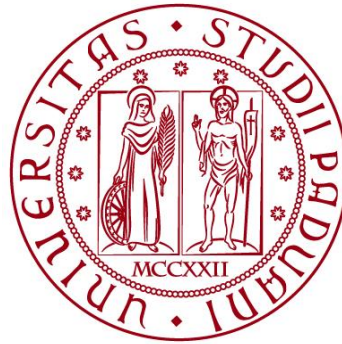


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**La risposta delle biotecnologie vegetali
al problema delle pandemie**

Relatore: Prof. **Trainotti Livio**

Dipartimento di Biologia

Laureanda: **RAVAZZOLO CHIARA**

Matricola n. **2000609**

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Sommario

Abstract	3
1. Introduzione	4
a. Le malattie infettive nella storia.....	4
b. Le pandemie	6
2. Prevenzione e vaccini	7
a. Effetti della prevenzione	7
b. Vaccini: tipologia e problematiche.....	7
3. Sintesi di piattaforme vaccinali in vegetali	9
a. La scelta degli organismi vegetali per la sintesi.....	9
b. Vaccini edibili.....	10
c. Vaccini a subunità e <i>virus like particles</i> (VLPs).....	12
4. Quando la prevenzione non è abbastanza	14
a. Kit diagnostici.....	14
b. Farmaci antivirali e immunoterapie monoclonali	16
5. Risvolti etici del <i>molecular farming</i>	19
6. Conclusioni	23
Bibliografia	25

Abstract

Al progresso industriale e scientifico si è affiancato nei secoli un fenomeno sempre più ricorrente: le pandemie. La loro insorgenza è promossa dal forte mutamento dell'ambiente naturale che ci circonda e richiede alla sanità mondiale una reazione sempre più rapida e massiva per evitare ingenti perdite in termini di vite umane ed economici. In risposta alle problematiche sollevate da un evento pandemico virale, le biotecnologie vegetali propongono diversi protocolli di sintesi, in organismi modello, di piattaforme vaccinali, reagenti per kit diagnostici e terapie in tempi ragionevolmente brevi, con alta resa in termini di prodotto e senza effetti collaterali significativi. I vaccini prodotti in vegetali, in particolare, risultano somministrabili con i metodi più disparati fra cui iniezione di proteine virali o *virus like particles* (VLPs) e ingestione di formulazioni edibili. Fra lo sviluppo e la commercializzazione di sostanze farmacologicamente attive a base vegetale vi è un ostacolo rappresentato dall'opinione pubblica: il diritto italiano ed europeo non vieta la produzione di vegetali geneticamente modificati (GM) in ambiente controllato e sotto le linee guida del *good manufacturing practice* (GMP), ma la popolazione tende a demonizzare i prodotti dell'ingegneria genetica a favore di soluzioni considerate più naturali.

1. Introduzione

a. Le malattie infettive nella storia

Il fenomeno dell'evoluzione da sempre porta alla selezione degli organismi più adatti alla sopravvivenza in relazione alle condizioni dell'ambiente che li circonda: anche gli ominidi sono stati soggetti a questo fenomeno. Con il passare del tempo, le attività umane hanno sempre di più condizionato le caratteristiche ambientali della Terra.

La sedentarietà dell'*Homo neanderthalensis* (Paleolitico medio, fra i 200 000 e i 30 000 anni fa) ha permesso l'istituzione di allevamenti animali primordiali che hanno subito cambiamenti radicali fino a giungere alla forma attuale rappresentata dagli allevamenti intensivi. Le rivoluzioni industriali (a partire dal 1700 d.C.) attraverso invenzioni come la macchina a vapore, i motori a scoppio ed elettrici, i computer, i telefoni, e, più in generale, attraverso le scoperte e il progresso tecnologico e scientifico, hanno modificato e modificano tutt'ora la natura, imprimendo su di essa un'ulteriore pressione evolutiva che si accresce sempre di più in tempi brevi.

Tutti gli organismi naturali sono soggetti a fenomeni evolutivi, compresi i microrganismi: batteri e virus si sono adattati, attraverso eventi di ricombinazione genica casuale, per sopravvivere ai cambiamenti che i loro diversi habitat hanno subito per cause naturali e antropogeniche fra cui il cambiamento di stile di vita in termini economici e sociali promossi anche dal fenomeno della globalizzazione. Fra questi microrganismi, anche specie patogene si sono co-evolute con l'ambiente e con *Homo sapiens* portando all'insorgenza di infezioni endemiche e pandemiche che hanno causato gravi perdite sociali e economiche a livello mondiale.

Nel corso della storia sono state diverse le malattie infettive che hanno colpito fortemente la popolazione causando epidemie grazie alle caratteristiche di infettività e virulenza degli agenti eziologici. Affinché si possano definire "pandemie", le epidemie devono avere caratteristiche di diffusione rapida e in più aree geografiche del mondo, mentre con "endemia" si indica una malattia infettiva il cui agente eziologico persiste e circola stabilmente in un determinato territorio con numero di casi elevati, ma distribuiti nel tempo.

Tabella 1. Insorgenza di malattie infettive nella storia. (Morens DM, 2020).

Year	Name	Deaths	Comments
430 BCE	"Plague of Athens"	~100,000	First identified trans-regional pandemic
541	Justinian plague (<i>Yersinia pestis</i>)	30-50 million	Pandemic; killed half of world population
1340s	"Black Death" (<i>Yersinia pestis</i>)	~50 million	Pandemic; killed at least a quarter of world population
1494	Syphilis (<i>Treponema pallidum</i>)	>50,000	Pandemic brought to Europe from the Americas
c. 1500	Tuberculosis	High millions	Ancient disease; became pandemic in Middle Ages
1520	Hueyahuatl (<i>Variola major</i>)	3.5 million	Pandemic brought to New World by Europeans
1793-1798	"The American plague"	~25,000	Yellow fever terrorized colonial America
1832	2nd cholera pandemic (Paris)	18,402	Spread from India to Europe/Western Hemisphere
1918	"Spanish" influenza	~50 million	Led to additional pandemics in 1957, 1968, 2009
1976-2020	Ebola	15,258	First recognized in 1976; 29 regional epidemics to 2020
1981	Acute hemorrhagic conjunctivitis	rare deaths	First recognized in 1969; pandemic in 1981
1981	HIV/AIDS	~37 million	First recognized 1981; ongoing pandemic
2002	SARS	813	Near-pandemic
2009	H1N1 "swine flu"	284,000	5th influenza pandemic of century
2014	Chikungunya	uncommon	Pandemic, mosquito-borne
2015	Zika	~1,000?	Pandemic, mosquito-borne

N.B. Nella tabella non viene riportata la malattia infettiva pandemica di tipo respiratorio Covid-19 (agente eziologico: coronavirus SARS-CoV-2) che nel 2019 ha causato circa 6.9 milioni di decessi in tutto il mondo (ultimi dati OMS – fonte: Health Emergency Dashboard, 7 giugno 2023 ore 12.23 pm).

