

Los sistemas vegetales como plataformas de producción de proteínas de interés para la industria farmacéutica

María Alejandra Álvarez

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Universidad Maimónides, CEBBAD - Carreras de Farmacia y Bioquímica, Hidalgo 775 piso 6º, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

* Autor a quien dirigir la correspondencia: alvarez.mariaalejandra@maimonides.edu

Resumen

La biotecnología vegetal logró armonizar los nuevos desarrollos relacionados con los sistemas productivos vegetales con la necesidad de proteínas recombinantes de la industria farmacéutica. La plataforma vegetal resultó una alternativa válida de producción principalmente por poseer la maquinaria adecuada para la síntesis proteica, incluyendo glicoproteínas y proteínas multiméricas. Dentro de las ventajas de estos sistemas se encuentran: la bioseguridad, pues no hay posibilidad de contaminación con patógenos, priones, oncogenes o endotoxinas; la facilidad de escalado, en el caso de los cultivos a campo, pues se realiza con bajos incrementos en costos; el desarrollo del proceso productivo en condiciones ambientales controladas, en el caso de los cultivos *in vitro*, pudiendo trabajarse en condiciones de Buenas Prácticas de Laboratorio y Buenas Prácticas de Manufactura y en el caso de la expresión transitoria, la rápida producción de proteínas terapéuticas. Una de las limitaciones de las proteínas producidas en vegetales es la diferencia en cuanto a la glicosilación respecto a las de origen animal. Esto ha logrado solucionarse mediante la inactivación de glicosiltransferasas específicas de plantas o su complementación con glicosiltransferasas animales heterólogas. Otra de las limitaciones para la explotación comercial de la producción de proteínas en plantas son sus bajos rendimientos. No obstante, se han desarrollado estrategias a nivel genético, del mecanismo de expresión (estable o transitoria), de las condiciones y del sistema de cultivo para incrementarlos. Así es como mediante transformación estable o transitoria de diferentes especies se ha logrado producir una amplia gama de proteínas recombinantes en cultivos agronómicos o cultivos *in vitro*. Proteínas funcionales de origen animal tales como anticuerpos, antígenos vacunales, citoquinas, hormonas de crecimiento, enzimas, biopolímeros y otras proteínas industriales han sido expresadas en especies tan diversas como *Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana*, *Daucus carota*, *Lactuca sativa*, *Lycopersicon esculentum*, *Solanum tuberosum*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Glycine max*, entre otras.

Plant platforms for producing recombinant proteins for the pharmaceutical industry

Summary

Plant biotechnology succeeded in combining new developments related to plant production systems with the need for recombinant proteins in the pharmaceutical industry. The plant platform turned out to be a valid production alternative mainly because it had adequate machinery for protein synthesis, including glycoproteins and multimeric proteins. Among the advantages of these systems are: biosafety, since there is no possibility of contamination with pathogens, prions, oncogenes or endotoxins; the ease of scaling up, in the case of field crops, as it is done with low cost increases; the development of the production process under controlled environmental conditions, in the case of *in vitro* cultures, being able to work under conditions of Good Laboratory Practices and Good Manufacturing Practices and the transitory expression, in the case of production of therapeutic proteins, which is done very quickly. One of the limitations of proteins produced in vegetables is the difference in glycosylation with respect to those of animal origin. This has been solved by the inactivation of plant-specific glycosyltransferases and/or their complementation with heterologous animal glycosyltransferases. Another limitation of the commercial exploitation of protein production in plants is its low yields. However, strategies have been developed at the genetic level, the expression mechanism (stable or transient), the culture conditions, and the culture system to increase them. This is how, through a stable or transient transformation of different species, a wide range of recombinant proteins has been produced in agronomic or *in vitro* cultures. Functional proteins of animal origin such as antibodies, antigens, cytokines, growth hormones, enzymes, biopolymers, and other industrial proteins have been expressed in species as diverse as *Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana*, *Daucus carota*, *Lactuca sativa*, *Lycopersicon esculentum*, *Solanum tuberosum*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Glycine max*, among others.

Palabras clave: proteínas recombinantes - cosecha molecular - biofarmacéutica - proteínas expresadas en plantas.

Key words: recombinant protein - molecular farming - biopharming - plant-made proteins.

Introducción

Las plantas sintetizan y acumulan una enorme cantidad de productos naturales de interés para la industria alimentaria, farmacéutica, textil, química, cosmética y perfumería, entre otras. En las últimas décadas, a estos compuestos se sumó la posibilidad de producir proteínas recombinantes en sistemas vegetales mediante la introducción de genes provenientes de otros reinos. Las proteínas recombinantes son proteínas foráneas expresadas en sistemas hospedantes utilizando herramientas de la ingeniería genética y son producidas en escala comercial mediante fermentaciones microbianas o cultivo de células animales. A estas plataformas tradicionales iniciales se sumaron luego otras plataformas alternativas tales como los cultivos de levaduras, de células de insectos, de células y órganos vegetales y los animales y plantas transgénicos. La elección entre una u otra plataforma se realiza en base a factores tales como la aplicación que tendrá de dicha proteína (en terapéutica, como reactivo de laboratorio y de diagnóstico, para la administración parenteral o uso externo, entre otros), la necesidad de modificaciones post-traducción específicas de las células animales para conservar la funcionalidad de la proteína, el costo del escalado para cubrir la demanda, las necesidades de purificación del producto final, entre otras. Este artículo será una breve sinopsis sobre la producción de proteínas recombinantes de interés para la industria farmacéutica en plataformas vegetales, incluyendo las plantas transgénicas cultivadas en condiciones confinadas o a campo y cultivos *in vitro* de células y órganos vegetales.

La plataforma vegetal y la industria farmacéutica

La industria farmacéutica requiere de proteínas recombinantes en cantidades tales que se dificulta cubrir con dicha demanda, particularmente frente a las necesidades abruptas de estas proteínas, como ocurre en el caso de las epidemias. La demanda creciente de estos agentes terapéuticos proyectada hacia el futuro cercano vaticina la saturación de los sistemas actuales de producción, lo que implica que dichos sistemas resultarán insuficientes. Las plataformas alternativas, tales como cultivos de células de insectos, animales transgénicos y sistemas vegetales, aparecen entonces como complementarias a las tradicionales. La elección de la plataforma productiva depende de varios factores, entre ellos las características de la proteína que se desea producir, las necesidades del mercado y los costos de producción. Cada una de estas plataformas presenta ventajas y desventajas relacionadas principalmente con el tiempo de producción, los costos operativos, el rendimiento de proteína, la contaminación con patógenos, la necesidad de modificaciones post-traducción y el marco regulatorio (Tabla 1). En el caso de las células animales éstas producen en general proteínas idénticas a las requeridas,

pero tienen el riesgo de contaminación con priones, patógenos u oncogenes, que hace que se requieran de etapas de purificación que incrementan los costos. Por otra parte, las bacterias, que se caracterizan por sus altos rendimientos de proteínas recombinantes sencillas, no pueden llevar a cabo los complejos procesos post-traducción típicos de las células eucariontes (glicosilación, plegado) limitando el espectro de proteínas recombinantes que pueden expresar. Además, requieren de etapas adicionales de purificación, pues las proteínas se suelen almacenar en cuerpos de inclusión o producen endotoxinas. En el caso de los vegetales, éstos poseen la maquinaria adecuada para la producción de proteínas animales, aunque lo hacen con ciertas modificaciones en los patrones de glicosilación, siendo capaces de producir proteínas complejas incluyendo glicoproteínas y proteínas multiméricas (Strasser y col., 2008; Álvarez, 2014; Buyel, 2018; Montero Morales y Steinkellner, 2018; Buyel, 2019; Shanmugaraj y col., 2020).

Ante este panorama la biotecnología vegetal combinó las necesidades de la industria farmacéutica (anticuerpos monoclonales) con las nuevas biomanufacturas de proteínas con el objetivo de obtener productos farmacéuticos de naturaleza proteica a precios razonables. Estos sistemas vegetales transgénicos alternativos están representados por los cultivos *in vitro* (células, tejidos, órganos) y por plantas enteras, obtenidos por ingeniería genética, capaces de producir proteínas homólogas o heterólogas específicas.

Transformación vegetal

La introducción de un gen o genes heterólogos de interés en las plantas puede realizarse utilizando procedimientos directos o indirectos. Dentro de los métodos directos los más comunes son los físicos (electroporación, biobalística), con una alta tasa de daño celular, y los químicos (mediados por PEG, fosfato de calcio y lípidos artificiales, entre otros).

Los métodos indirectos involucran la transferencia de ADN usando vectores tales como cepas de *Agrobacterium tumefaciens*, vectores virales o una combinación entre ambos. La transformación vegetal mediada por *A. tumefaciens* es una de las más utilizadas para la introducción de genes. Esta bacteria habita naturalmente en el suelo y tiene la capacidad de infectar plantas dicotiledóneas generando la enfermedad denominada "corona de agallas" (De la Riva y col., 1998). La característica más llamativa de esta infección es la transferencia de un fragmento de ADN particular (ADN-T) desde el plásmido Ti (*Tumor-inducing*) al núcleo de la célula vegetal. El ADN-T contiene principalmente dos tipos de genes, los oncogénicos, que codifican enzimas involucradas en la síntesis de auxinas

Tabla 1:- Características de las diferentes plataformas de expresión de proteínas recombinantes

| Características | Bacterias | Células animales | Levaduras | Células de insectos | Plantas |
|-------------------------------------|-------------|------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Manipulación | Simple | Altos | Simple | | Rápida |
| Costos | Bajos | Altos | Bajos | Altos | Bajos |
| Escalado | Sencillo | | Sencillo | | Sencillo |
| Plegamientos post-traducción | Incompleto | Adecuados | Similares, glicosilación limitada | Similares, glicosilación limitada | Similares, glicosilación limitada |
| Niveles de expresión | Alto | Alto | Medio | Medio | Bajo |
| Patógenos humanos | Sí | Sí | No | No | No |
| Endotoxinas | Sí | No | No | No | No |
| Marco regulatorio | Establecido | Establecido | - | - | Establecido |

y citoquininas, responsables de la formación del tumor, y los genes que codifican enzimas para la síntesis de opinas. Estos compuestos se forman por la condensación de aminoácidos y azúcares, y son en conjunto sintetizados y secretados por las células de la corona de agallas y consumidos por *A. tumefaciens*, como fuente de carbono y nitrógeno. Por fuera del ADN-T se localizan los genes encargados del catabolismo de las opinas, los genes involucrados en la transferencia del propio ADN-T desde la bacteria a las células vegetales (genes *vir*), y por último los genes involucrados en la conjugación entre bacterias (Zhang y col., 2015). El ADN-T ingresa a la planta y se integra al azar dentro del genoma vegetal por recombinación ilegítima a partir de micro-homologías entre el genoma vegetal y el ADN-T. Una vez que se integra la hebra simple de ADN, se activa el mecanismo de reparación de ADN de la planta y se sintetiza la hebra complementaria (De la Riva y col., 1998; Wolternik-van Loo y col., 2015). Una vez allí se expresan sus dos genes, el de las hormonas (oncogénico) que provoca un crecimiento descontrolado de las células vegetales, y el que induce a las células a producir grandes cantidades de opinas, una sustancia que la planta no puede aprovechar y la excreta. Las bacterias, que se encuentran en el espacio intercelular se nutren y multiplican en este nicho. Los plásmidos Ti se clasifican en base a las opinas que sintetizan y secretan las células que han sido infectadas por estos (De la Riva y col., 1998; Palacio-Bielsa y col., 2009). Los más estudiados son los de nopalina/agrocinopina (pTiC58 y pTiT37) y los de octopina/manopina (pTiB6 y pTi15955). Durante años se estudió el proceso de transferencia del ADN-T a las células vegetales demostrándose tres factores importantes para la práctica.

