhea/ <i>E.coli</i> ETEC	Lt-B toxin	potato ( <i>Agrobacterium</i> )	vaccine, H
Tacket et al. 2000	diarrhea/Norwalk-Virus	NV capsid protein	potato ( <i>Agrobacterium</i> )	vaccine, H
Walmsley et al. 2000	hepatitis B/HB Virus	OF-antigen	potato, tobacco ( <i>Agrobacterium</i> )	vaccine, H
McCormick et al. 1999	B-cell lymphom	anti-ideotyp. antibody	tobacco (TMV)	vaccine, H
Tackaberry et al. 1999	cytomegalie/hCMV	glycoprotein B	tobacco ( <i>Agrobacterium</i> )	vaccine, H
Yusibov et al. 1997	AIDS/HIV	VP3, p24	tobac., cucum.(TMV, Agro,TBSV)	vaccine, H
Koo et al. 1999	encephalomyelitis/MHV	S-protein epitope	tobacco (TMV)	vaccine, H
Ma&Jevnikar 1999	transplant rejection	MHC-II	tobacco ( <i>Agrobacterium</i> )	air-vaccine, H
Langridge et al. 1999*	diabetes/GAD	GAD, insulin CT-B	potato ( <i>Agrobacterium</i> )	air-vaccine, H
Zeitlin et al. 1998	herpes genitalis/HSV-2	MAB	soybean (plasmid, PB)	plmmun, H
Stoger et al. 2000	cancer/CEA	human scFv	rice, wheat (plasmid, PB)	diagnostic, H
Briggs et al. 1999*	herpes simplex/HS1/2	MAB	maize (plasmid, PB)	plmmun, H
Ma et al. 1998	caries/ <i>S.mutans</i>	MAB	tobacco ( <i>Agrobacterium</i> )	plmmun, H
Vaquero et al. 1999	cancer/CEA	MAB	tobacco (TMV)	diagnostic, H
Briggs et al. 1999*	-.-/human sperms	MAB	maize (stabil PB)	contrazeptive
Menassa et al. 1999*	IBD/-.-	interleukine IL-10	tobacco	hormone
Staub et al. 2000	growth disorder/-.-	h somatotropin	tobacco	hormone
Chong et al. 1999	iron-binding/-.-	h lactoferrin	potato, tomato, rice	VAP-milk
Arakawa et al. 1999	-.-/-.-	h $\beta$ -casein	potato, tomato	VAP-milk
Takase et al. 1998	-.-/regulation, lactose	h $\alpha$ -lactalbumin	tobacco	VAP-milk
Dieryck et al. 1997	blood subst./emergency	h hemoglobin	tobacco, maize	VAP-blood
Sijmons et al. 1990	blood subst./emergency	h serumalbumin	potato, tobacco	VAP-blood
Matsumura et al 1999*	-./-.-	h interferone $\alpha$ 2b/ $\alpha$ 8	potato	hormone
Panahi et al. 1999*	-./-.-	IGF-1	n.b.	hormone
Sehnke et al. 1999	-./-.-	pre-pro-ricin	tobacco	cell-toxin
Erickson et al. 1999*	-./-.-	swine pEGF	tobacco	hormone
Cramer et al. 1996	Gaucher disease/GCB	h glukocerebrosidase	tobacco	enzyme
Cramer et al. 1996	-./-.-	h protein C	tobacco	coagulation
Hogge et al. 1999*	-./-.-	hirudin	rapeseed/canola	coagulation

air: autoimmune-response; VAP: Value added protein; plmmun: passive immunisation; H: human medicine; V: veterinary medicine; h: human; MAB: monoclonal antibody; Viruses, see abbreviations; \*: contribution at the "International Molecular Farming Conference", London, Canada, 29. August - 1. September 1999

For Europe, there is only a limited number of reports (until 1998) on field releases of bio-pharmaceutical producing plants, mainly or exclusively carried out in Spain and France by BiocenSA or Meristem Therapeutics (belonging to the Limagrain Group).

A literature survey (1994 to 2000) was more informative with respect to the production of bio-pharmaceuticals in plants. The selection of products and publications, summarised in table 1, clearly demonstrates the diversity of plants used (potato, spinach, cucumber, cowpea, maize, tobacco, lucerne, rice, barley, wheat, rapeseed, sugarbeet, tomato and soybean) and production systems developed. Stable transformation of plants using *Agrobacterium* or particle bombardement or infection of non-transgenic host-plants by phytopathogenic, chimeric viruses (CPMV, TMV, TBSV, AIMV), both strategies were used for the stable or transient expression of genes encoding bio-pharmaceuticals.