Analizzando la tabella, si può apprezzare come testimonianze storiche risalenti ai tempi della polis di Atene riferiscano dell'insorgenza di un'epidemia trans-regionale di quella che è stata identificata dagli storici come "Peste di Atene"; un altro aspetto interessante evidenziato dalle voci della colonna "anni" nella tabella è come l'insorgere di malattie infettive, diffuse in ampie regioni, sia sempre più frequente con il progredire del tempo. Come accennato precedentemente, le cause di questo incremento della frequenza d'insorgenza nel tempo e nella rapidità di diffusione delle malattie infettive è da indentificarsi principalmente nella pressione evolutiva che la popolazione umana imprime sull'ambiente e sugli organismi che lo popolano attraverso fenomeni come industrializzazione, inquinamento, sfruttamento della natura e globalizzazione. Batteri e virus sopravvivono adattandosi a questo scenario in continuo mutamento, dando origine a nuove specie e varianti come microrganismi batterici resistenti agli antimicrobici (fenomeno dell'AMR *AntiMicrobial Resistance*) e a virus con alto indice di infettività e in grado di ricombinazione genica rapida con cui eludono la protezione vaccinale.

I virus sono microrganismi parassiti intracellulari obbligati incapaci di replicazione autonoma che infettano cellule ospiti, fra cui anche quelle animali (e quindi umane), sfruttandole per proliferare. Mentre si dibatte ancora circa la loro identificazione come esseri viventi o meno, la comunità scientifica non dubita delle caratteristiche che rendono i virus in grado di scatenare epidemie, più o meno estese, con alto tasso di mortalità, dovuto anche all'immunodepressione che provocano nell'organismo infettato che risulta più suscettibile ad una serie di complicazioni fra cui anche infezioni batteriche tipiche dell'ambiente nosocomiale; oltre all'ingente numero di morti nelle popolazioni che hanno subito l'infezione, nella storia si registrano perdite economiche associate ad eventi endemici e pandemici che hanno colpito l'uomo direttamente o

indirettamente (infezioni generalizzate di vegetali per l'agricoltura e di animali per l'allevamento).

b. Le pandemie

Le pandemie si distinguono in cinque categorie: "newly emerging" (di nuova insorgenza) che causano patologie di carattere pandemico mai osservate in precedenza; "re-emerging" (re-insorgenti) si riferiscono a eventi passati di diffusione di un patogeno che vengono a manifestarsi nuovamente; "de-emerging" (de-insorgenti), al contrario, identifica malattie globali che sono, o stanno per essere, eradicare; "deliberately emerging" (volontariamente insorte) associate al bioterrorismo; "accidentally emerging" (accidentalmente insorte) si riferiscono a pandemie generate dall'uomo nel tentativo di studiare agenti patogeni e produrre possibili cure. (Morens DM, 2020) La propagazione su vasta scala di un'epidemia viene influenzata da vari fattori tra i quali ricordiamo i seguenti: le caratteristiche di virulenza e infettività dell'agente eziologico, la permissività dell'ospite (intesa come presenza di recettori che mediano l'ingresso del microorganismo nelle cellule, ma anche come stato di salute del sistema immunitario ospitante) e, come spiegato precedentemente, l'ambiente e i cambiamenti repentini che sta subendo per cause naturali e artificiali.

Si rende necessario per l'uomo disporre di metodi in grado di contrastare le pandemie così da poter reagire alla loro insorgenza in modo tempestivo per minimizzare le perdite sociali ed economiche e, per perseguire questo obiettivo, risulta ancora più importante la prevenzione: infatti, come evidenziato da (A.S. Bernstein, 2022), i costi relativi al sostentamento della popolazione durante una crisi pandemica è di 20 volte maggiore rispetto all'investimento richiesto per la ricerca della sua prevenzione.

La prevenzione nei confronti di pandemie virali si esplica con diversi comportamenti quali: diffusione di maggiore coscienza circa l'importanza dell'igiene; istituzione di ricerche internazionali mirate alla conoscenza delle dinamiche epidemiologiche e al rischio che nuovi patogeni potrebbero rappresentare per lo scenario globale; moratoria dello sviluppo di armi biologiche offensive e difensive; studio di nuovi vaccini e nuove piattaforme vaccinali versatili affinché risultino adattabili ed efficaci nella prevenzione di patogeni ancora ignoti.

2. Prevenzione e vaccini

a. Effetti della prevenzione

Lo studio e la ricerca relativi ai vaccini profilattici risultano fondamentali per la sanità mondiale in quanto, con una campagna di distribuzione e somministrazione ben pianificata e globale, si può ambire a minimizzare gli effetti avversi e, addirittura, debellare alcune delle malattie infettive più mortali nella storia dell'uomo, come talvolta è successo. Gli effetti della prevenzione sono diversi: in primis permette di salvare molte vite in quanto la probabilità che una persona vaccinata, entrando a contatto con il patogeno, sviluppi la malattia o complicazioni associate ad essa si riduce drasticamente; prolunga l'aspettativa di vita; diminuisce la mortalità infantile diffusa nelle aree geografiche più povere e nei paesi in via di sviluppo (attualmente circa 1.5 milioni di bambini sotto i 5 anni muoiono a causa di patologie prevenibili con la vaccinazione); rafforza l'immunità e stimola la memoria immunitaria nei più giovani abbassando drasticamente la probabilità di incorrere in patologie tipiche dell'età adulta; evita l'insorgere di epidemie che distruggono le comunità; alleggerisce i costi relativi al sostentamento di soggetti malati e con disabilità causate dall'infezione. In generale, l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) stima che i vaccini attualmente disponibili prevengono 2-3 milioni di morti globalmente ogni anno: questi farmaci preventivi sono ormai parte integrante della moderna assistenza sanitaria e risultano lo strumento migliore per evitare certi tipi di infezioni umane. (Veysel Kayser, 2021)

Un esempio delle conseguenze benefiche della prevenzione è relativo all'eradicazione del Variola virus (noto come "virus del vaiolo umano" o "Smallpox virus") la cui mortalità del 30% ha causato milioni di vittime in 3000 anni circa (informazioni reperite dal sito dell'ISS "Istituto Superiore di Sanità" www.epicentro.iss.it/vaiolo). Nel X secolo in Asia i curatori idearono la vaiolizzazione, una pratica il cui principio di base è il medesimo di alcuni vaccini moderni: esporre un soggetto sano ad una dose irrisoria di patogeno che, nel caso della medicina antica, corrispondeva a materiale biologico prelevato da un soggetto malato in via di guarigione; sono queste le conoscenze che permisero, molti anni dopo, al dottor Jenner di formulare il vaccino contro il vaiolo. Un esempio dell'effetto che la collaborazione internazionale ha ottenuto sulla salute pubblica mondiale è il programma "Operation Smallpox Zero" istituito dall'OMS che nel 1980 ha permesso di poter dichiarare la malattia del vaiolo umano eradicata (Veysel Kayser, 2021).