Primero, la formación del tumor involucra por un lado la transferencia del fragmento de ADN y por otro lado su integración y subsecuente expresión. Segundo, los genes contenidos en el ADN-T se transcriben únicamente en las células vegetales y no están implicados en el proceso de transferencia. Tercero, cualquier ADN foráneo situado entre los bordes específicos (derecho e izquierdo) puede ser transferido a las células vegetales sin importar su origen. Estos factores permitieron la construcción de sistemas de vectores y cepas bacterianas para lograr la transformación vegetal. Ejemplos de éstos son los vectores serie pGA, pCG, pCIT, pGPTV, pBEK2000, BiBAC y pGreen, los vectores Gateway y los vectores co-integrados (Schell y Van Montagu, 1977; Herrera-Estrella y col., 1983; De la Riva y col., 1998; Zambryski, 2013; Karimi y col., 2002).

Los vectores virales tienen la ventaja de ser más sencillos de manipular. Pueden ser sistemas de presentación de epítopo con el péptido dispuesto en la superficie viral (derivados de los virus CPMV, TMV, TBSV, PPV, AIMV) o de expresión de polipéptido con el transgen usualmente expresado con un péptido no fusionado en las células infectadas (derivados de CPMV, TMV, TBSV, PPV, PVX, TGMV). Se desarrolló un sistema de expresión, la magnificación, que combina el genoma de un vector viral vegetal con el plásmido binario de *Agrobacterium*. Esta estrategia está caracterizada por permitir la expresión de la proteína de interés en un lapso más breve que los anteriores, con rendimientos mayores, sin la intervención de virus salvajes, resultando ser muy versátil (Giritch y col., 2006; Klimyuk y col., 2014; Zischewski y col., 2016). La Tabla 2 resume las ventajas y desventajas de los diferentes sistemas de expresión de proteínas recombinantes en sistemas vegetales.

Tabla 2- Ventajas y desventajas de los sistemas de expresión estable y transitorio

| Sistema de expresión | Ventajas | Desventajas |
|----------------------|--|---------------------------------------|
| Nuclear | Escalado Bioseguridad Económico | Dosificación Tiempo Rendimiento |
| En coloroplastos | Rendimiento Estables Sin escapes del transgen | Limitado a algunas especies |
| Transitoria | Tiempo Alto rendimiento Costos No se originan OGM | Estabilidad de producción |

Transformación estable

En el año 1983 se informó a cerca de la expresión funcional de un gen foráneo luego de reemplazar los genes *vir* del T-ADN por el gen de una proteína heteróloga (Herrera-Estrella y col., 1983). Este fue el punto de partida para la expresión de proteínas recombinantes usando como vector a *Agrobacterium*. La transformación nuclear mediante *Agrobacterium* es la estrategia tradicional para la producción de proteínas recombinantes en plantas. El gen para la proteína de interés se encuentra usualmente bajo el control de un promotor constitutivo fuerte, como el del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S). En ese caso, la proteína se expresa en toda la planta, pero usualmente se extrae de las hojas por proveer de mayor biomasa respecto a los restantes órganos vegetales. En la célula, la proteína recombinante puede ser dirigida hacia una localización subcelular específica como el retículo endoplásmico (RE), el citoplasma o el apoplasto, por la adición de señales adecuadas. Una vez realizada la transformación se debe seleccionar la línea que alcanza los niveles mayores de expresión para conducir el proceso productivo. La transformación estable es un proceso que lleva tiempo y en muchos casos los niveles de expresión no resultan competitivos respecto de las otras plataformas disponibles.

Otra estrategia en uso es la transformación de cloroplastos mediante la inserción del ADN foráneo por recombinación homóloga en el genoma cromosomal, produciéndose así cientos de copias del transgen y, por lo tanto, altos rendimientos de la proteína deseada. En este sistema no se presenta silenciamiento génico y se pueden incorporar varios transgenes en operones y co-exresarlos desde un único promotor como un ARNm policistrónico. Se informaron altos niveles de producción (hasta 72 % de proteína total soluble (PTS)) (Ruhlman y col., 2010) de algunas proteínas recombinantes (Maliga, 2002; Jin y Daniell, 2015). Algunos inconvenientes son una expresión limitada a proteínas no glicosiladas, la inestabilidad de la proteína y la baja expresi-

ón en los tejidos no verdes. Una de sus ventajas es que la herencia materna reduce la posibilidad de transmisión del transgen a través del polen (Daniell y col., 1998). Se han expresado enzimas, anticuerpos, antígenos y otras proteínas de interés para la industria farmacéutica con niveles de expresión que oscilan entre 4 al 18 % PTS (Zhang y col., 2017), no obstante, ninguna proteína obtenida mediante este sistema de producción ha alcanzado aún el mercado.

Expresión transitoria

Inicialmente la transformación transitoria fue usada para probar la eficiencia de los constructos diseñados para expresar genes y para validar la actividad de proteínas recombinantes recientemente expresadas. Debido al alto rendimiento de proteína, a que no genera organismos genéticamente modificados (OGM) y a que permite la rápida co-expresión de diferentes genes, esa estrategia se transformó en una plataforma atractiva para producir biofármacos. Los sistemas de expresión transitoria, mediada por recombinación viral o vectores vegetales binarios, se están usando cada vez más debido a la elevada velocidad de producción, altos rendimientos de proteína y a la facilidad de cumplimentar aspectos regulatorios pues no se trabaja, en sentido estricto, con sistemas vegetales genéticamente modificados. Durante este proceso, los genes foráneos se introducen en general en el mesófilo de hojas de plantas intactas por infiltración al vacío usando *Agrobacterium* como vector del/los gen/es de interés. La producción de la proteína recombinante (basada en la expresión extracromosomal del gen en la célula vegetal) es iniciada dentro de las 24 horas de realizada la introducción del gen y continúa por varios días (mediada por *Agrobacterium*) o varias semanas (mediada por virus) dependiendo del vector y de la proteína. Aunque es posible

la integración cromosomal, ésta ocurre a una frecuencia considerablemente menor comparada con el número de células que expresan de manera transitoria el gen de interés (Circelli y col., 2010; Shelduki, 2008). Otra ventaja de este sistema es que permite la co-expresión rápida de múltiples genes (Medrano y col., 2009). Las plantas así tratadas se cultivan de manera confinada en invernáculos (Circelli y col., 2010), no obstante, es necesario contar con invernáculos de dimensiones considerables, infraestructura de infiltración, procesamiento *ad hoc* y etapas de purificación adicionales para remover las endotoxinas derivadas del *Agrobacterium* utilizado. Se han utilizado especies vegetales diversas, como por ejemplo, *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae), *N. benthamiana* Domin (Solanaceae), *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Brassicaceae), *Solanum tuberosum* L. (Solanaceae), *Phaseolus* sp. (Leguminosae) y *Lactuca sativa* L. (Compositae) (De Muynck y col., 2010). Se ha calculado que en un sistema de expresión transitoria se alcanzan rendimientos entre 4 y 20 veces mayor al de su contraparte estable (usando el promotor CaMV35S) (Medrano y col., 2009). Con vectores virales se suelen obtener rendimientos mayores que con *Agrobacterium*, alcanzándose por ejemplo niveles de hasta 5 mg/g en el caso de GFP (green fluorescent protein) (Marillonnet y col., 2004). Sin embargo, al usar vectores virales la expresión del gen de interés se suele alcanzar a partir de los 14 días de la infección. Se han desarrollado sistemas de expresión combinados denominados Genaware®, MagnIcon® y Geminivirus technology, que permitieron producir por ejemplo α -tricosantina y lipasa ácida lisosomal humana (Genaware), antígeno de hepatitis B y partículas tipo virus Norwalk y antígenos F1 y V de *Yersinia pestis* (MagnIcon), subunidades de cadena pesada y liviana del anticuerpo monoclonal 6D8 contra el virus del Ébola GP1 (Geminivirus technology). En ocasiones con el objetivo de incrementar los rendimientos se co-expresan supresores virales del silenciamiento génico (por ejemplo, P19 del *Artichoke mottled crinkle virus* - AMCV) (Circelli y col., 2010; Laguia Becher y col., 2019). También se han desarrollado sistemas de agroinfiltración automatizados que permiten trabajar en gran escala y en Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) (Chen y col., 2013; Buyel, 2018). Una experiencia prometedora fue el uso de una plataforma vegetal transitoria a gran escala como una rápida respuesta al brote pandémico de influenza. La proteína H5 tipo viral (VLP) fue expresada por agroinfiltración en *A. thaliana* (D' Aoust y col., 2010; Hendin y col., 2017) obteniéndose aproximadamente 25 kg de biomasa de hoja al sexto día post infiltración. Usando esta tecnología Medicago Inc. probó una vacuna experimental contra la nueva cepa (A/H1N1) que apareció en 2009, cuya inmunogenicidad fue probada en ratones y demostró su eficacia y velocidad de respuesta en los ensayos clínicos (Hodgins y col., 2019; Pillet y col., 2019). En 2014 se desarrolló una vacuna contra Rotavirus en *N. benthamiana* (Pêra y col., 2015). Mediante la magnifi-

cación (MagnIcon®) que combina el genoma de un vector viral vegetal con el plásmido binario de *Agrobacterium* se alcanzaron rendimientos de 60 μ g/g de hoja fresca de la proteína recombinante H5HA-1 de influenza (Yusibov y Mamedov, 2010). Del mismo modo, Mapp Biopharmaceutical Inc. USA produjo una droga experimental ZMapp® para el tratamiento de la infección por el virus del Ébola por expresión en *N. benthamiana* de un cóctel de tres anticuerpos monoclonales quiméricos. En este caso además se realizó la glicoingeniería de *N. benthamiana* mediante el *knock down* de β -1,2-xilosiltransferasa y α -1,3-focosiltransferasa específicas de vegetales (Strasser y col., 2008; Qiu y col., 2014).

En el caso de una situación pandémica esta plataforma transitoria permitiría producir altas cantidades, suficientes como para cubrir buena parte de la demanda. En el caso del coronavirus (COVID-19) también podría ser una plataforma adecuada para producir rápidamente la proteína necesaria como, por ejemplo, antígenos virales, proteínas antivirales, para ser usados como reactivos, vacunas de emergencia (vacunas a subunidad SARS-CoV-2 y partículas tipo virales) u otro biofármaco necesario y también para ser usados en inmunoterapia pasiva (Shanmugaraj y col., 2020).

Las compañías Medicago (Canadá), Kentucky BioProcessing (KT, USA) y iBio (USA) están en carrera para desarrollar vacunas potenciales para COVID-19 en plantas (Capell y col., 2020). Estos sistemas son usados a escala industrial, por ejemplo, en el Fraunhofer Center for Molecular Biotechnology (Newark, DE), Medicago Inc (Quebec, Canadá), Texas A&M (College Station, TX) y Kentucky Bi-Processing LLC (Owensboro, KY), donde éstos últimos han desarrollado plantas en las que se trabaja en BPM.