A number of vaccines has been generated against, at least, 15 different animal- or human-pathogenic viruses as well as a selection of antibodies (monoclonal, anti-ideotypic and also single-chain fragments) for diagnostic and immunetherapeutic purposes, even as contraceptives. In addition, therapeutic enzymes (e.g. human glucocerebrosidase, one of the most expensive drugs, for treatment of the Gaucher-disease), blood- and milk-proteins (human lactoferrin, serumalbumin, casein) and a number of peptide hormones (e.g. interleukines and interferones, growth factors) have been produced in transgenic plants.

Whereas at the beginning, the yield of heterologous proteins from transgenic plants was comparably low (0.01-0.1% of the total soluble protein), concentrations of up to 10% are now achieved. Therefore, the production of kg-amounts of a specific antibody per hectare has become a realistic scenario. This is important, because economic issues tend to play a more and more important role in answering the question, which bio-pharmaceutical products can be expected to be produced in transgenic plants in the coming years.

### **3. Possible specific risks**

For the time being, the uncontrolled release of (transgenic) plants producing bio-pharmaceuticals -if this ever happens- appears to be related with specific risks. First, because there is only a limited amount (if at all) of data available on the potential environmental impact of large-scale releases of medicinal plants, from which experience could be drawn. Second, because classical food and feed crops are mainly used, which are hardly known as "medicinal plants". Third, the analysis of potential effects and side-effects is restricted to a defined mode of application and a specified group of humans or animals. And fourth, with the intended therapeutic and medicinal effect of respective products, an additional factor is introduced, and may need to be considered, in the overall risk assessment procedure. Moreover, there is a multitude of plant species, viral expression systems and products to be analysed and evaluated. Finally, although a number of permits for release into the environment have been granted, especially in the USA, the number of "environmental assessments" and access to details is limited.

As a concept, risks inherited by the product, risks for the product and risks for the environment can be discriminated. The analysis of *risks inherited by the product* can profit from informations and experimental data, acquired during the development of the product. As a rule, many of the bio-pharmaceutical products in question are not new. The production

system is new. This is a critical issue, since neither the application form nor the group of "consumers" is controlled, if these transgenic plants are commercially released.

*Risks for the product* are likely, because of the interaction of the transgenic plant with its biotic and abiotic environment. The question is, do biotic and/or abiotic factors influence the expression-stability of the introduced genes or do we have to expect modifications. This is important, provided the plant itself becomes a medical product or drug (this is an issue to be dealt with by the approving authority) or, if these environmental factors induce significant modifications of the product during planting, then there is a need to analyse not only the product itself but also its modified derivatives (this is an issue to be dealt with by the authority, regulating the release). An additional risk for the product is related to the production system itself. Proteins produced in plants appear to have specific glycosylation-patterns, differences in codon-usage may cause ribosome stalling or may significantly influence the aminoacid-sequence (the primary structure of proteins), resulting in additional proteolytic sites or modifications of the secondary and tertiary structure (e.g. di-sulfide bonds).

*Risks for the environment* by transgenic plants are only possible, if they are likely to be exposed to the environment. Reflecting the intended effect of pharmaceutical products, and besides the evaluation of the "effect-risk", analysing the "exposure-risk" -and measures for minimising it- gain importance. For that reason, it was impossible to follow the categorisation of risks described above. Already considering a possible classification of bio-pharmaceutical products according to structure and function, the following risk-groups have been considered in more detail:

- modified protein structures,
- modified and/or cryptic functions,
- indirect effects,
- recombination of nucleic acids.

*Modifications of protein structure and protein function* result from translational and/or transcriptional errors in heterologous expression systems, from errors during protein folding or altered glycosylation- and processing-patterns. For all these modifications, the current report has identified and described examples. These examples fall into the first two categories of the previous concept: risks for and by the product. If and how these factors are of any relevance for an environmental assessment, is not yet known. Since it can be assumed, that only those products will be produced under field conditions, for which a medicinal application is envisaged, modified products are rather unlikely to reach the field. It remains unclear, if this criterion is sufficient. In other words, can we exclude any unwanted environmental effect in the field, if the "margin of failure" is determined by the quality needs.