b. Vaccini: tipologia e problematiche

I vaccini sono farmaci preventivi basati sul principio, già osservato ed emulato in passato, di esporre un individuo sano a contatto con una porzione o tutto il

patogeno attenuato, in modo da scatenare la risposta immunitaria; l'effetto è la genesi della memoria immunitaria che permette all'individuo che ha ricevuto il vaccino di non incorrere nella patologia in questione o comunque di riuscire a guarire se dovesse contrarla, in quanto il suo organismo possiede già le informazioni utili alla produzione di anticorpi efficaci contro l'agente eziologico. Esistono diverse tipologie e classi di vaccini: vaccini polisaccaridici coniugati, vaccini virali attenuati e inattivati, vaccini a subunità, vaccini basati su acidi nucleici, sulla formazione di complessi nanoparticellari o su vettori virali. Alcuni vengono inoculati in singola dose garantendo immunità a vita, altri necessitano di iniezioni di richiamo per risultare efficienti nella prevenzione, soprattutto se l'agente eziologico è predisposto a eventi genetici di *drift* e *shift* (effetti dell'evoluzione). Sono stati formulati anche vaccini per gli animali da allevamento e da compagnia che risultano importanti per diversi scopi: perseguire la salute e il benessere dell'animale nell'ottica di prevenzione di malattie infettive; aumentare l'efficienza di produzione, la qualità e la sicurezza degli alimenti; contribuire alla sanità pubblica disincentivando la trasmissione zoonotica di patogeni e riducendo l'insorgere di focolai di infezioni umane; ridurre l'utilizzo di antibiotici nella cura di animali da produzione e da compagnia per evitare di incrementare il fenomeno della resistenza antibiotica (Roth, 2011). Le problematiche relative alla diffusione dei vaccini come metodo di prevenzione sono i lunghi tempi richiesti dalla ricerca e dalla sperimentazione, i costi elevati di produzione e di acquisto, la quantità di dosi disponibili, le modalità di trasporto che richiedono condizioni stabili e particolari come la catena del freddo, la necessità di personale specializzato per la somministrazione, l'ignoranza e le false notizie che influenzano l'opinione pubblica generando sfiducia non solo nelle vaccinazioni, ma in generale nel sistema sanitario.

3. Sintesi di piattaforme vaccinali in vegetali

a. La scelta degli organismi vegetali per la sintesi

Fra gli ostacoli posti all'insorgere di eventi endemici e pandemici, la lentezza di sviluppo e di approvazione per la somministrazione, la scarsa quantità di dosi disponibili e il costo ingente sono sicuramente gli aspetti più salienti. Per esempio, la capacità di produzione annuale di vaccini antiinfluenzali basati su uova embrionate di pollo è di circa 1.5 miliardi di dosi per l'influenza stagionale e 8 miliardi di dosi per una potenziale influenza pandemica; di conseguenza solo il 60% della popolazione mondiale disporrebbe del vaccino se sorgesse un'altra pandemia durante lo stesso anno; sarebbe necessario produrre 2 miliardi di dosi in più per raggiungere la cosiddetta "immunità di gregge" corrispondente all'immunizzazione del 70% della popolazione. (Veysel Kayser, 2021) L'accessibilità, e di conseguenza l'utilizzo, di formule vaccinali risulta problematica in termini quantitativi e qualitativi, ma anche economici. Un esempio lampante di ciò si verifica negli allevamenti per scopo alimentare in cui vengono somministrati agli animali antibiotici piuttosto che vaccini in quanto questi ultimi risultano più costosi; come effetto avverso di questa scelta, volta a garantire la sicurezza degli alimenti destinati al consumo umano, vi è il dilagare del fenomeno dell'antibiotico resistenza all'interno del bestiame. (Roth, 2011)

Il contributo che le biotecnologie vegetali possono apportare alla prevenzione è quello di sintetizzare piattaforme vaccinali che garantiscono economicità, abbondanza, sicurezza, versatilità e tempestività nella risposta. Questo approccio viene definito come "*molecular farming*" in quanto si sfruttano organismi vegetali per la sintesi di molecole con valore aggiunto, il che richiama il concetto di fattoria. Proprio perché questi organismi sono coltivati con l'intento di produrre sostanze farmacologicamente attive, devono sottostare ad un insieme di regole e linee guida, cioè le norme di buona fabbricazione conosciute come GMP "*good manufacturing practice*". Le specie vegetali più sfruttate per il molecular farming rientrano nella categoria "*Generally regarded as safe*" (GRAS) e sono: per l'espressione di antigeni *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago Sativa*, *Spinacia oleracea*, *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum*, *Aloe vera* e alghe unicellulari; per l'espressione di proteine si sfruttano semi di *Zea mays*, di *Oryza sativa* e *O. glaberrima*, di *Phaseolus vulgaris* e di *N. tabacum*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum*, *Fragaria*, sospensioni di colture cellulari di *N. tabacum* e *Z. mays* e colture di radici.

In generale, le colture cellulari vegetali non abbattano i costi di produzione al pari dei protocolli di trasformazione transiente in organismi modello vegetali. (Rybacki, 2010) Tuttavia, i vantaggi garantiti dall'uso di organismi vegetali, rispetto ai metodi classici, per la produzione di vaccini sono: velocità di sintesi rispetto ai sistemi basati su cellule animali in cui è necessario stabilizzare una

linea cellulare (il che richiede tempo); escludendo approcci che coinvolgono colture cellulari vegetali, costi ridotti rispetto alle spese necessarie per acquistare ed utilizzare gli strumenti atti al mantenimento di colture di cellule animali o batteriche; produzione in elevata quantità in quanto da una sola linea cellulare o organismo vegetale è possibile ottenere una massiccia quantità di prodotto; sicurezza garantita dall'uso di un sistema vegetale in cui non proliferano patogeni animali; garanzia di sintesi di proteine con configurazione favorevole al loro utilizzo ultimo (in particolare i glicani ricchi in mannosio) e su cui è semplice apportare modifiche post-traduzionali; il processo di *scale-up* (estensione industriale) risulta semplice ed è ancora più rapido se si sfruttano trasformazioni transienti, ottenibili attraverso l'introduzione di vettori virali o l'infiltrazione di virus modificati veicolati all'interno di vettori a T-DNA da *Agrobacterium tumefaciens*, piuttosto che piante transgeniche (che però garantiscono più resa). Per esempio da 1 ettaro di terreno coltivato con *N. tabacum* ingegnerizzato attraverso *A. tumefaciens* dopo 90 giorni si ottengono da 200 a 700 grammi di proteine d'interesse. (Capell T., 2020)

Alcune delle compagnie che a partire dalla fine degli anni '90 hanno sviluppato strutture adatte alla sintesi di piattaforme vaccinali basate su organismi vegetali sono: Kentucky BioProcessing (Owensboro, KY, USA), Medicago Inc. (Durham, NC, USA), Caliber Bio Therapeutics (Bryan, TX, USA). Quest'ultima, ad esempio, è in grado di produrre 3500 kg di materiale vegetale in un unico ciclo produttivo sfruttando impianti di illuminazione a LED (abbattono i costi e il tempo di crescita), sistemi automatici di colture idroponiche e sistemi di agroinfiltrazione ad alta resa: con questo tipo di strutture si ottengono facilmente in circa 2 mesi più di 100 milioni di dosi di vaccino a subunità contro il virus influenzale H1N1. (N. Shahid, 2016)

b. Vaccini edibili

I ricercatori negli ultimi trent'anni hanno approcciato una nuova formulazione vaccinale associando l'alimentazione alla terapia a somministrazione orale: i vaccini edibili. I vaccini edibili sono vaccini ricombinanti ottenuti con l'espressione in organismi vegetali commestibili di antigeni virali specifici per un patogeno. (N. Shahid, 2016) La necessità di disporre di una tale piattaforma preventiva sorge da due osservazioni principali: la difficoltà relativa alla somministrazione di vaccini nella popolazione dei paesi meno industrializzati in cui mancano le strutture sanitarie, il personale specializzato e le infrastrutture per il trasporto e la conservazione; la poca praticità che si riscontra nell'iniettare un vaccino in certi tipi di allevamenti come quelli avicoli o ittici. Un altro aspetto che spinge la ricerca verso la scoperta di nuovi approcci per la prevenzione in campo alimentare è la consapevolezza che le zoonosi rappresentano il 75% delle infezioni emergenti in *Homo sapiens* (ad esempio rabbia, listeriosi, influenza

suina, influenza aviaria, brucellosi, toxoplasmosi, psittacosi) e che anche le malattie non-zoonotiche (ad esempio diarrea da coli, edema dei maiali, coccidiosi) possono inficiare la qualità dei prodotti di derivazione animale come latte e carne. (Rybicki, 2010)