Glicosilación

Un aspecto importante a tener en cuenta cuando se desea utilizar la plataforma vegetal para producir proteínas recombinantes es la diferencia en la glicosilación de las proteínas entre células vegetales y animales. El núcleo central de la molécula es semejante en ambas, pero hay diferencias significativas en los residuos de ácido siálico y β -(1,4)-galactosa típicos de los animales, y los de β -(1,2)-xilosa y α -(1,3)-fucosa típicos de las plantas (Bosch y col., 2013). En las células eucariontes el ensamblado de moléculas complejas, como los anticuerpos, es asistido por chaperonas que median el plegamiento y la formación de puentes disulfuro, mientras que la adición de N-glicanos es llevada a cabo por glicosiltransferasas específicas. La N-glicosilación usualmente afecta la estabilidad, solubilidad, plegado y actividad biológica de la proteína. Las primeras etapas de la síntesis proteica son similares en plantas y animales y tienen lugar en el retículo endoplasmático (RE). La proteína sigue su ruta a través del RE y el aparato de Golgi, donde sufre la remoción o adición de residuos de azúcar. El proce-

so en las plantas y los animales difiere cuando la proteína es transferida al aparato de Golgi. En las plantas una β -(1,2)-xilosa es unida a un residuo de manosa del núcleo y una α -(1,3)-fucosa se une a una N-acetilglucosamina proximal. También las plantas carecen de residuos de β -(1,4) galactosa terminales. Es por esto que la N-glicosilación representa limitaciones en el uso de las proteínas recombinantes producidas en las plantas y se considera como el mayor inconveniente para el uso de este tipo de moléculas en terapia humana por posibles reacciones inmunogénicas. No obstante, no existen evidencias de efectos adversos en humanos relacionados con este tema en los ensayos clínicos realizados hasta ahora (Jin y col., 2008; Tusé y col., 2015). Se han utilizado diferentes estrategias para optimizar los perfiles de N-glicosilación tales como la inactivación de glicosiltransferasas específicas de plantas o su complementación con glicosiltransferasas humanas heterólogas (Steinkellner y Castilho, 2015; Montero-Morales y Steinkellner, 2018) de modo de alcanzar la actividad biológica y la vida media deseada. En cuanto a los O-glicanos, en las proteínas vegetales están primariamente unidos a residuos de hidroxiprolina y serina. En las células animales, los O-glicanos son del tipo de los de la mucina que se sintetizan en el aparato de Golgi en una serie de pasos independientes. Se demostró que las plantas pueden expresar O-glicoproteínas complejas como LTBMUC1 (*E. coli* subunit B enterotoxin: *H. sapiens* mucin1 tandem repeat-derived peptide fusion protein), con las características de la O-glicosilación de animales. LTBMUC1 se expresó en *N. benthamiana* por transformación transitoria y estable usando *A. tumefaciens* y co-expresando GalNAc-T2 humana, el transportador UDPGlcNAc/UDPGalNAc de *Caenorhabditis elegans*, y la UDP-GlcNAc 4-epimerasa de *Yersinia enterocolitica*. LTBMUC1 aparece también decorada con C-glicanos específicos de las plantas unidos a los residuos de hidroxiprolina (Daskalova y col., 2010). Recientes estudios mostraron que la Hyp-O glicosilación específica de plantas podría ser una alternativa a la PEGilación para aumentar la vida media de proteínas terapéuticas humanas; sin embargo, resta realizar aún más estudios relativos a la posible inducción de inmunogenicidad y alergenicidad en humanos (Gomord y col., 2010). Usando estas estrategias se ha logrado producir glicoproteínas recombinantes "humanizadas" con patrones de glicosilación con gran homogeneidad demostrando así que los sistemas vegetales son plataformas versátiles para la producción de proteínas "glicomejoradas" (Donini y Marusic, 2019).

Proteínas recombinantes producidas en plantas de interés para la industria farmacéutica

Existen numerosos artículos referidos a la expresión de proteínas recombinantes funcionales en plantas incluidos anticuerpos monoclonales, antígenos vacunales, enzimas terapéuticas, proteínas de la sangre, citoquinas, factores de crecimiento y hormonas de crecimiento, tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro* (De Muynck y col., 2010; Xu y col., 2012;

Álvarez, 2014). Los avances técnicos han permitido la transformación de una gran variedad de especies incluyendo algunas no convencionales como *Medicago truncatula* Gaertn. (Leguminosae), que tiene la ventaja que produce estructuras de glicanos más homogéneas. En el mercado, ProdiGene Inc. comercializa avidina (Hood y col., 1997), β -glucuronidasa (Witcher y col., 1998) y tripsina (Woodard y col., 2003).

Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales (mAb) son uno de los grupos de biofármacos más relevantes por su especificidad de unión a diferentes moléculas blanco y su estabilidad tanto *in vivo* como *in vitro* (Donini y Marusic, 2019) existiendo una creciente demanda que no puede ser rápidamente cubierta por las plataformas productivas más comunes. Su producción en sistemas vegetales ha sido el foco de mucha investigación ya que resultarían competitivos con la ventaja adicional que no tienen el riesgo asociado de portar patógenos animales. Se ha calculado que el costo de producción de anticuerpos monoclonales en plantas transgénicas oscila en 100 €/g (Buyel, 2017) lo que es comparable al costo promedio de producción en células CHO que es de 50-100 €/g (Lim y col., 2010). Desde que se informó por primera vez la expresión de anticuerpos en plantas (Hiatt y col., 1989) se han expresado anticuerpos completos o sus fragmentos. Inicialmente las cadenas pesadas y livianas de inmunoglobulinas se clonaban separadamente. Las plantas transformadas resultantes se cruzaban y algunas de las plantas de la progenie expresaban las cadenas ensambladas como anticuerpos funcionales. Más adelante se logró expresar ambas cadenas en un solo evento obteniéndose plantas que expresaban al anticuerpo completo funcional (De Muynck y col., 2010). A partir de entonces se han producido de este modo muchos anticuerpos monoclonales usando tanto *Agrobacterium* como vectores virales para llevar a cabo transformación estable o transiente. Las especies vegetales más utilizadas son *Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, *Lemna minor* L. (Araceae), *Lactuca sativa*, *Solanum tuberosum*, *Zea mays* L. (Poaceae), entre otras. Algunos de los fragmentos de anticuerpos expresados son el fragmento de unión a antígeno (Fab) conteniendo uno de los dos sitios idénticos de combinación de la inmunoglobulina, el fragmento bivalente simple (F(ab')₂) conteniendo dos sitios de combinación, fragmentos que consisten solamente en las regiones variables de las cadenas pesada y liviana (Fv) que retienen la capacidad de unirse al antígeno, fragmentos variables de simple cadena (scFv) que consisten en los dominios VL y VH unidos por un péptido flexible manteniendo la capacidad de unión a antígeno, y anticuerpos de dominio simple (VHH) de los camélidos. Además, las plantas son la única plataforma viable no animal para la producción de anticuerpos secretores (IgAs) (Paul y Ma, 2011). El primer anticuerpo en ingresar en estudios clínicos en Europa

fue el anticuerpo P2G12 producido en tabaco transgénico para usar como microbicida contra infecciones por HIV (Ma y col., 1995). En Estados Unidos el anticuerpo CaroRx® (IgA secretora) empleado para el tratamiento de caries dentales, expresado en tabaco, pasó la fase II de estudios clínicos (Weintraub y col., 2005; Juárez y col., 2016). Otros anticuerpo que se han expresado exitosamente y se encuentran en estudios clínicos son la avicidina, una IgG contra la molécula de adición epitelial (EpCAM), destinada al tratamiento de varios cánceres refractarios (colon, pulmón, próstata), el anticuerpo 2G12 anti-HIV1 que se expresan en maíz (Gavilondo y Larric, 2000) con rendimientos de hasta 75 mg/kg de semilla (Rademacher y col., 2008) y el conjunto de anticuerpos monoclonales expresados en *N. benthamiana* contra el virus del Ébola (Qiu y col., 2014; Strasser y col., 2008).

Antígenos Vacunales

Las plantas también expresan inmunógenos antigénicos que pueden usarse para formular vacunas. La producción de vacunas comestibles fue propuesta en los años 1980 pero llevó muchos años probar el concepto. Actualmente existen algunas vacunas con antígenos producidos en plantas que se encuentran en estudios clínicos para ser usados como vacunas comestibles o por administración parenteral o tópicamente. La subunidad B de la toxina del cólera, la primera vacuna formulada con una proteína recombinante obtenida por transformación de cloroplastos, se acumuló hasta en un 4-10 % de proteína total soluble en las hojas de tabaco. La toxina de la difteria, el fragmento C del tétanos (TetC), y la subunidad S1 no tóxica de la toxina pertussis (PTX S1) se expresaron en plantas de tabaco con bajo contenido alcaloidal y en cultivos de células de zanahoria. La secuencia codificante se colocó bajo el control de los promotores fuertes RbcSI (tabaco) o CaMV35S (zanahoria), en el vector binario pBINPlus con el gen *nptII* para la selección con kanamicina. Los antígenos se produjeron en hojas de tabaco o en suspensiones celulares de zanahoria y luego de la extracción y purificación se usaron para formular una vacuna que se inyectó a ratones BALB/c. Se desencadenó una respuesta humoral fuerte con anticuerpos antígeno-específicos luego de la exposición a toxoide pertussis, tétanos o difteria (Brodzik y col., 2009). La glicoproteína E2, principal inmunógeno de la diarrea viral bovina se expresó de manera transitoria y estable en tabaco. Los extractos de las hojas de plantas transformadas transitoriamente se utilizaron para formular una vacuna experimental que desencadenó una respuesta inmune con anticuerpos neutralizantes específicos (Nelson y col., 2012). Asimismo, el fragmento de anticuerpo scFv contra la metaloproteínasa BaP1 del veneno de *Bothrops asper* Garman (Crotalinae - Viperidae) en *N. benthamiana* de manera transitoria y estable (Gomes

y col., 2019). Se estudió también el uso de varias especies para la producción de vacunas comestibles, por ejemplo, tomate (*Solanum lycopersicum* L. -Solanaceae-) contra la malaria, banana (*Musa x paradisiaca* L. -Musaceae-) para hepatitis (HBsAg), alfalfa (*Medicago sativa* L. -Leguminosae-) para expresar Eeg95-EgA31 de *Echinococcus ganulosus*, zanahoria (*Daucus carota* L. -Apiaceae-) para desarrollar vacunas experimentales contra HIV, *Escherichia coli* y *Helicobacter pylori*, papa (*S. tuberosum*) contra hepatitis (HBsAg) y arroz (*Oryza sativa* L. -Poaceae-) contra hepatitis (HBsAg) y *Ascaris suum* (Thanavala y col., 2005; Kurup y Thomas, 2020). Una gran ventaja de estas llamadas "vacunas comestibles" es que induce la respuesta inmune de mucosas, por lo que son candidatos importantes las enfermedades que se previenen con inmunidad de mucosas. Las vacunas MucoRice-CTB® y MucRice ARP1® poseen el antígeno CTB de la toxina B del cólera y el dominio variable del fragmento de anticuerpo de cadena pesada de rotavirus que se acumulan en semillas de arroz. Ambas vacunas protegen mediante la inducción tanto de inmunidad de mucosa como sistémica (Nochi y col., 2007; Tokuhara y col., 2013; Kiyono y Azegami, 2015). Una desventaja potencial de este tipo de vacunas es la dificultad en controlar la dosis y que ésta se mantenga consistente, ya que puede diferir de fruto a fruto, de planta a planta o de generación en generación. Para sortear este inconveniente se podría extrapolar a las vacunas comestibles la estrategia exitosa utilizada por Protalix Co. que usa células de zanahoria liofilizadas conteniendo el anti-TNF o la enzima glucocerebrosidasa para su administración oral y de Interberry que expresa -interferón canino en frutillas (*Fragaria x ananassa* (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier -Rosaceae-) que luego se incorporan dentro del alimento animal balanceado (Testa y col., 1997).