With respect to possible environmental effects, the search for cryptic and unexpected functions is more rewarding. Also here, the current report provides a number of examples, demonstrating the fact, that the products encoded by the introduced genes can function in a heterologous system, sometimes in a way not seriously considered or analysed. *A priori*, one may not expect that the expression of human hormones or enzymes involved in the pathogen-defense system of mammals, do have -or can realise- a function in plants. But there are examples, like the interferone-mediated virus-resistance, the lactoferrin-mediated tolerance against microbial infections or the pathogen-induced cell death in plant cells, expressing the human 2'-5'-adenylate-system. In other words, the analysis and evaluation of potential environmental risks is not restricted to the identification of risks for non-target orga-

nisms, but must even look for possible "fitness" relevant traits, realised by the expression of bio-pharmaceuticals.

*Indirect effects* on human health and environment result from the production and application of bio-pharmaceuticals from transgenic plants, but are not directly related to the product itself. This may not be a prime target for the evaluation of environmental risks. But for a complete risk assessment, considering the public goods described in the German Genetic Engineering Act, one may need to address the potential improvement of human and animal health (this includes the health for the worker, considering the fact, that the production of vaccines in human cell cultures represents a risk) and impacts resulting from changes in habit, medicinal applications or agricultural production.

A link to the discussion on almost "classical" risks related to transgenic plants, emerges from the use of phytopathogenic, chimeric viruses and from the production of vaccines in transgenic plants. The question is: is the expression of subgenomic sequences of pathogenic human or animal viruses in plants or phytopathogenic, recombinant viruses likely to result - via recombination- in new, potentially more virulent, viruses. It is "state-of-the-art", that the recombination between, for example, a latent para-retrovirus and a vaccine-encoding gene is theoretically possible - although it hasn't been directly observed yet. But, this will only lead to the reconstitution of the latent para-retrovirus, if the vaccine-encoding sequence provides exactly the feature needed. In turn, a latent para-retrovirus has to provide exactly the feature needed by a vaccine-transcript to become a reconstituted or new virus, able to systematically infect the plant - and then, there is still the open question of transmission and systemic spread of this virus. It can be assumed, from all the scientific evidence available, that a high mutation rate, short replication cycles and numerous recombination events contribute to the adaptability and variability of viruses in general. Obviously, selection pressure allows only a very limited number of structures and sequences. With respect to the development of new viruses or the "revitalisation" of latent viral sequences, there is no reasonable scenario or logical chain yet visible, supporting or justifying this concern.

Since there are only few or even no research results available, facilitating the analysis and assessment of risks resulting from the release of transgenic plants producing bio-pharmaceuticals, it has been analysed, if we can draw conclusions or can develop guidelines from the influx of "non-biotic" pharmaceuticals into the environment. Obviously, there are no publications, dealing with the impact on environment of the large-scale release of medicinal plants. However, there are a number of studies on the effect and persistence of pharmaceuticals, released into the environment - by waste water from hospitals, sewage from slaughterhouses and manure as organic fertiliser. Although, this experience may provide some hints in assessing the risks resulting from bio-pharmaceuticals, these represent a different class of chemicals, namely proteins and peptides. Reliable data neither exist for the influx volume (e.g. from plants into soil) nor for their persistence in soil or aquatic systems. Respective experience could be deduced from the "conventional" production systems - however, the use of animal and human cell cultures includes completely different risk-scenarios as well.

Finally, the current study intended to develop a structure, incorporating the identified potential risks - under the assumption, that transgenic plants, producing bio-pharmaceuticals are indeed released on a large scale and under more or less uncontrolled and unrestricted conditions. However, this scenario is, according to all experts consulted, very unlikely.

Nevertheless, a classification of bio-pharmaceutical products should be possible and represents an advanced feedback mechanism of assessment and analysis, as it is typical for almost all assessment strategies. In accordance with the assessment of "non-biotic" pharmaceuticals (this includes low-molecular weight chemicals and minerals like steroids, aminoglycosides, platinum-salts), a guiding catalogue of questions on exposure and effect of bio-pharmaceuticals produced in plants can be developed. This would be an important and helpful contribution to structure and harmonise respective risk analysis and risk assessment.