Poter usufruire di vaccini commestibili significa ridurre il numero di specialisti necessari per la produzione, in quanto sarebbero sufficienti i contadini locali, e per la somministrazione, in quanto si tratterebbe di dover ingerire degli alimenti sia nel caso dell'uomo che nel caso degli animali da allevamento. Anche il trasporto viene semplificato in quanto non risulterebbe più necessario mantenere la catena del freddo per conservare il prodotto che verrebbe dislocato in forma di liofilizzati stabili a temperatura ambiente, o addirittura si potrebbero seminare in loco i vegetali in grado di sintetizzare il vaccino. Questa formulazione risulta più sicura in quanto non sfrutta virus attenuati, provoca meno effetti collaterali, non induce tolleranza e garantisce che gli antigeni virali, associati a tag per la localizzazione, vengano rilasciati nel lume intestinale dove solo il microbiota è in grado di disgregare la parete vegetale. Infine, i vaccini edibili garantiscono una discreta risposta immunitaria mucosale, sistemica e cellulare. (N. Shahid, 2016)

Una problematica associata alla produzione di vaccini edibili direttamente nel luogo in cui sono necessari è il controllo della qualità del prodotto in termini di distribuzione uniforme dell'elemento immunizzante nell'organismo vegetale per garantirne una concentrazione costante e in dose sufficiente affinché sia efficace per la prevenzione. Anche l'amministrazione della distribuzione deve essere regolata per evitare il rischio che vengano somministrare dosi di vaccino errate (di meno o di più) e con frequenza controllata.

Gli organismi vegetali destinati all'alimentazione che possono essere resi transgenici e sfruttati per la sintesi di proteine con scopo vaccinale, attraverso sistemi di espressione inducibili o costitutivi, sono di diverso tipo. Si possono ingegnerizzare i frutti e i tuberi come è stato fatto per ottenere delle patate transgeniche in grado di sintetizzare l'antigene di superficie del virus dell'epatite B, detto HBsAg o antigene Australia; è una piattaforma promettente, ma da ottimizzare, in quanto attualmente una dose di vaccino parenterale contiene 40 µg di HBsAg, mentre per ottenere degli effetti immunitari paragonabili un vaccino edibile dovrebbe essere somministrato in 3 dosi da 100 g di patate contenenti 1 mg di HBsAg. Anche i vegetali con foglie edibili (lattuga, spinaci, ecc...) si prestano all'ingegnerizzazione per la sintesi di antigeni; è stato dimostrato che la proteina di superficie *measles virus haemagglutinin* MV-H del morbillo può essere espressa in lattuga transgenica che, se ingerita, stimola la produzione in *Mus musculus* di anticorpi neutralizzanti; si può pensare di affiancare questo vaccino edibile all'attuale terapia preventiva come booster per

implementare la risposta immunitaria. Infine si possono sfruttare semi transgenici che hanno il pregio di preservare molto bene le proteine al loro interno per lunghi periodi e in diverse condizioni ambientali. Il riso in particolare presenta altre caratteristiche vantaggiose come l'autofecondazione, che previene la perdita dei geni che codificano per le proteine del vaccino, e la grande resa in termini di prodotto; ad esempio gli allergeni proteici del cedro giapponese Cry j 1 e Cry j 2 sono stati espressi in riso e si è visto che, se ingerito da topi, è in grado di diminuire la risposta specifica contro gli allergeni, per cui di ridurre l'azione delle immunoglobuline E (IgE), la presenza di istamina e la proliferazione delle cellule T. (Rybicki, 2010)

La formulazione di vaccini edibili in organismi vegetali è promettente, ma deve essere ottimizzata sotto molti aspetti affinché si possa considerare efficace al pari della somministrazione parenterale.

c. Vaccini a subunità e *virus like particles* (VLPs)

Per ovviare al problema dell'espressione incostante di proteine d'interesse negli organismi vegetali edibili, sono stati testati approcci che coinvolgono organismi vegetali non edibili, come *N. tabacum*, per la sintesi di componenti vaccinali. È possibile sintetizzare in vegetali *virus like particles* (VLPs) simili a quelle contenute in vaccini noti e che risultano avere effetto immunogenico quando somministrate per via parenterale e proteine integre o subunità specifiche; la formulazione di vaccini basati su questo tipo di proteine richiede la combinazione con adiuvanti, sostanze che aumentano la stimolazione del sistema immunitario nei confronti dell'antigene cui viene associato, ma che possono scatenare effetti avversi come reazioni allergiche. I vaccini a subunità e le VLPs risultano molto efficaci contro le zoonosi: Medicago Inc., ad esempio, ha sviluppato più di 100 milioni di dosi di vaccino basato su VLP contro il ceppo influenzale H5. (Rybicki, 2010)

Durante la recente pandemia causata da SARS-CoV-2, coronavirus ad RNA con polarità negativa e dotato di pericapside, alcune aziende coinvolte nel settore delle biotecnologie vegetali hanno sviluppato piattaforme per la sintesi di proteine e VLPs efficaci per la prevenzione dell'infezione COVID-19.

Per quanto concerne la sintesi di vaccini a subunità, sono state individuate le proteine antigeniche di SARS-CoV-2 più immunogeniche su cui basare la formulazione: la proteina del nucleocapside N non è stata considerata in quanto è conservata nella famiglia coronavirus; le proteine del pericapside E e di membrana M presenti in SARS 1 e 2 generano una risposta immunitaria debole; la proteina spike S, coinvolta nel riconoscimento e legame del recettore delle cellule ospiti ACE2, si compone di una subunità transmembrana S2 presente nel 99% dei coronavirus e di una subunità S1 conservata nel 70% dei coronavirus, ma che presenta importanti differenze nel dominio di legame al recettore RBD

(*receptor binding domain*) che la rendono un ottimo target per la sintesi del vaccino. L'azienda Kentucky BioProcessing ha avviato un progetto, tutelato da segreto, basato sull'evidenza pregressa secondo cui l'iniezione in topo della proteina S1 del coronavirus della gastroenterite trasmissibile (TGEV) sintetizzata in *A. thaliana* ha generato risposta immunitaria con produzione di anticorpi anti-S1-TGEV. Un'altra nozione su cui si sono basati è quella secondo cui, note le sequenze geniche delle proteine E ed N del coronavirus dell'influenza stagionale, in sole 3 settimane si è stati in grado di sintetizzare un vettore basato sul virus del mosaico del tabacco TMV (*tobacco mosaic virus*) veicolato da *A. tumefaciens* per infiltrazione; la resa è di 200 mg di proteine ogni chilogrammo di foglie di tabacco fresche. Alla luce di queste conoscenze, la Kentucky BioProcessing è stata in grado di ideare un vaccino a subunità basato sulla proteina S1 o sul dominio RBD (non è un'informazione di pubblico dominio) con un segnale all'estremità N-terminale per la secrezione verso il sistema endomembranoso per favorire la glicosilazione. Non è chiaro se le differenze fra i glicani complessi presenti in *Homo sapiens* e negli organismi vegetali incida sull'efficacia del vaccino a subunità, ma è noto che i glicani ricchi in mannosio sono conservati negli eucarioti superiori. (Capell T., 2020)