Otras proteínas de interés farmacéutico

Además de antígenos y anticuerpos, es posible expresar en plantas otras proteínas como enzimas, inhibidores de enzimas, factores de la coagulación, citoquinas y hormonas. Algunos ejemplos son el péptido sintético antimicrobiano D4E1 que se expresó en tabaco. Sus extractos crudos resultaron inhibitorios para *Aspergillus flavus* y *Verticillium dahliae*, mientras que las plantas transformadas fueron resistentes a *Colletotrichum destructivum*. También dos epitopes del virus del papiloma humano, HPV16 E7 y HPV16 L2, fueron expresados transitoriamente en *N. benthamiana* (Čeřovská y col., 2008). La somatotrofina humana se acumula hasta en un 7 % de proteína total soluble mediante transformación plasmídica y 10 % de proteína total soluble en el apoplasto (Gils y col., 2005), mientras que la seroalbúmina humana se ha expresado tanto de manera estable como transiente en *N. benthamiana* y *N. tabacum* cv Xanthi y Samsun (Sedeghati y col., 2020). El factor de coagulación humano IX (hFIX) se expresó

mediante biobalística en semillas de *Glycine max* (L.) Merr. (Leguminosae) alcanzándose niveles de hasta 0,23 % (0-8 g kg⁻¹ de semillas) de proteína total soluble y permaneció estable y funcional por hasta 6 años mantenida a temperatura ambiente (Cunha y col., 2011). Se expresó también un precursor (pFIIa) de la serin proteasa -trombina en *N. benthamiana* de manera transitoria y estable. Los niveles de expresión por transformación transitoria con señal de direccionamiento hacia el retículo endoplasmático resultaron 10 veces superiores (0,21 % p/p) a los alcanzados en suspensiones celulares (Laguia Becher y col., 2019).

Sistemas de producción

La producción de proteínas recombinantes se puede encarar desde dos diferentes enfoques. Por un lado, se puede realizar la producción en cultivos a campo, pues como existe la infraestructura instalada es sencillo realizar el escalado aumentando el número de hectáreas cultivadas. Por el otro lado, los cultivos pueden realizarse de manera confinada como, por ejemplo cultivos verticales, hidropónicos, en invernáculo, *in vitro* en biorreactores.

Producción en cultivos a campo

En el caso de los cultivos a campo, una de las mayores ventajas es que el escalado puede alcanzarse aumentando el área cultivada, lo que conduce a una producción potencial de cientos de kilogramos de proteínas purificadas por año. Luego de la cosecha se siguen una serie de etapas para la extracción y purificación hasta llegar al uso de las proteínas puras como ingrediente activo farmacéutico. Por otro lado, existe la desventaja de la duración del proceso, la inestabilidad en el rendimiento y calidad del producto, la dificultad de trabajar bajo Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en las primeras etapas del proceso, la susceptibilidad a pestes y enfermedades, el riesgo de contaminación con agroquímicos o fertilizantes y los riesgos de transferencia de genes a cultivos convencionales, por lo que se requiere trabajar bajo regulaciones específicas para organismos genéticamente modificados que varían de un país a otro (Álvarez, 2014). Dentro de las ventajas está el hecho de que no se requiere de una infraestructura costosa y la capacidad de escalar para alcanzar la demanda es rápida. No obstante, existen riesgos de polinización cruzada (Stoger y col., 2002) que en aquellos casos en que se verificaron llevaron a la destrucción total de los cultivos (Moon y col., 2020). Es por esto que es necesario seguir reglamentaciones estrictas (Ruf y col., 2007; Svab y Malinga, 2007; Breyer y col., 2009; McPherson y col., 2009). La información referente al cultivo de plantas transgénicas en la Argentina se puede encontrar en la página web del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca: https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/bioteecnologia/marco_legal/

Cuando la proteína expresada se acumula en hojas la especie más utilizada es el tabaco, por las ventajas que presenta relacionadas con la gran cantidad de biomasa producida y su susceptibilidad a la transformación (Tremblay y col., 2010). El primer ensayo clínico realizado para una proteína recombinante fue una variante del anticuerpo secretor Guy's13 producido en hojas de tabaco por Planet Biotechnology Inc. (Ma y col., 1998; Kaiser, 2008). Como ya se dijo, la transformación genética del tabaco es sencilla, además es un cultivo que no se encuentra dentro de la cadena alimentaria, produce mucha biomasa productiva y es una de las plataformas de producción de proteínas recombinantes más estudiada. Se han desarrollado variedades de tabaco con bajo contenido de nicotina y alcaloides que permiten sortear la potencial toxicidad que podrían tener los productos (Menassa y col., 2001). Además del tabaco se usan otras especies de buen desarrollo foliar como *Lactuca sativa*, *Medicago sativa*, *Trifolium* sp., entre otras. La expresión de proteínas recombinantes en hojas ha sido exitosa para la expresión de una enorme variedad de proteínas como ser anticuerpos, vacunas, citoquinas, hormonas de crecimiento e industriales (Sharma y Sharma, 2009). Una de las limitaciones del direccionamiento de las proteínas recombinantes a las hojas es la necesidad de un procesamiento inmediato luego de la cosecha para asegurar la estabilidad y calidad del producto. El rendimiento en las hojas está asociado a variables que impactan el medio ambiente (factores bióticos y abióticos) por lo que debe analizarse la producción en condiciones controladas (por ejemplo, invernáculos) sobre todo cuando la aplicación de la proteína recombinante será para la industria farmacéutica. En el caso de la expresión en semillas, la principal ventaja es su estabilidad durante el almacenamiento a temperatura ambiente con mínima pérdida de actividad de la proteína. En este caso la expresión está dirigida a las semillas a través de una secuencia señal apropiada. En las semillas, las proteínas protegidas de la degradación proteolítica alcanza niveles de expresión altos (7-10 % de proteína total soluble). La mayoría de las semillas usadas para expresar proteínas recombinantes se encuentra en la cadena alimenticia (*Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare*) lo que demanda seguir estrictos protocolos y documentar cada paso del proceso. Algunas de las proteínas expresadas de esta manera son la hormona de crecimiento humano y el factor IX de coagulación en semillas de *G. max* (Cunha y col., 2011). La extracción de las proteínas desde semillas se ha mejorado por la fusión de la proteína recombinante a oleosinas que se acumulan en cuerpos oleosos. Dentro de las compañías líderes en esta área se encuentra SemBioSys Genetics (Calgary, Canada) que ha desarrollado una plataforma de fusión de la proteína recombinante a oleosinas que se acumulan en cuerpos lipídicos de *Carthamus tinctorius* L. (Compositae). Esta tecnología ha permitido producir a un costo excepcionalmente bajo insulina humana en semillas de *C. tinctorius* con niveles mayores al 1 % de proteína total con un rendimiento de 2-4 kg por hectárea (Moloney y col.,

2009) habiéndose demostrado su equivalencia con la insulina humana (Boothe y col., 2009). Otro ejemplo exitoso es el de la avidina transgénica, producida por Prodigene y comercializada por Sigma-Aldrich para su uso como reactivo de laboratorio. Se expresa de manera estable en semillas de maíz con rendimientos superiores al 2 % (Hood y col., 1997).

En cultivos confinados

Debido al marco regulatorio muchos cultivos que expresan proteínas recombinantes son mantenidos en sistemas confinados (Kozai y col., 2005). Las ventajas de este sistema de producción son que el crecimiento se realiza en condiciones controladas, la calidad de los cultivos es uniforme, libre de pestes y patógenos, existe protección frente a las condiciones ambientales adversas, el área de cultivo en estantes es amplia y hay un control del crecimiento vegetal. Si además la proteína se expresa de manera transitoria los riesgos ambientales desaparecen.

Los sistemas de producción confinada pueden ser: en invernáculo (incluyendo hidropónicos) e *in vitro* (suspensiones de células vegetales y raíces transformadas).

En invernáculo

Los invernáculos son bastante utilizados pues permiten ajustar el escalado sin incrementos exagerados de costos. De esta manera se producen proteínas cuya expresión se logra de manera estable o transitoria. La compañía Fraunhofer IME, trabajando bajo BPM, produce P2G12 en tabaco transgénico (estudios clínicos etapa 1) (Paul y col., 2014), la subunidad B modificada de la toxina del cólera en arroz para elaborar una vacuna oral (MucoRice-CTB) contra el cólera (Kashima y col., 2016), y el factor IX de coagulación fusionado al carrier CTB en lechuga (Su y col., 2015). ORF Genetics produce factores de crecimiento libres de endotoxinas y citoquinas en granos de cebada (Magnusdottir y col., 2013) los que se usan en la formulación de Bioeffect®, EGF y ISOKINE®. En tomate se expresa el antígeno F1-V de la peste bubónica (Matsuda y col., 2009, 2010, 2012). Hokus Co. comercializa InterBerry α® con interferón canino (CaIFN-α) recombinante expresado en frutillas para el tratamiento de la gingivitis en perros y los estudios realizados hasta ahora demostraron que es también aplicable para gatos (Tabayashi y Matsumura, 2014; Yamaki y col., 2020).

En el caso de los cultivos hidropónicos, estos sistemas garantizan un rápido crecimiento, en condiciones controladas y protegidas y se pueden adaptar tanto para expresión transitoria como estable en invernáculos o cuartos de cultivo. Pueden operarse todo el año, rinden varias cosechas anuales y tienen una buena relación costo-producción. La compañía Terrasphere desarrolló sistemas hidropónicos de alta densidad que pueden usarse durante todo el año para producir grandes cantidades de plantas transformadas transitoriamente y por ende grandes can-

tidades de proteínas recombinantes (Bourgoin y Charron, 2003). Los altos rendimientos alcanzados hace a estos sistemas competitivos respecto a las otras tecnologías en términos de calidad, costo y escalabilidad.