#### **4. Risk management**

Because of the immanent effect of pharmaceutical products, there is a shift in the focus of impact assessment, away from assessing the product's effect (impact or effect analysis/assessment), more towards an analysis and assessment of the stability and efficiency of strategies to minimise the exposure of the product (exposure analysis/assessment). Consequently, the documentation of risk management strategies concentrate on measures, minimising environmental exposure. This can be done by organisational measures or by a number of "containment" techniques. These can be physical, biological or process-mediated containment measures and procedures and methods for reliable identification, surveillance and monitoring. Table 2 summarises several possible management-strategies, addressed in the current report:

Table 2: Categorisation and description of possible measures for minimising the environmental exposure of transgenic plants, producing bio-pharmaceuticals

<b>Category</b>	<b>Method</b>
<b>Organisation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➢ release restricted in time, location and scale,</li> <li>➢ selection of appropriate plants and/or production systems,</li> <li>➢ agricultural procedures,</li> <li>➢ larger minimal distances to other crops,</li> <li>➢ controlled and restricted access.</li> </ul>
<b>Biology</b>	<p>minimise (transgene) spread:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➢ terminator-technology,</li> <li>➢ parthenokarpic plants,</li> <li>➢ male sterility,</li> <li>➢ expression in specific organs, organelles, times.</li> </ul> <p>with viruses:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➢ use of modified, defect constructs,</li> <li>➢ specific restriction of the host range.</li> </ul>
<b>Process</b>	inducible promoters, excluding any expression of the transgene under field conditions
<b>Identification and Monitoring</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➢ information on production and processing,</li> <li>➢ use of dominant marker genes,</li> <li>➢ development of high-resolution detection systems,</li> <li>➢ development of highly efficient information management.</li> </ul>

For obvious reasons, the single measures and methods differ with respect to the safety level provided, the applicability and practicability, the experience acquired and the costs involved. Combinatorial solutions are possible and it has to be decided case-by-case, which procedure or combination of procedures, are appropriate with respect to the expected and/or identified risk (considering the potential benefit for human health and environment).

## **5. Conclusion and recommendation**

At first site, a special analysis and assessment of potential risks, associated with the production of bio-pharmaceuticals in plants, appears to be justified. The following reasons account for that:

- producing recombinant pharmaceuticals in plants is a new research field, experience is marginal,
- pharmaceutical products intend to have an impact on human beings (and/or animals),
- production systems are currently based on food and feed crops,
- for the assessment of possible effects and side-effects of medical care products, the ill patient serves as a reference; this does not apply for the assessment of effects resulting from the release of these products,
- pharmaceutical proteins or peptides produced in plants can propagate.

Secondly, it appears, that the production of pharmaceuticals in plants in general, are generally not subject of an environmental impact assessment. The production of drugs, flavours, colours and fragrances in plants and the modification of respective secondary metabolism pathways by breeding, mutation and selection has a long history, however, environmental assessments in this field are rare.

If one separates scientific risk assessment from its political and regulatory framework, it is very difficult to explain and transport, that releasing a tobacco plant with modified alkaloid content does not require a qualified environmental assessment. Releasing a tobacco plant, producing human collagen, however, does require a specific assessment. In other words, there is only a very limited number of references, experiences or base-lines, which could be used to assess an identified risk factor.

Consequently, possible research projects and programmes should not only address transgenic plants. A second approach has to address "non-transgenic" scenarios, also to provide the missing base-line information and references, facilitating the assessment of risks. For example, is it possible to detect vaccines, peptide-hormones or antibodies in sewage water of hospitals and slaughterhouses and can we detect impacts on human health and environment? What can we learn from the phylogenetic relation of Tospoviruses and Hantaviruses, what consequences can be deduced from the relation of cauliflower mosaic virus and hepatitis B virus? The option and aim of pyramiding relevant, important and informative data must be the most important criterion for evaluating respective research proposals. Only these data contribute to and facilitate risk analysis and risk assessment.

In addition, potential risks do not only result from bio-pharmaceuticals produced in transgenic plants. The (re-)discovery of preventive measures in medicine and the increasing knowledge about long-term effects of specific ingredients in our diet (combining epidemiologic analysis and further know-how on physiological cause-effect chains) and the increasing demand for value-added food (keywords: nutraceuticals and functional food), will promote the manipulation of secondary metabolite pathways in the future.

It can be expected, that there will be a shift, away from the production of food additives (e.g. vitamin formulations), more towards a manipulation of the plant itself - in this respect, "Golden Rice" is just the beginning. Therefore, the author strongly emphasises the organisation of an experts-meeting with representatives from various disciplines (pharmacology, toxicology, veterinary and human medicine, ecology, molecular biology, biochemistry, microbiology,

logy, zoology and botany), including representatives from public and private research and development, government and non-governmental institutions. This meeting should not only address the production of bio-pharmaceuticals or biologics in transgenic plants but should specifically refer also to the related fields, namely nutraceuticals and functional food. The current report is thought to provide a basis for discussion.