I vaccini basati su *virus like particles* presentano numerosi vantaggi rispetto alle formulazioni canoniche: la dimensione del complesso facilita l'interazione con le cellule presentanti antigene; sono in grado di innescare la risposta del sistema immunitario adattativo; la loro struttura proteica ordinata funge da segnale di pericolo stimolando una forte risposta cellulare e umorale; sono sicure in quanto non sono virus replicanti o che rischiano la riattivazione della virulenza; infine sono disponibili in grandi quantità se si adotta l'approccio del *molecular farming*. L'impresa Medicago Inc. in passato era stata in grado di produrre in un mese più di 10 milioni di dosi di vaccino basato su VLPs contro il virus influenzale H1N1 sfruttando *N. tabacum* come bioreattore; durante la pandemia da COVID-19 hanno rivisto la piattaforma per adattarla alla sintesi di VLPs contro SARS-CoV-2. (Hager et al., 2022) L'azienda iBio (Newark, DE) ha sfruttato il sistema di produzione di loro proprietà, detto FastPharming per sintetizzare vaccini a base di VLPs in tabacco.

È evidente come farmaci preventivi basati su proteine virali e VLPs siano efficaci nel contrastare le infezioni; inoltre, se sviluppate in organismi vegetali, risultano una risposta veloce e versatile all'avvento di eventi pandemici. (Capell T., 2020)

4. Quando la prevenzione non è abbastanza

La prevenzione è il metodo più efficace per evitare la diffusione di malattie a carattere pandemico, ma spesso è difficile concretizzarla. Tralasciando gli aspetti relativi all'igiene, il mezzo più utilizzato per la prevenzione sono i vaccini, ma affinché questi abbiano un effetto positivo nel debellare una patologia virale è necessario raggiungere l'immunità di gregge o di gruppo. L'immunità di gregge (definizione ricavata dal magazine online della Fondazione Veronesi fondazioneveronesi.it/magazine) si traduce in un livello di copertura vaccinale, all'interno di un gruppo di individui, sufficiente affinché anche chi non ha ricevuto il vaccino (a causa di patologie o per scelta ideologica) sia al sicuro; spesso questa soglia varia dal 50% al 90% della popolazione a seconda della contagiosità della malattia. Il problema è che raggiungere e mantenere questa percentuale è difficile per diversi motivi. In primo luogo la disinformazione e la scarsa comunicazione fra gli scienziati e la popolazione ha permesso l'instaurarsi di ideologie complottiste inerenti i vaccini che ha incrementato la sfiducia di una parte minoritaria, ma cospicua, dei cittadini nell'efficacia della prevenzione. In secondo luogo, la produzione e distribuzione delle dosi necessarie per raggiungere lo scopo sono limitate: le strutture adatte alla sintesi di vaccini non sono in grado di sopperire alla richiesta mondiale in tempi brevi come quelli che ci si trova a fronteggiare durante una pandemia (spesso il virus diffonde più velocemente rispetto alle misure preventive); inoltre le infrastrutture, i mezzi (anche economici) e il personale necessario per il trasporto e per la somministrazione dei vaccini non sono presenti in tutto il mondo o in misura adeguata. (Capell T., 2020)

Per questi motivi la prevenzione vaccinale non è sufficiente per contrastare gli effetti pandemici: si rendono necessarie la produzione di kit diagnostici per discriminare la popolazione malata da quella sana e per controllare il progredire della pandemia (studi epidemiologici) e la produzione di farmaci per curare le persone infettate. In questo scenario si può ricorrere alla sintesi in vegetali di proteine con i metodi precedentemente citati, ma anche di anticorpi neutralizzanti e terapeutici che, se espressi in piante, assumono l'appellativo di "plantibodies". (M. B. A. Oldstone, 2017) Gli anticorpi monoclonali (AcM) sono anticorpi, ottenuti a partire da uno stesso clone con la tecnica del DNA ricombinante, in grado di riconoscere un antigene specifico. La capacità di legame specifico degli AcM, ideati per riconoscere porzioni dell'agente eziologico di una patologia, può essere utilizzata con due scopi principali: la sintesi di kit per la diagnosi della patologia e la formulazione di immunoterapie passive.

a. Kit diagnostici

Per gestire una malattia infettiva su larga scala è importante la diagnosi dei malati che consiste nella ricerca della presenza del virus all'interno

dell'organismo ospite per tenere sotto controllo il diffondere dell'infezione all'interno della popolazione, ossia studi di epidemiologia su cui basare le azioni sanitarie atte a sopprimere la pandemia. La diagnosi degli individui guariti si esplica attraverso la definizione del titolo anticorpale, cioè la quantità di anticorpi contro il patogeno presenti nell'organismo, utile a capire se si è sviluppata immunità.

La ricerca degli anticorpi si effettua prelevando il siero dei pazienti in remissione o guariti e in parallelo si sintetizzano proteine virali; si pongono a contatto siero e proteine ricombinanti e si osserva se si verificano fenomeni di agglutinazione. Su questo principio si basano i test sierologici: con l'approccio del *molecular farming* è possibile sintetizzare una grande quantità di proteine virali ricombinanti in poche settimane in una linea transgenica stabile, che però richiede anche anni per essere instaurata; sfruttando espressioni transienti in vegetali, i tempi si accorciano notevolmente (2-6 mesi). L'azienda Diamante Società Benefit (Verona, IT) durante la pandemia da COVID-19 ha ideato una piattaforma che sfrutta piante di tabacco per esprimere antigeni sintetici del virus, in particolare il dominio di legame al recettore RBD della subunità S1, da utilizzare in test ELISA per la rilevazione di anticorpi nel siero. (Capell T., 2020)

Per determinare la presenza del virus nell'organismo ospite si possono ricercare il genoma virale o le proteine virali.

Per quanto riguarda l'individuazione del corredo genetico virale in un paziente, il test più diffuso è la *polymerase chain reaction* (PCR) per il DNA e la *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) per l'RNA. Proseguendo con l'esempio di SARS-CoV-2 (coronavirus ad RNA), la presenza del virus viene ricercata con la RT-PCR: è un approccio facile da intraprendere nel momento in cui è nota la sequenza del genoma virale, in quanto è sufficiente sintetizzare una coppia di primer adatta affinché si possa eseguire la reazione di PCR. Quello che è venuto meno durante la pandemia è stato un controllo positivo universale utile a standardizzare i risultati ottenuti nei diversi centri diagnostici. Il John Innes Centre (G. Lomonossoff e H. Peyret) è stato in grado di sviluppare il suddetto reagente di controllo: si basa su VLPs derivate dal virus del mosaico del fagiolo dall'occhio CPMV (*Cowpea mosaic virus*) in cui viene inserito RNA artificiale equivalente al genoma di SARS-CoV-2 non replicante; il tutto viene prodotto e assemblato all'interno dell'organismo vegetale. Il prodotto così ottenuto risulta termostabile, per cui semplice da trasportare, e riproducibile, caratteristica necessaria affinché possa definirsi un reagente universale. (Capell T., 2020)