Cultivos *in vitro*

Los sistemas de producción *in vitro* vegetales (suspensiones celulares, cultivos de raíces transformadas) se caracterizan por que son independientes del clima, calidad del suelo, estacionalidad, longitud del día y clima, se desarrollan de manera confinada en frascos agitados o en biorreactores, las condiciones del medio de cultivo están bien definidas y controladas, no hay riesgo de contaminación con patógenos vegetales ni con agroquímicos, pueden conducirse trabajando bajo BPM y BPL durante todas las etapas del proceso y la purificación del producto es más simple (Alvarez, 2014; Chen y Davis, 2016; Shanmugaraj y col., 2020). Esto es de gran relevancia pues más del 50 % del costo total de producción del proceso es debido a la etapa de extracción y purificación de la proteína lo que hace crítica la operación de *down stream processing* (DSP) (Martínez y col., 2005; López y col., 2010; Xu y Dolan, 2011; Schillberg y col., 2013). La primera proteína humana expresada en suspensiones celulares de *N. tabacum* fue la seroalbúmina humana y desde entonces se han expresado hormonas, anticuerpos, antígenos vacunales, citoquinas, proteínas de la sangre, entre otras. (Sijmons, 1990; Huang y McDonald, 2009). Un cuello de botella para la explotación comercial de la producción de proteínas en plantas son los bajos rendimientos. Para alcanzar niveles de producción competitivos debe maximizarse la eficiencia de todas las etapas del proceso productivo, desde la expresión del gen pasando por el desarrollo del cultivo hasta el (DSP) para la purificación de la proteína (Tabla 3). Se deben considerar varios factores, algunos de ellos son generales y aplican también para la producción en sistemas no confinados y otros son específicos de los cultivos *in vitro*. Entre los primeros se encuentran la posibilidad de actuar a nivel transcripcional por selección del promotor que mejor se ajuste a las necesidades (fuerte, inducible) y el uso de secuencias que modulan la expresión génica (enhancers, activadores, supresores), a nivel traduccional por optimización de las regiones no traducidas (UTR) 5' y 3' y por diseño de codones (por ejemplo, vegetalización de codones), a nivel pos-traduccional dirigiendo la expresión y acumulación de la proteína a un compartimento subcelular con bajos niveles de actividad proteolítica (ER, cloroplastos, entre otros), dirigiendo la proteína hacia la ruta secretora para ser colectada en el medio de cultivo (por ejemplo, en cultivos *in vitro*), co-expresando la proteína con un inhibidor de proteasa, o expresando la proteína recombinante como proteína de fusión con péptidos que se expresan de manera estable en elevada cantidad. Entre los segundos se encuentra la elección del sistema que se va a usar (suspensión, raíces transformadas), la optimización de la composi-

Tabla 3- Estrategias utilizadas para incrementar rendimientos de proteínas recombinantes en sistemas vegetales

| Etapa | Estrategia |
|---|--|
| Transcripción | <ul style="list-style-type: none"> • Desarrollo de promotores fuertes, duplicados, híbridos. • Uso de promotores inducibles • Uso de <i>enhancers</i>, activadores o represores |
| Traducción | <ul style="list-style-type: none"> • Diseño de codones |
| Post-traducción | <ul style="list-style-type: none"> • Direccionamiento de las proteínas nacientes a compartimentos subcelulares como el retículo endoplasmático o cloroplastos • Co-expresión con inhibidores de proteasas, cofactores, supresores de silenciamiento génico • Expresión como proteínas de fusión a un péptido estable de alto nivel de expresión |
| Cultivos <i>in vitro</i> (suspensiones celulares, raíces transformadas) | <ul style="list-style-type: none"> • Optimización de la composición del medio de cultivo • Suplemento de agentes estabilizantes de proteínas • Secreción al medio de cultivo • Remoción <i>in situ</i> de las proteínas expresadas |
| Cultivos en biorreactor | <ul style="list-style-type: none"> • Selección o mejoramiento del diseño del biorreactor • Selección de la estrategia de cultivo (cultivo en batch, batch alimentado, continuo) |

ción del medio de cultivo, el tipo de biorreactor y el modo de operación (Huang y McDonald, 2009). Es importante destacar que más del 50 % del costo total de la producción se encuentra en la extracción y purificación de la proteína por lo que las operaciones de *downstream processing* (DSP) son críticas (Buyel y Fischer, 2014). Aunque los costos de purificar proteínas desde sistemas vegetales es comparable al de los sistemas de cultivos microbianos y animales, los costos de capital necesarios para iniciar la producción comercial en planta y la potencial "economía de escala" aporta ciertas ventajas clave (Xu y Dolan, 2011). Sin embargo, los costos de DSP se pueden reducir sensiblemente si la proteína se libera al medio de cultivo. En este sentido, se puede inducir la vía secretora empleando señales de secreción o empleando agentes permeabilizantes (López y col., 2010). Una práctica frecuente es la adición de estabilizadores de proteína (gelatina, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, albúmina) al medio de cultivo. El agregado de polivinilpirrolidona (PVP) y seroalbúmina humana, muestra ciertas limitaciones a nivel del *upstream* tal como formación de espuma (HAS), y a nivel del *downstream* por una reducción de la eficiencia de unión en cromatografía en columna (PVP). También los agentes osmóticos (manitol, inositol) que inhiben la disrupción celular tienen una influencia positiva sobre la acumulación de proteínas recombinantes (López y col., 2010). Agentes de cubrimiento (por ejemplo, Pluronic F127) que evitan la adsorción de la proteína recombinante a las superficies de los frascos también se ha demostrado que aumentan los rendimientos (Álvarez, 2014). Debido a la acción de las proteasas presentes en el extracto vegetal es usual el agregado de inhibidores de

proteasa (EDTA, leupeptina, PMSF, entre otros). Por otro lado, también se utilizan oleosinas para incrementar rendimientos simplificando el *down stream processing*. La combinación de ultrafiltración y cromatografía fue usada para purificar un anticuerpo recombinante monoclonal humano anti-*Pseudomona aeruginosa* del tipo IgG1 serotipo O6ad con un alto grado de remoción de impurezas y la recuperación completa del anticuerpo. Se incluyó en ese caso un proceso de ultrafiltración de cascada en dos etapas (un módulo de 50 kDa y un módulo de fibra hueca de 50 ó 100 kDa MiniKros) seguido de un procedimiento de cromatografía en dos etapas (Yu y col., 2008). Para facilitar el aislamiento y la purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad a columnas de níquel, a veces se incluye en el constructo una secuencia de 6 histidinas (His6-tag). Otra estrategia es producir proteínas de fusión tipo polipéptidos de elastina (ELPylation) para aprovechar la agregación/precipitación reversible, temperatura dependiente de los ELPs y evitar las engorrosas y caras etapas cromatográficas. Esta estrategia se usó, por ejemplo, para la expresión de proteína de tela de araña en el ER de tabaco y papa (Hauptman y col., 2015). La selección del diseño del biorreactor es crucial (convencional, mangas plásticas, entre otros) así como el modo de operación (batch, batch alimentado, continuo). Se han desarrollado diferentes tipos de biorreactores para cultivar suspensiones celulares, incluyendo de tipo *air-lift*, columna de burbujeo, de membrana, de tambor rotatorio, tanque agitado, reactor *wave* y combinaciones entre ellos (Holland y Buyel, 2018). La productividad volumétrica de proteína recombinante en ellos oscila entre 4,5 - 7,7 mg/l a 100 - 247

mg/l. En los reactores de inmersión temporaria (RITA), que son tan utilizados en micropropagación pues permiten obtener una abundante biomasa, se ha producido el fragmento C de la toxina tetánica (8 % PTS) y la proteína A de superficie de *Borrelia burgdorferi* (7,6 % PTS). En reactores tipo *air-lift* se ha producido, en embriones somáticos de ginseng siberiano (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. -Araliaceae-) la subunidad B de la toxina lábil al calor de *E. coli*, con un rendimiento de 0,36 % PTS (Kang y col., 2006). Protalix desarrolló un biorreactor flexible de polietileno que ha permitido a la compañía coreana NBM producir proteínas en arroz que se secretan al medio ambiente para la formulación de INNokine® y INNozyme®, especialidades medicinales que se caracterizan por ser libres de suero, de componentes de origen animal y de endotoxinas y que se usan como bio-reactivos, ingredientes en cosmética, entre otros (Moon y col., 2020). Una limitación importante que tienen los cultivos *in vitro* y que es particularmente importante en los biorreactores, es el riesgo de contaminación que está presente durante toda la manipulación del cultivo. Todas las etapas se deben realizar en esterilidad, pues un pequeño error puede eliminar un cultivo o resultar en la pérdida de un lote completo. Esto incrementa los costos y se ha calculado que la producción de 1 kg de grano con proteína transgénica cuesta U\$S 0,20 pero su producción en reactor alcanza valores de hasta U\$S 200 debido a todos estos factores. Recientemente se han desarrollado biorreactores descartables, como alternativa a los tradicionales alcanzándose rendimientos de 75-85 % de anticuerpo M12 humano puro (95 % pureza) en suspensiones celulares de tabaco BY-2 (Eibl y col., 2008; 2010). Se han realizado también operaciones semi-continuas en dos etapas, una de crecimiento y otra de expresión, para la producción de butirilcolinesterasa (BChE) en suspensiones de arroz con rendimientos de hasta 1,6 mg BChE/l (Corbin y col., 2016). Se desarrolló recientemente una nueva estrategia denominada de “paquetes celulares” que consiste en agrofiltrar las células de la suspensión una vez eliminado el medio de cultivo para luego realizar la búsqueda y selección de las líneas de mayores niveles de expresión trabajando así en microescala. Mediante este mecanismo se ha logrado alcanzar rendimientos de 50-100 mg/kg los que resultan comparables a los de la planta (Rademacher y col., 2019). En la tabla 4 se mencionan los rendimientos de algunas proteínas recombinantes producidas en diferentes sistemas vegetales.

En el año 2012, la FDA aprobó la primer droga producida en suspensiones celulares, Eleyso®, constituida por α -taliglucersa, forma activa recombinante de la enzima lisosómica β -glucocerebrosidasa y que es producida en suspensiones celulares de zanahoria (Grabowski y col., 2014; Pastores y col., 2014; Loh y Yusibov, 2017). “Eleyso” es usada en terapia de reemplazo para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher y es producida por Protalix Biotherapeutics (Fox 2012, Mor 2015). En octubre del año 2015, por un acuerdo con Protalix BioTherapeutics, la compañía Pfizer obtuvo los derechos para su venta en todo el mundo. En

Latinoamérica se comercializa bajo el nombre de Uplyso® y en Brasil con el nombre comercial de *Bio-Manguinhos al-fataliglicerase*, por un acuerdo de transferencia tecnológica con la Fundação Oswaldo Cruz. Este logro demostró la competitividad de esta plataforma para producir proteínas de alto valor agregado (Yusibov y Rabindran, 2008; Jin y Daniell 2015; Tekoah y col., 2015; Santos y col., 2016). Otras proteínas producidas en suspensiones celulares son el Factor XII-A, interleukinas humanas, el anticuerpo 14D9, la enzima α -galactosidasa A (Fabrazyme) para el tratamiento de la enfermedad de Fabry en suspensiones celulares de tabaco (Kizhner 2015), α -1 antritripsina en suspensiones celulares de arroz (McDonald y col., 2005; López y col.; 2010) y el anticuerpo monoclonal bevacizumab en arroz (Chen y Davis, 2016). Fraunhofer IMA ha recibido la licencia para producir el anticuerpo 2G12 del virus del HIV en suspensiones celulares de tabaco para realizar estudios clínicos (Ma y col., 2015). La USFDA ha aprobado la vacuna recombinante contra la enfermedad viral Newcastle producida en cultivos celulares de tabaco sin nicotina (Vermij y Waltz, 2006). En *D. carota* se han expresado antígenos vacunales contra sarampión, HBVm HIV, *Yersinia pestis*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, entre otros (Rosales-Mendoza y Tello-Olea, 2015). En el caso del *Oryza sativa*, se han expresado hGM-CSF (Shin y col., 2003), hormona de crecimiento humana (Kim y col., 2008), VEGF165 humana (Chung y col., 2014), tripsina bovina (Kim y col., 2011), pepsinógeno C humano (Islam y col., 2018). En arroz el uso del sistema promotor 3D de α -amilasa que se activa por privación de azúcar (Lu y col., 1998) permite sortear el problema de los bajos niveles de expresión. Las compañías como Fraunhofer (Alemania), Kentucky BioProcessing (USA), Medicago (Canadá) y Protalix Biotherapeutics (Israel), entre otras, cuentan con el *know-how* y las instalaciones que les permite avanzar hacia los ensayos clínicos necesarios para la aprobación por las agencias regulatorias de medicamentos de las proteínas que producen.