A proposito dell'individuazione di proteine virali in un paziente, innanzitutto è necessario conoscere le proteine strutturali che compongono il virus, individuare fra questa la più immunogenica e successivamente sviluppare un ligando che sia specifico per quell'antigene, ovvero un anticorpo. È assodato che con il *molecular*

farming si possano ottenere, con diversi metodi di espressione e in diverse piattaforme o ospiti, anticorpi di tipo differente. I vantaggi che offrono le biotecnologie vegetali sono relativi alla quantità ingente, la velocità di sintesi e la stabilità del prodotto, in un contesto in cui è ben noto come produrre anticorpi funzionali in piante. Tornando all'esempio della pandemia da COVID-19, una volta identificato il dominio RBD della subunità S1 come discriminante per la diagnosi della malattia, si procede con la sintesi di anticorpi monoclonali specifici contro SARS-CoV-2 sfruttando le cellule ibridoma. Ponendo a contatto gli anticorpi di sintesi con il siero prelevato da un paziente affetto, gli AcM legano le proteine virali e segnalano la presenza del virus nell'organismo. (Capell T., 2020)

b. Farmaci antivirali e immunoterapie monoclonali

Durante un evento pandemico risulta altrettanto necessario trovare una cura per gli individui che vengono infettati dal virus per diminuire il numero di decessi. Esistono due vie principali rappresentate dalla formulazione di farmaci antivirali e di immunoterapie attive e passive.

I farmaci antivirali sono composti di sostanze chimiche di sintesi o di semi-sintesi in grado di bloccare la replicazione virale o di impedire il propagarsi dell'infezione nell'ospite. Gli organismi vegetali producono spontaneamente lectine che sono proteine leganti carboidrati: si è osservato che sono in grado di inattivare una serie di microrganismi legando i glicani presenti sulla superficie del virus che così non è più in grado di instaurare un legame con il recettore di superficie presente sulla cellula ospite, portando all'arresto del propagarsi dell'infezione. La lectina di 121 amminoacidi Griffithsin, ad esempio, viene prodotta dall'alga rossa *Griffithsia* e funge da antivirale per il trattamento di HIV, Ebola, SARS e MERS; ha grande potenziale di inibizione e scarsa tossicità per le cellule umane; applicando il *molecular farming* è possibile sintetizzarne grandi quantità in poco tempo. (Capell T., 2020)

Per quanto concerne l'immunoterapia, si distingue un approccio attivo il cui intento è di stimolare il sistema immunitario dell'ospite, e un approccio passivo basato sull'iniezione di anticorpi che aggrediscono in modo specifico il virus per permettere all'immunità dell'ospite di reagire all'infezione prima che sorgano complicazioni o la morte. (Capell T., 2020) È stato dimostrato che si può sviluppare un'immunoterapia passiva basata su una piattaforma vegetale: è possibile sintetizzare un complesso immunitario in *Nicotiana benthamiana* per contrastare il Filoviridae ebolavirus (genoma a singolo filamento di RNA con polarità negativa e tasso di mortalità del 90%) che durante la sua insorgenza ha rappresentato un grande rischio per la sanità internazionale e che è tutt'ora una potenziale arma biologica. Sfruttando un sistema basato su replicone di geminiviridae si è in grado di ottenere l'immunocomplesso "EIC" *Ebola immune complex*. EIC è composto da una porzione del dominio extracellulare della

glicoproteina di Ebola GP (in particolare GP1) alla cui estremità C-terminale è legata la catena pesante dell'anticorpo monoclonale umanizzato 6D8 IgG in grado di riconoscere l'epitopo lineare di GP1 in modo specifico. Co-esprimendo nel vettore, introdotto nelle foglie di *N. benthamiana* per infiltrazione, la proteina di fusione e la catena leggera di 6D8 IgG si sintetizza un'immunoglobulina assemblata che forma un complesso facile da purificare (precipitazione con ammonio solfato e cromatografia di affinità con resina di proteine G). Attraverso una serie di test, è stato provato che il complesso EIC è in grado di legare e attivare il fattore del complemento c1q e che in topo è in grado di scatenare risposta immunitaria per la produzione di anticorpi anti-ebolavirus a livelli paragonabili a quelli dei vaccini basati su VLPs di GP. (W. Phoolcharoen, 2011) Come menzionato precedentemente, la sintesi di anticorpi in sistemi vegetali è una pratica nota: è possibile produrre anche anticorpi neutralizzanti, cioè in grado di proteggere la cellula ospite dall'infezione del patogeno attraverso la neutralizzazione dei suoi effetti biologici. L'istituto Fraunhofer IME (Schmallenberg, DE) ha ottenuto la licenza GMP dal governo tedesco per la sintesi di 2G12, un anticorpo semi-neutralizzante contro HIV, in tabacco e per testare la prima fase del trial clinico in uomo. È emerso che la produzione in riso risulta più versatile in quanto non solo permette la sintesi di 2G12 in grandi quantità, ma anche di due lectine antivirali. Nel 2014 l'azienda Mapp Biopharmaceuticals (San Diego, CA, USA), in collaborazione con la sua sezione commerciale LeafBio, ha ideato un cocktail di 3 anticorpi monoclonali neutralizzanti, detto ZMapp, con azione mirata contro Zaire ebolavirus, agente eziologico della pandemia insorta in Africa Occidentale quello stesso anno. Ha ottenuto dalla *Food and Drug Administration* (FDA) e dall'OMS l'approvazione per uso compassionevole in quanto, pur essendo un prodotto GM, si era dimostrato essere potenzialmente salvavita e non vi erano formulazioni alternative più valide. La dose di ZMapp necessaria per ogni paziente è di 10 mg, per cui si sono serviti di una piattaforma vegetale per lo sviluppo del farmaco per garantire una resa alta di prodotto. (Capell T., 2020) I risultati ottenuti da trial clinici randomizzati controllati sull'efficacia di ZMapp effettuati nel 2015 hanno evidenziato come questo cocktail di anticorpi trivalente sia promettente per trattare infezioni da Ebola, ma non sia ancora utilizzabile in quanto necessita di essere ottimizzato. Su 72 pazienti risultati positivi ad Ebola (diagnosi con RT-PCR) coinvolti nel trial (da Liberia, Sierra Leone, Guinea e Stati Uniti), di cui 71 valutabili, 21 sono deceduti: 13 di questi facevano parte del gruppo di controllo che ha ricevuto le cure standard a disposizione, mentre 8 appartenevano al gruppo che ha ricevuto le cure standard e 3 iniezioni intravenose di ZMapp (50 mg/kg di peso corporeo, somministrati ogni 3 giorni); in più non sono stati evidenziati effetti avversi preoccupanti, a ribadire la sicurezza garantita dall'uso

di piattaforme vegetali. Purtroppo il trial non ha ottenuto dati statisticamente solidi sull'efficacia di ZMapp nel contrastare Ebola e sono nate controversie circa la significatività di un trial clinico effettuato durante una pandemia. (R. T. Davery, 2016)

5. Risvolti etici del molecular farming

Il *molecular farming*, quindi l'uso di organismi vegetali come bioreattori, è un approccio promettente per la risoluzione dei problemi inerenti un evento pandemico, ma si riscontrano difficoltà di applicazione in quanto ci sono leggi cui sottostare e questioni etiche ancora dibattute.