Un caso particular es el de las raíces transformadas, o raíces en cabellera. Éstas se obtienen por infección de plantas con *Agrobacterium rhizogenes*, que se caracteriza por portar un plásmido inductor de raíces (Ri). La integración del T-DNA que se encuentra en este plásmido en el genoma vegetal resulta en la diferenciación y el desarrollo de raíces neoplásicas en el sitio de infección, llamadas *hairy roots*. Estas raíces transformadas se caracterizan por un crecimiento indefinido *in vitro* con alta estabilidad genética. Es posible desarrollar raíces transformadas a partir de semillas de plantas transgénicas que expresan proteínas recombinantes. Las raíces transformadas acumulan las proteínas en su biomasa o las secretan permitiendo una recuperación más económica y en condiciones bien definidas desde un medio de cultivo con bajo contenido proteico. La rizosecreción permite la producción continua de proteínas y su recuperación desde el medio

de cultivo sin requerimiento de lisis celular durante la extracción (Gurusamy y col., 2017; Gutiérrez-Valdes y col., 2020) seguida de una cromatografía de afinidad (Lonoce y col., 2018). Una limitación que tienen estos cultivos para desarrollarse en biorreactores clásicos es su crecimiento filamentosos, con muchas ramas. Para superar este inconveniente se diseñaron nuevos biorreactores, como el reactor con niebla (*mist-reactor*) que ofrece un estrés hidrodinámico bajo con alta transferencia volumétrica de oxígeno. La primera proteína de interés farmacéuti-

co producida en raíces transformadas fue el anticuerpo anti-*Streptococcus mutans* mAb Guy's 13 que se secreta al medio de cultivo (Wongsamuth y Doran, 1997). En raíces transformadas también se han expresado anticuerpos recombinantes (como el 14D9), enzimas, antígenos, factores de crecimiento, inmunomoduladores, interleukina-12, acetilcolinesterasa humana y rhEPO y en raíces transformadas de tabaco (Martínez y col., 2005; Xu y col., 2012; Häkkinen y col., 2014; Gurusamy y col., 2017, Lonoce y col., 2018).

Tabla 4:- Rendimiento de algunas proteínas recombinantes expresadas en diferentes especies y sistemas vegetales

| Especie | Proteína | Sistema | Rendimiento | Referencia |
|---------------------------|--|--|---|---|
| <i>Solanum esculentum</i> | α 1-timosina | Cotiledón hipocótilo | 6 μ g/g PF | Chen y col., 2009 |
| <i>Oryza sativa</i> | Lactoferrina humana | | 25 % proteína total soluble | Huang y col., 2002 |
| <i>Oryza sativa</i> | Lisozima humana | | 45 % PTS | Nandi y col., 2002 |
| <i>Lactuca sativa</i> | Subunidad B toxina del cólera (CTB) | Cotiledones | 0,24 % p/p PTS | Kim y col., 2006 |
| <i>Lactuca sativa</i> | Proinsulina | Cotiledones | 0,13 % | Mohebodini y col., 2014 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | Antígenos vacuolales de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (CTB) | Cloroplastos | 7,5 % PTS | Floss y col., 2010 |
| <i>Lactuca sativa</i> | CTB | | 8,5 μ g/g | Lakshmi y col., 2013 |
| <i>Solanum tuberosum</i> | HBsAg | Semilla | 0,056 % PTS | Thanavala y col., 2005 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | Subunidad B <i>Vibrio cholerae</i> | Cloroplastos | 4,1 % PTS | Daniell y col., 2001 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | Antígeno protector <i>Bacillus anthracis</i> , CTB (cólera) | Cloroplastos | 4-5 % proteína total de hoja | Chan y col., 2016 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | Antígeno F1-V <i>Yersinia pestis</i> | Cloroplastos | 3,68 % PTS | Arlen y col., 2008 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | Antígeno vacunal polio VP1 | Cloroplastos | 4-5 % proteína total de hoja | Chan y col., 2016 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | E2 | Hojas (transitoria), Nuclear | 20 μ g g ⁻¹ PF | Nelson y col., 2012 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | Pretrombina | Hojas (transitoria), Suspensiones celulares | 17 μ g g ⁻¹ 0,25 μ g mL ⁻¹ | Laguia Becher y col., 2019 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | Anticuerpo catalítico 14D9 | Suspensiones celulares, Raíces transformadas | 2,31 μ g ml ⁻¹ 64,03 μ g ml ⁻¹ | López y col., 2010 Martínez y col., 2005 |
| <i>N. benthamiana</i> | scFv contra la metaloproteinasas, BaP1 del veneno de <i>Bothrops asper</i> | Suspensiones celulares, Callos | 83 μ g/g (en biomasa) 71,75 mg/L (en medio de cultivo) | Gomes y col., 2019 |
| <i>Oryza sativa</i> | HSA | Callos | 62 μ g/g | |
| <i>Oryza sativa</i> | hGH | Callos | 45 mg/l | Liu y col., 2015 |
| <i>Oryza sativa</i> | hGH | Callos | 57 mg/l | Kim y col., 2008 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | rhEPO | Raíces transformadas | 185,48 μ g/g PF | Gurusamy y col., 2017 |
| <i>Oriza sativa</i> | γ -interferón | Callos | 699,79 ng/g PF | Chen y col., 2004 |
| <i>Helianthus annuus</i> | Hormona de Crecimiento Humana (hGH) | Callos | 0,02 % | Barta y col., 1986 |
| <i>Oryza sativa</i> | HSA | Callos | 76,5 mg/l | Huang y col., 2005 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | Hidrofobin | Suspensiones celulares | 5 mg/g PF | Joensuu y col., 2010 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | Hemaglutinina (HA) | Hojas (transitoria) | 846 μ g/g PF | Fujiuchi y col., 2016 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | rhEPO | Hojas (transitoria) | 20 μ g/mg PTS | Gurusamy y col., 2017 |

Conclusiones

Luego de más de 30 años de la obtención de la primera especie vegetal que expresa una proteína recombinante no quedan dudas de que las plataformas vegetales son idóneas para la producción de proteínas recombinantes, aunque la producción de cada una de ellas es un desafío particular. Estos sistemas vegetales presentan ventajas tanto económicas como técnicas. Las diferentes estrategias de expresión (nuclear, en cloroplastos, estable, transitoria) poseen características únicas que les permiten encarar la producción de productos blanco diversificados. En lo que respecta a la producción en escala agrícola, el costo de capital de equipamiento es bajo respecto al gran costo de capital destinado a la infraestructura necesaria para producir las proteínas por métodos tradicionales. La facilidad de escalado es una ventaja que puede ser aprovechada por los bajos incrementos en costos que el escalado que implica. Sus ventajas intrínsecas pueden ser desplazadas por los tiempos prolongados de desarrollo, variación en el rendimiento y calidad del producto, la posibilidad de contaminación con agroquímicos y fertilizantes, el impacto de pestes y enfermedades y la dificultad para aplicar BPM en los estadios tempranos de producción. Además, la producción a campo representa un desafío único pues se debe evitar la transferencia de genes a cultivos convencionales durante el desarrollo de los cultivos y por los costos asociados a la extracción de la proteína de interés. Los sistemas de expresión transitoria debido a su flexibilidad, rapidez de producción, altos rendimientos y ventajas económicas resultan muy adecuados para la rápida producción proteínas terapéuticas como vacunas y anticuerpos. Además, la adopción de la tecnología de expresión transitoria parece ser la manera de agilizar el aspecto regulatorio. Otra alternativa atractiva es la producción en cultivos *in vitro*, pues permite la conducción del proceso en condiciones de buenas prácticas de manufactura (BPM) y de laboratorio (BPL). Asimismo, por trabajarse en un recipiente cerrado se reducen notablemente los problemas relacionados con los marcos regulatorios, por lo que resulta una plataforma consistente para la producción de biofármacos de aceptación tanto industrial como regulatoria. Estos menores requerimientos regulatorios compensan en parte sus mayores costos de producción. Varias compañías cuentan con el *know-how* e instalaciones que les permiten conducir procesos productivos usando las diferentes estrategias disponibles. Muchas de ellas ya han introducido compuestos al mercado y otras se encuentran en la etapa de los ensayos clínicos previos para su aprobación y comercialización.

Referencias

- Alvarez, M.A. (2014). *Plant Biotechnology for Health. From Secondary Metabolites to Molecular Farming*. Springer Verlag, Switzerland.
- Arlen, P.; Singleton, M.; Adamovicz, J.; Ding, Y.; Davoodi-Semirromi, A.; Daniell, H. (2008). "Effective plague vaccination via oral delivery of plant cells expressing F1-V antigens in chloroplasts." *Infect. Immun.* 76: 3640-3650.
- Barta, A.; Sommergruber, K.; Thompson, D.; Hartmuth, K.; Matzke, M.; Matzke, A. (1986). "The expression of a nopaline synthase-Human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue." *Plant Mol. Biol.* 6: 347-357.
- Boothe, J.; Nykiforuk, C.; Kuhlman, P.; Whelan, H.; Pollock, W.; Clark, S.; Yuan, S.; Kumar, R.; Murray, E.; Visser, F. (2009). "Analytical characterization, safety and clinical bioequivalence of recombinant human insulin from transgenic plants". En: 69th Scientific Sessions; Abstract; (Vol. 5). Arlington County, VA, USA: American Diabetes Association.
- Bosch, D.; Castilho, A.; Loos, A.; Schots, A.; Steinkellner, H. (2013). "N-glycosylation of plant-produced recombinant proteins". *Curr Pharm Des.* 19: 5503-5512.
- Bourgoin, E.; Charron, P. (2003). "Orbital hydroponic or aeroponic agricultural unit". US7181886B2 Patent.
- Breyer, D.; Goossen, M.; Herman, P.; Sneyers, M. (2009). "Biosafety considerations associated with molecular farming in genetically modified plants". *J. Med. Plants Res.* 3: 825-838.
- Brodzik, R.; Spitsin, S.; Pogrebnyak, N.; Bandurska, K.; Portocarrero, K.; Andryszak, K.; Korpowski, H.; Golovkin, M. (2009). "Generation of plant-derived recombinant DTP subunit vaccine". *Vaccine* 27: 3730-3734.
- Buyel, J.; Fischer, R. (2014). "Downstream processing of biopharmaceutical proteins produced in plants". *Bioengineered* 5(2): 138-142.
- Buyel, J.F.; Twyman, M.; Fischer, R. (2017). "Very-large-scale production of antibodies in plants: the biologization of manufacturing". *Biotechnol Adv* 35: 458-465.
- Buyel, J. (2018). "Plant molecular farming—Integration and exploitation of side streams to achieve sustainable biomanufacturing". *Front. Plant Sci.* 9: 1893.
- Buyel, J. (2019). "Plant Molecular Farming-Integration and Exploitation of Side Streams to Achieve Sustainable Biomanufacturing". *Frontiers in Plant Science* 9, doi: 10.3389/fpls.2018.01893
- Capell, T.; Twyman, R.; Armario-Najera, V.; Ma, J.; Schillberg, S.; Christou, P. (2020). "Potential applications of plant biotechnology against SARS-CoV-2". *Trends Plant Sci.* 25: 635-643.
- Čeřovská, N.; Hoffmeisterová, H.; Pečenková, T.; Moravec, T.; Synková, H.; Plchová, H.; Velemínský, J. (2008). "Transient expression of HPV16 E7 peptide (aa 44–60) and HPV16 L2 peptide (aa 108–120) on chimeric potyvirus-like particles using Potato virus X-based vector". *Protein Expression and Purification* 58(1): 154-161.
- Chan, H.; Xiao, Y.; Weldon, W.; Oberste, S.; Chumakov, K.; Daniell, H. (2016). "Cold chain and virus-free chloroplast-made booster vaccine to confer immunity against different poliovirus serotypes". *Plant Biotechnol. J.* 14: 2190-2200.

- Chen, T.L.; Lin, Y.L.; Lee, Y.L.; Yang, N.S.; Chan, M.T. (2004). "Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures". *Transgenic Res.* 13: 499-510.
- Chen, Y.; Wang, A.; Zhao, L.; Shen, G.; Cui, L.; Tang, K. (2009). "Expression of thymosin 1 concatemer in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits". *Biotechnol. Appl. Biotechnol. Appl. Biochem.* 52: 303-312.
- Chen, Q.; Lai, H.; Hurtado, J.; Stahnke, J.; Leuzinger, K.; Den, M. (2013). "Agroinfiltration as an effective and scalable strategy of gene delivery for production of pharmaceutical proteins." *Adv Tech Biol Med.* 1: 103.
- Chen, Q.; Davis, K. (2016). "The potential of plants as a system for the development and production of human biologics". *F1000Research* 12: e1587.
- Chung, N.D.; Kim, N.S.; Van Giap, D.; Jang, S.H.; Oh, S.M.; Jang, S.H.; Kim, T.G.; Jang, Y.S.; Yang, M.S. (2014). "Production of functional human vascular endothelial growth factor165 in transgenic rice cell suspension cultures". *Enzym. Microb. Technol.* 63: 58-63.
- Circelli, P.; Donini, M.; Villani, M.E.; Benvenuto, E.; Marusic, C. (2010). "Efficient *Agrobacterium*-based transient expression system for the production of biopharmaceuticals in plants". *Bioeng Bugs* 1: 221-224.
- Corbin, J.M.; Hashimoto, B.I.; Karuppanan, K.; Kyser, Z.R.; Wu, L.; Roberts, B.A.; Noe, A.R.; Rodríguez, R.L.; McDonald, K.A.; Nandi, S. (2016). "Semicontinuous bioreactor production of recombinant butyrylcholinesterase in transgenic rice cell suspension cultures". *Front. Plant Sci.* 7: 412.
- Cunha, N.; Murad, A.; Ramos, G.; Maranhão, A.; Brígido, M.; Araújo, A.; y col. (2011). "Accumulation of functional recombinant human coagulation factor IX in transgenic soybean seeds". *Transgenic Res.* 20 (4): 841-855.
- D' Aoust, M.-A.; Couture, M.-J.; Charland, N.; Trépanier, S.; Landr, N.; Ors, F.; Vézina, L.-P. (2010) "The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza". *Plant Biotechnol. J.* 8: 607-619.
- Daniell, H.; Datta, R.; Varma, S.; Gray, S.; Lee, S.-B. (1998). "Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome". *Nat. Biotechnol.* 16: 345.
- Daniell, H.; Lee, S.-B.; Panchal, T.; Wiebe, P. (2001). "Expression of the native cholera toxin b subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts". *J. Mol. Biol.* 311: 1001-1009.
- Daskalova, S.M.; Radder, J.E.; Cichacz, Z.A.; Olsen, S.H.; Tsaprilis, G.; Mason, H.; Lopez, L.C. (2010). "Engineering of *N. benthamiana* L. plants for production of N-acetylgalactosamine-glycosylated proteins – towards development of a plant-based platform for production of protein therapeutics with mucin type O-glycosylation". *BMC Biotechnol.* 10 62 10.1186/1472-6750-10-62
- De la Riva, G.; González-Cabrera, J.; Vázquez-Padrón, R.; Ayra-Prado, C. (1998). "*Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for Plant transformation". *Electronic Journal of Biotechnology* (1): 3.
- De Muynck B.; Navarre, Y.; Boutry, M. (2010). "Production of antibodies in plants: status after twenty years". *Plant Biotechnology Journal* 8 (5): 529-563.
- Donini, M.; Marusic, C. (2019). "Current state-of-the-art in plant-based antibody production systems". *Biotechnol. Lett.* [https://doi.org/10.1007/s10529-019-02651-z\(0123456789\(0,-volV\)0123456789\(0,-volV\)](https://doi.org/10.1007/s10529-019-02651-z(0123456789(0,-volV)0123456789(0,-volV)).
- Floss, D.; Mockey, M.; Zanello, G.; Brosnon, D.; Diogon, M.; Frutos, R.; y col. (2010). "Expression and immunogenicity of the mycobacterial ag85b/esat-6 antigens produced in transgenic plants by elastin-like peptide fusion strategy". *BioMed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2010/274346>.
- Gavilondo, J.V.; Larrick, J.W. (2000). "Antibody engineering at the millennium". *BioTechniques* 29: 128-132.
- Eibl, R.; Kaiser, S.; Lombriser, R.; Eibl, D. (2010). "Disposable bioreactors: The current stateofheart and recommended applications in biotechnology". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86: 41-49.
- Eibl, R.; Eibl, D. (2008). "Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures". *Phytochem. Rev.* 7: 593-598.
- Floss, D.M.; Mockey, M.; Zanello, G.; Brosnon, D.; Diogon, M.; Frutos, R.; Bruel, T.; Rodrigues, V.; Garzon, E.; Chevaleyre, C.; Berri, M.; Salmon, H.; Conrad, U.; Dedieu, L. (2010) Expression and immunogenicity of the mycobacterial Ag85B/ESAT-6 antigens produced in transgenic plants by elastin-like peptide fusion strategy. *J Biomed Biotechnol* 2010:274346.
- Fox, J. (2012). "First plant-made biological approved". *Nat. Biotechnol.* 30:472.
- Fujiuchi, N.; Matsuda, R.; Matoba, N.; Fujiwara, K. (2016). "Removal of bacterial suspension water occupying the intercellular space of detached leaves after agroinfiltration improves the yield of recombinant hemagglutinin in a *Nicotiana benthamiana* transient gene expression system". *Biotechnol. Bioeng.* 113: 901-906.
- Gils, M.; Kandzia, R.; Marillonnet, S.; Klimyuk, V.; Gleba, Y. (2005). "Highyield production of authentic human growth hormone using a plant virusbased expression system". *Plant Biotechnology Journal* 3: 613-620.
- Giritch, A.; Marillonnet, S.; Engler, C.; van Eldik, G.; Botterman, J.; Klimyuk, V.; Gleba, Y. (2006). "Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfectd with non-competing viral vectors". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 14701-14706.
- Gomes, M.; Alvarez, M.A.; Ramos Quellis, L.; Laguia Becher, M.; Andrade Castro, J.; Gameiro, J.; Caporrino, M.C.; Moura-da-Silva, A.M.; Oliveira Santos, M. (2019). "Expression of an scFv antibody fragment in *Nicotiana benthamiana* and *in vitro* assessment of its neutralizing potential against the snake venom metalloproteinase BaP1 from *Bothrops asper*". *Toxicon* 160: 38-46.
- Gomord, V.; Fitchette, A.; Menu-Bouaouiche, L.; Saint-Jore-Dupas, C.; Plasson, C.; Michaud, D.; Faye, L. (2010). "Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production". *Plant Biotechnology Journal* 8: 564-587.
- Grabowski, G.; Golembo, M.; Shaaltiel, Y. (2014). "Taliglucerase alfa: an enzyme replacement therapy using plant cell expression technology." *Mol Genet Metab* 112 (1): 1-8
- Gurusamy, P.; Schafer, H.; Ramamoorthy, S.; Wink, M. (2017). "Biologically active recombinanthuman erythropoietin expressed in hairy root cultures and regenerated plantlets of *Nicotiana tabacum* L". *PLoS ONE* 12: e0182367.

- Gutierrez-Valdes, N.; Häkkinen, S.; Lemasson, C.; Guillet, M.; Oksman-Caldentey, K.-M.; Ritala, A.; Cardon, F. (2020). "Hairy root cultures—A versatile tool with multiple applications". *Front. Plant Sci.* 11: 33.
- Häkkinen, S.T.; Raven, N.; Henquet, M.; Laukkanen, M.L.; Anderlei, T.; Pitkänen, J.P.; Twyman, R.M.; Bosch, D.; Oksman-Caldentey, K.M.; Schillberg, S.; Ritala, A. (2014). "Molecular farming in tobacco hairy roots by triggering the secretion of a pharmaceutical antibody". *Biotechnol. Bioeng.* 111: 336-346.
- Hauptman, V.; Menzel, M.; Weichart, N.; Reimers, K.; Spohn, U.; Conrad, U. (2015). "Production of spider silk proteins in tobacco and potato". *BMC Biotechnology* (15) DOI 10.1186/s12896-015-0123-2.
- Hendin, H.; Pillet, S.; Lara, A.N.; Wu, C.-Y.; Charland, N.; Landry, N.; Waard, B.J. (2017). "Plant-made virus-like particle vaccines bearing the hemagglutinin of either seasonal (H1) or avian (H5) influenza have distinct patterns of interaction with human immune cells *in vitro*". *Vaccine* 35: 2592-2599.
- Herrera-Estrella, L.; Depicker, A.; Van Montagu, M.; Schell, J. (1983). "Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector." *Nature* 303: 209-213.
- Hiatt, A.C.; Cafferkey, R.; Bowdish, K. (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342: 76-78.
- Hodgins, B.; Pillet, S.; Landry, N.; Ward, B. (2019). "Prime-pull vaccination with a plant-derived virus-like particle influenza vaccine elicits a broad immune response and protects aged mice from death and frailty after challenge". *Immunity & Ageing* (16), 27 <https://doi.org/10.1186/s12979-019-0167-6>.
- Holland, T.; Buyel, J. (2018). "Bioreactorbased production of glycoproteins in plant cell suspension cultures". En: *Recombinant Glycoprotein Production*. Berlin, Alemania: Springer.
- Hood, E.; Witcher, D.; Maddock, S.; Meyer, T.; Baszczynski, C.; y col. (1997). "Commercial production of avidin from transgenic maize: Characterization of transformant, production, processing, extraction and purification". *Mol. Breed.* 3: 291-306.
- Huang, J.; Nandi, S.; Wu, L.; Yalda, D.; Bartley, G.; Rodriguez, R.; Lonnerdal, B.; Huang, N. (2002). "Expression of natural antimicrobial human lysozyme in rice grains". *Mol. Breed.* 10: 83-94.
- Huang, L.F.; Liu, Y.K.; Lu, C.A.; Hsieh, S.L.; Yu, S.M. (2005). "Production of human serum albumin by sugar starvation induced promoter and rice cell culture". *Transgenic Res.* 14: 569-581.
- Huang, T.K.; McDonald, K. (2009). "Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures". *Biochem. Eng. J.* 45: 168-184.
- Islam, M.; Kim, N.S.; Jung, J.W.; Kim, H.B.; Han, S.C.; Yang, M.S. (2018). "Spontaneous pepsin catalyzed activation of human pepsinogen c in transgenic rice cell suspension culture: Production and characterization of human pepsin c". *Enzym. Microb. Technol.* 108: 66-73.
- Jin, C.; Altmann, F.; Strasser, R. (2008). "A plant derived human monoclonal antibody induces an anti-carbohydrate immune response in rabbits". *Glycobiology* 18: 235-241.
- Jin, S.; Daniell, H. (2015). "The engineered chloroplast genome just got smarter". *Trends Plant Sci.* 20: 622-640.
- Joensuu, J.; Conley, A.; Lienemann, M.; Brandle, J.; Linder, M.; Menassa R. (2010). "Hydrophobin fusions for high-level transient protein expression and purification in *Nicotiana benthamiana*". *Plant Physiol.* 152: 622-633.
- Juárez, P.; Virdi, V.; Depicker, A.; Orzaez, D. (2016). "Biomanufacturing of protective antibodies and other therapeutics in edible plant tissues for oral applications". *Plant Biotechnology Journal* 1-9.
- Kaiser, J. (2008) "Is the drought over for pharming?" *Science* 320: 473-475.
- Kang, T.J.; Lee, W.S.; Choi, E.G.; Kim, J.W.; Kim, B.G.; Yang, M.S. (2006). "Mass production of somatic embryos expressing *Escherichia coli* heatlabile enterotoxin b subunit in siberian ginseng". *J. Biotechnol.* 121: 124-133.
- Karimi, M.; Inzé, D.; Depicker, A. (2002). "GATEWAY vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation". *Trends Plant Sci.* 7 (5): 193-195.
- Kashima, K.; Yuki, Y.; Mejima, M.; Kurokawa, S.; Suzuki, Y.; Minakawa, S.; y col. (2016). "Good manufacturing practices production of a purificationfree oral cholera vaccine expressed in transgenic rice plants". *Plant Cell Rep.* 35: 667-679.
- Kim, Y.S.; Kim, B.G.; Kim, T.G.; Kang, T.J.; Yang, M.S. (2006). "Expression of a cholera toxin b subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) using *Agrobacterium*-mediated transformation system". *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 87: 203-210.
- Kim, T.G.; Baek, M.Y.; Lee, E.K.; Kwon, T.H.; Yang, M.S. (2008). "Expression of human growth hormone in transgenic rice cell suspension culture". *Plant Cell Rep.* 27: 885-891.
- Kim, N.S.; Yu, H.Y.; Chung, N.D.; Shin, Y.J.; Kwon, T.H.; Yang, M.S. (2011). "Production of functional recombinant bovine trypsin in transgenic rice cell suspension cultures". *Protein Expr. Purif.* 76: 121-126.
- Kiyono, H.; Azegami, T. (2015). "The mucosal immune system: From dentistry to vaccine development". *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 91 (8): 423-439.
- Kizhner, T.; Azulay, Y.; Hainrichson, M.; Tekoah, Y.; Arvat, G.; Shulman, A.; Ruderfer, I.; Aviezer, D.; Shaatiel, Y. (2015). "Characterization of a chemically modified plant cell culture expressed human -Galactosidase-A enzyme for treatment of Fabry disease". *Mol. Genet. Metabol.* 114: 259-267.
- Klimyuk, V.; Pogue, G.; Herz, S.; Butler, J.; Haydon, H. (2014). "Production of recombinant antigens and antibodies in *Nicotiana benthamiana* using 'magniflection' technology: GMP compliant facilities for small- and large-scale manufacturing". *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 375: 127-154.
- Kozai, T.; Afreen, F.; Zobayed, S.P. (2005). *Photoautotrophic (Sugar Free Medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System*. Berlin, Alemania: Springer Science & Business Media.
- Kurup, V.; Thomas, J. (2020). "Edible Vaccines: Promises and Challenges. *Molecular Biotechnology*" 62: 79-90.
- Laguia Becher, M.; Zaldua, Z.; Xu, W.; Macroni, P.; Velandier, W.; Alvarez M.A. (2019). "Co-expressing Turnip Crinkle Virus-coat protein with the serine protease alpha-thrombin precursor (pFIIa) in *Nicotiana benthamiana* Domin". *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 55 (1): 88-98.