Per quanto riguarda le normative in Italia e in Europa, l'utilizzo di organismi vegetali modificati con ingegneria genetica per la sintesi di piattaforme vaccinali, reagenti per kit diagnostici, antivirali e anticorpi immunoterapici deve sottostare alla Direttiva 2001/18/CE emanata dal Parlamento europeo e del Consiglio in materia di organismi geneticamente modificati (OGM). Il decreto non vieta la ricerca nel settore se condotta in ambienti adeguati ai livelli di sicurezza stabiliti, ma pone limiti alla commercializzazione dei prodotti contenenti OGM con lo scopo di preservare la sicurezza della popolazione e dell'ambiente. Trattandosi di prodotti destinati ad uso medico, i vaccini, i farmaci e in generale le proteine sintetizzate in organismi vegetali devono essere approvate dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) o dalla Commissione europea attraverso il rilascio dell'Autorizzazione all'Immissione in Commercio (AIC) che attesta l'efficacia e la sicurezza del prodotto nei confronti della popolazione e dell'ambiente. Previa concessione dell'AIC, vengono effettuati accertamenti di diverso tipo fra cui ecologici, agronomici e di biologia molecolare. (Fonte: Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana)

Le principali controversie del *molecular farming* riguardano aspetti legati all'uomo e all'ambiente. Alcune delle problematiche relative all'uomo sono il rischio sanitario legato agli allergeni presenti negli organismi vegetali e l'introduzione di resistenze antibiotiche in natura che può portare allo sviluppo di batteri multiresistenti. Per arginare questi rischi si può agire in diversi modi: onde evitare la contaminazione di coltivazioni destinate al consumo alimentare si possono utilizzare organismi vegetali non edibili come il tabacco; qualora sia necessario sfruttare piante commestibili, come per la sintesi di anticorpi monoclonali o di vaccini edibili, per evitare cross-contaminazioni si può ricorrere al contenimento fisico degli OGM e all'organizzazione della semina in tempi differenti e con strumenti diversi rispetto a quelli usati per i raccolti ad uso alimentare. Le serre e i fitotroni sono ideali per perseguire questo scopo e per ottenere prodotti di alta qualità, anche se indubbiamente i costi di mantenimento aumentano rispetto alla semina in campo aperto. Questi impianti devono essere ideati affinché i semi e il polline transgenici non escano al di fuori della struttura, insetti e polline non entrino nella struttura, le piante transgeniche siano etichettate in modo appropriato (sia palese quale tipo di modifica genetica ha subito), non avvenga impollinazione incrociata fra organismi transgenici e sia possibile sterilizzare in autoclave acqua e terreni

contaminati. Si rende necessario istituire un comitato di biosicurezza che supervisioni la serra garantendo che siano rispettate le norme di sicurezza fra cui l'uso dei dispositivi di protezione individuale (DPI) e la presenza di un sistema di ventilazione regolato e con filtri appositi. È compito del comitato fornire alle autorità internazionali i dati scientifici e di sicurezza (testata in condizioni controllate) necessari per la valutazione del rischio inerente il rilascio del prodotto GM ed eventualmente quali precauzioni si debbano adottare. Altri strumenti utili a ridurre la possibilità di propagazione di transgeni sono la riduzione transgenica, la trasformazione plastidiale e la sterilizzazione della parte maschile del fiore. Le problematiche concernenti l'ambiente si esplicano soprattutto nell'impatto che il *molecular farming* avrebbe sulle colture i cui prodotti sono destinati direttamente all'uso umano, fra cui la cross-impollinazione che porterebbe ai rischi precedentemente menzionati per la popolazione e la possibilità di trasferimento genetico orizzontale di transgeni ai microrganismi (eventi rari, ma da non escludere). Altre tecniche utilizzabili per evitare l'esposizione a prodotti GM farmacologicamente attivi sono l'espressione tessuto-specifica del gene selezionato, la trasformazione di cloroplasti (organelli ad eredità materna e che garantiscono alta resa di proteine ricombinanti) e le trasformazioni transienti ottenute con infezione virale, agroinfiltrazione o magnificazione (permettono l'espressione temporanea dei transgeni che non vengono ereditati dalla progenie). Risulta impossibile prevedere l'impatto che il *molecular farming* e la sua espansione avrebbero sull'ambiente nel lungo periodo: sicuramente se questa tecnica innovativa si diffonderà, bisognerà fronteggiare la quantità di residui di scarto con una gestione ben organizzata. Sarà necessario evitare che i rifiuti siano dispersi nell'ambiente e finiscano nel cibo di animali e umani o almeno non prima di essere sottoposti ad attenta valutazione che sarà da effettuare caso per caso. (K. I. Wani, 2022) Di seguito si riportano alcune situazioni in cui è avvenuta la contaminazione di piantagioni a scopo alimentare con materiale GM che hanno portato ad una moratoria negli USA sulla produzione di vaccini in vegetali edibili: nel 2002 campi di soia e mais presenti in due stati sono stati contaminati con semi di mais transgenico esprime una proteina del capsido di TGEV; nel 2004 un campo di avena è stato contaminato con mais transgenico destinato al consumo in allevamento. (Rybicki, 2010)

Le questioni etiche inerenti gli OGM nel settore agroalimentare e le preoccupazioni della popolazione riguardo questo tema si estendono anche alle piattaforme vegetali descritte nei capitoli precedenti: in particolare preoccupano le nuove patologie che questi farmaci potrebbero provocare e i nuovi inquinanti che, sfuggendo ai sistemi di sicurezza e alle procedure di purificazione, potrebbero danneggiare gli individui (K. I. Wani, 2022). Per separare il dibattito

sugli alimenti GM da quello sui biofarmaci, è bene ricordare che gli organismi vegetali sono utilizzati da millenni e in differenti culture come medicinali e che, a differenza dei vegetali destinati all'alimentazione, quelli per la produzione di farmaci entrerebbero in contatto con l'organismo umano un numero ridotto di volte; inoltre la possibilità di conservare la stabilità del prodotto per tempi prolungati permetterebbe il trasporto e la distribuzione anche in paesi in cui la coltivazione di OGM non è legale. Alle preoccupazioni riguardanti gli OGM, si aggiungono i danni provocati all'opinione pubblica a causa di notizie false che sostengono un'efficacia esagerata dei farmaci sintetizzati in vegetali GM, quando la realtà è che ci sono ottime premesse, ma sono necessari maggiori studi e ricerche prima di poter pensare di utilizzare nella quotidianità le formulazioni ottenute con il *molecular farming*. Riguardo questo aspetto, la scarsa comunicazione fra le realtà di ricerca, biosicurezza e commercio pongono grossi limiti al progresso di questo settore. Ad influenzare il pensiero della popolazione sono anche i governi e i media dei diversi paesi: è bene che queste due realtà interagiscano maggiormente con i tecnici specializzati nei diversi settori affinché possano essere consigliati nelle modalità di esposizione delle questioni scientifiche ai cittadini. Oltretutto le istituzioni hanno la possibilità di imporre obblighi vaccinali per l'accesso a specifiche strutture, ad esempio quelle scolastiche, nel proprio territorio e addirittura possono rendere necessario il passaporto vaccinale per l'accesso al suolo nazionale. (Veysel Kayser, 2021)

Volendo sopperire, almeno in parte, alla sfiducia instauratasi nell'opinione pubblica nei confronti del *molecular farming*, bisognerebbe pesare maggiormente le affermazioni riguardanti questo approccio innovativo, facendo comprendere i benefici che può portare alla società. La popolazione reputa immorale questo tipo di sperimentazioni in quanto si pensa che vengano svolte solo perché si è in grado di farlo grazie al progresso delle tecnologie e non perché sono soluzioni divenute necessarie. Basti pensare ai vantaggi che questo approccio garantisce in termini di disponibilità di biofarmaci economici ed in tempi brevi, anche per fronteggiare le future pandemie, ed aiuto ai paesi in via di sviluppo (con conseguenti vantaggi per la sanità globale) in cui la produzione e la conservazione, nonché il trasporto, di medicinali comporta costi che i governi locali non sono in grado di sostenere. (Veysel Kayser, 2021)

Esistono altre problematiche che sorgono nel momento in cui biofarmaci sperimentali sviluppati in vegetali ottengono permessi speciali per essere utilizzati in situazioni di emergenza, come è accaduto allo ZMapp, il cocktail di anticorpi semi-neutralizzanti Ebola. Durante la pandemia del 2014, 5 dosi di ZMapp erano state inviate dall'azienda Mapp Biopharmaceuticals in Africa per essere somministrate per uso compassionevole. Le difficoltà sono nate nel momento in cui bisognava stabilire se fosse il caso di iniettare un farmaco non

sottoposto a trial clinici in umano e, nel caso, chi avrebbe ricevuto quelle dosi. In particolare un caso fece scalpore in quanto fu deciso di somministrare lo ZMapp a due volontari americani, che così sopravvissero all'infezione, piuttosto che ad un medico africano che successivamente morì, il dottor Humarr Khan impegnato in prima linea nella lotta contro Ebola. Il fatto scatenò sommosse e sfiducia della popolazione nei confronti degli aiuti umanitari; alcuni addirittura negavano che il virus esistesse e sostenevano che gli occidentali fossero nel loro paese per far ammalare la popolazione e privarli dei propri organi. Questo, insieme alle usanze funebri dei locali che comportavano contatto fisico con il cadavere del defunto, rese ancora più difficile il contenimento dell'infezione. Tutt'ora ci si interroga sulla moralità della scelta presa in questa circostanza. (M. B. A. Oldstone, 2017)

Per promuovere un'innovazione eticamente responsabile è necessario spingere affinché vi sia maggiore collaborazione fra ricercatori, industrie, governi e cittadini. È importante anche instaurare un dibattito etico circa la necessità di informare o meno un paziente a proposito delle origini del farmaco o dell'alimento così che possa compiere una scelta sulla base delle sue conoscenze e preferenze. (K. I. Wani, 2022)

Riassumendo, i valori morali implicati nella questione del *molecular farming* sono: non maleficenza e beneficenza, giustizia sia in termini di accesso alle cure che in termini di ricompensi per gli sviluppatori delle piattaforme, responsabilità sostanziale e procedurale nella ricerca (trasparenza e vincolo fiduciario fra scienza e società). Si tratta, quindi, di effettuare un'analisi critica che evidenzii i rischi e i benefici complessivi di questo approccio, cercando di mitigare, ove possibile, i pericoli, senza privare gli scienziati del diritto alla libertà di ricerca.

6. Conclusioni

In un contesto, come quello moderno, in continua e rapida evoluzione si rende sempre più necessario essere pronti ad ogni evenienza, soprattutto in campo sanitario: da questo punto di vista il *molecular farming*, cioè l'espressione di proteine d'interesse in organismi vegetali attraverso le biotecnologie, è un approccio molto versatile. Permette il rapido sviluppo di piattaforme per la sintesi di vaccini per la prevenzione sia in campo medico che negli allevamenti a scopo alimentare; garantisce la possibilità di condurre studi epidemiologici utilizzando kit diagnostici con reagenti prodotti in piante; inoltre è possibile formulare farmaci antivirali e immunoterapie basate su proteine e anticorpi sintetizzati in piante. I prodotti appena elencati si sono dimostrati sicuri poiché non scatenano effetti collaterali significativi e facili da trasportare in quanto sono stabili a temperatura ambiente per cui possono essere dislocati sfruttando le stesse infrastrutture utilizzate per il trasporto degli alimenti. Gli organismi vegetali geneticamente modificati, soprattutto con trasformazioni transienti, garantiscono una produzione facilmente estendibile e massiva in tempi brevi, il che risulta vantaggioso nel fronteggiare l'insorgere di una pandemia, evento sempre più frequente. Poter sfruttare le piante è vantaggioso in quanto le specie finora utilizzate crescono in tutto il mondo e consentono di abbattere i costi di produzione di sostanze farmacologicamente attive anche quando sono coltivate in serra. Bisogna sottolineare che l'investimento in termini economici e di tempo aumenta nel momento in cui è necessario sottostare alle linee guida del GMP e quando si eseguono i necessari trial clinici. Tuttavia, se paragonato al costo attuale di produzione di farmaci, si può ottenere un risparmio non indifferente usando il *molecular farming*.

Indubbiamente vi sono degli aspetti da migliorare circa la pratica del *molecular farming*, fra cui aumentare la risposta immunitaria per ridurre il dosaggio necessario affinché la somministrazione sia efficace e, soprattutto per quanto riguarda i vaccini edibili, garantire una distribuzione uniforme nel vegetale e formulare adiuvanti orali. Per quanto riguarda gli aspetti di diritto e di etica, ci si trova a fronteggiare il problema delle colture OGM e della conservazione della biodiversità in termini, soprattutto, di sicurezza dell'uomo e dell'ambiente. Nella realtà moderna, l'opinione pubblica è molto rilevante in quanto influenza le decisioni prese da ogni singolo individuo: per promuovere l'accettazione e la commercializzazione di prodotti sintetizzati in vegetali sono necessarie maggiore comunicazione fra le diverse realtà e la definizione di standard per la valutazione dei rischi e la loro eventuale gestione.

L'approccio del *molecular farming* è sicuramente da implementare, ma è indubbio che le biotecnologie vegetali forniscano una soluzione promettente:

rendono possibile la sintesi di piattaforme che permettono, attraverso la variazione del target, di rispondere prontamente a futuri eventi pandemici.

Bibliografia

- A. S. Bernstein et al. (2022). The costs and benefits of primary prevention of zoonotic pandemics. *Science Advances*.
- T. Capell et al. (2020). Potential applications of plant biotechnology against SARS-CoV-2. *Trends in Plant Science*.
- K. I. Wani et al. (2022). Limitations, biosafety, ethics, regulatory issues in molecular farming in plants. *Plant Molecular Farming. SpringerBriefs in Plant Science*.
- M. B. A. Oldstone et al. (2017). ZMapp: the ethics of decision making. *Elsevier Inc*.
- D. M. Morens et al. (2020). Emerging pandemic diseases: how we got to COVID-19. *Cell*.
- N. Shahid et al. (2016). Plant-based oral vaccines against zoonotic and non-zoonotic diseases. *Plant Biotechnology Journal*.
- R. T. Davery et al. (2016). A randomized, controlled trial of ZMapp for Ebola virus infection. *The New England Journal of Medicine*.
- J. A. Roth (2011). Veterinary vaccines and their importance to animal health and public health. *Procedia in Vaccinology*.
- E. P. Rybicki (2010). Plant-made vaccines for human and animals. *Plant Biotechnology Journal*.
- V. Kayser, I. Ramzan (2021). Vaccines and vaccination: history and emerging issues. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*.
- W. Phoolcharoen et al. (2011). Expression of an immunogenic Ebola immune complex in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnology Journal*.