- Lakshmi, P.; Verma, D.; Yang, X.; Lloyd, B.; Daniell, H. (2013). "Low cost tuberculosis vaccine antigens in capsules: Expression in chloroplasts, bio-encapsulation, stability and functional evaluation *in vitro*". *PLoS ONE* 8, e54708.
- Lim, J.A.C.; Patkar, A.; McDonagh, G. (2010). "Modeling bioprocess cost: process economic benefits of expression technology based on *Pseudomonas fluorescens*". 8: 62-70.
- Liu, Y.K.; Li, Y.T.; Lu, C.F.; Huang, L.F. (2015). "Enhancement of recombinant human serum albumin in transgenic rice cell culture system by cultivation strategy". *New Biotechnol.* 32: 328-334.
- Loh, H.S. G.; Yusibov, V. (2017). "Using transgenic plants and modified plant viruses for the development of treatments for human diseases." *Current Opinion in Virology* 26: 81-89.
- Lonoce, C.; Marusic, C.; Morrocchi, E.; Salzano, A.M.; Scaloni, A.; Novelli, F.; Pioli, C.; Feeney, M.; Frigerio, L.; Donini, M. (2018). "Enhancing the secretion of a glyco-engineered anti-CD20 scFv-Fc antibody in hairy root cultures". *Biotechnol J.* <https://doi.org/10.1002/biot.201800081>.
- López, J.; Lencina, F.; Petruccelli, S.; Marconi, P.; Alvarez, M.A. (2010). "Influence of the KDEL signal, DMSO and mannitol on the production of the recombinant antibody 14D9 by long-term *Nicotiana tabacum* cell suspension culture". *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 103: 307-314.
- Lu, C.A.; Lim, E.K.; Yu, S.M. (1998). "Sugar response sequence in the promoter of a rice α -amylase gene serves as a transcriptional enhancer". *J. Biol. Chem.* 273: 10120-10131.
- Ma, J.K.; Hiatt, A.; Hein, M.; Vine, N.D.; Wang, F.; Stabila, P.; Van Dolleweerd, C.; Mostov, K.; Lehner, T. (1995). "Generation and assembly of secretory antibodies in plants". *Science* 268: 716-719.
- Ma, J.-C.; Hikmat, B.Y.; Wycoff, K.; Vine, N.; Chargelegue, D.; Yu, L.; Hein, M.B.; Lehner, T. (1998). "Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans". *Nature Med.* 4: 601-606.
- Ma, J.C.; Drossard, J.; Lewis, D.; Altmann, F.; Boyle, J.; Christou, P.; y col. (2015). "Regulatory approval and a first-in-human phase I clinical trial of a monoclonal antibody produced in transgenic tobacco plants". *Plant Biotechnol. J.* 13: 1106-1120.
- Magnusdottir, A.; Vidarsson, H.; Björnsson, J.; Örvar, B. (2013). "Barley grains for the production of endotoxin free growth factors". *Trends Biotechnol.* 31: 572-580.
- Maliga, P. (2002) "Engineering the plastid genome of higher plants". *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:164-172.
- Marillonnet, S.G.; Gils, M.; Kandzia, R.; Klimyuk, V.; Gleba, Y. (2004). *In planta* engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 6852-6857.
- Martínez, C.; Petruccelli, S.; Giulietti, A.; Alvarez, M.A. (2005). "Expression of the antibody 14D9 in *Nicotiana tabacum* hairy roots". *Electronic Journal of Biotechnology* 8 (2): 170-176.
- Matsuda, R.; Kubota, C.; Alvarez, M.; Cardineau, G. (2009). "Biopharmaceutical protein production under controlled environments: Growth, development, and vaccine productivity of transgenic tomato plants grown hydroponically in a greenhouse". *HortScience* 44: 1594-1599.
- Matsuda, R.; Kubota, C.; Alvarez, M.; Cardineau, G. (2010). "Determining the optimal timing of fruit harvest in transgenic tomato expressing F1V, a candidate subunit vaccine against plague". *HortScience* 45: 347-351.
- Matsuda, R.; Kubota, C.; Alvarez, M.; Cardineau, G. (2012). "Effect of high electrical conductivity of hydroponic nutrient solution on vaccine protein content in transgenic tomato". *Hort-Technology* 22: 362-367.
- McDonald, K.; Hong, L.; Trombly, D.; Xie, Q.; Jackman, A. (2005). "Production of human α -1-antitrypsin from transgenic rice cell culture in a membrane bioreactor". *Biotechnol. Prog.*, 21: 728-734.
- McPherson, M.; Yang, R.C.; Good, A.; Nielson, R.; Hall, L. (2009). "Potential for seed-mediated gene flow in agroecosystems from transgenic safflower (*Carthamus tinctorius* L.) intended for plant molecular farming". *Transgenic Res.* 18: 281-299.
- Medrano, G.; Reidy, M.; Liu, J.; Ayala, J.; Dolan, M.; Cramer, C. (2009). "Rapid System for Evaluating Bioproduction Capacity of Complex Pharmaceutical Proteins in Plants". In: L. F. (eds.), *Methods in Molecular Biology, Recombinant Proteins From Plants* (Vol. 483). © Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, LLC
- Menassa, R.; Nguyen, V.; Jevnikar, A.; Brandle, J. (2001). "A self-contained system for the field production of plant recombinant interleukin-10". *Molecular Breeding* 8: 177-185.
- Mohebodini, M.; Jalali-Javaran, M.; Alizadeh, H.; Mahboudi, F.; Yarbakht, M. (2014). "Agrobacterium-mediated transformation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) to express igg-binding protein a and human pro-insulin as a fusion protein". *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 89: 719-725.
- Moloney, M.; Boothe, J.; Keon, R.; Nykiforuk, C.; Van Rooijie, G. (2009). "Methods for production of insulin in plants" US Patent 7,547,82106 16.
- Montero-Morales, L.; Steinkellner, H. (2018). "Advances plant-based glycan engineering". *Front. Bioeng. Biotechnol.* 6:81.
- Moon, K.; Park, J.; Park, Y.; Song, I.; Lee, H.; Cho, H.; Jeon, J.H.; Kim, H.-S. (2020). "Development of Systems for the Production of Plant-Derived Biopharmaceuticals". *MDPI Plants* 9(30).
- Mor, T. (2015) "Molecular pharming's foot in the FDA's door: Protalix's trailblazing story". *Biotechnol. Lett.* 37: 2147-2150.
- Nandi, S.; Suzuki, Y.; Huang, J.; Yalda, D.; Pham, P.; Wu, L.; Bartley, G.; Huang, N.; Lönnnerdal, B. (2002). "Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula". *Plant Sci.* 163: 713-722.
- Nelson, G.; Marconi, P.; Periolo, O.; La Torre, J.; Alvarez, M.A. (2012). "Immunocompetent truncated E2 glycoprotein of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) expressed in *Nicotiana tabacum* plants: a candidate antigen for new generation of veterinary vaccines". *Vaccine* 30: 4499-4504
- Nochi, T.; Takagi, H.; Yuki, Y.; Yang, L.; Masumura, T.; Mejima, M.; y col. (2007). "Ricebased mucosal vaccine as a global strategy for coldchainand needlefree vaccination". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 10986-10991.
- Palacio-Bielsa, A.; González-Abolafio, R.; Alvarez, B.; Lastra, B.; Cambra, M.; y col. (2009) "Chromosomal and Ti plasmid characterization of tumorigenic strains of three *Agrobacterium* species isolated from grapevine tumors". *Plant Pathology* 58: 584-593.

- Pastores, G.; Petakov, M.; Giraldo, P.; Rosenbaum, H.; Szer, J.; Deegan, P.; y col. (2014). "A Phase 3, multicenter, open-label, switchover trial to assess the safety and efficacy of taliglucerase alfa, a plant cell-expressed recombinant human glucocerebrosidase, in adult and pediatric patients with Gaucher disease previously treated with imiglucerase". *Blood Cells Mol Dis* 53 (4): 253-260.
- Paul, M.; Ma, J. (2011). "Plant-made pharmaceuticals: leading products and production platforms". *Biotechnology and Applied Biochemistry* 58-67.
- Paul, M.; Reljic, R.; Klein, K.; Drake, P.; van Dolleweerd, C.; Pabst M.; y col. (2014). "Characterization of a plantproduced recombinant human secretory IgA with broad neutralizing activity against HIV". *mAbs* 6: 1585-1597.
- Pêra, F.; Mutepefa, D.; Khan, A.; Els, J.; Mbewana, S.; van Dijk, A.; Rybicki, E.P.; Hitzeroth, I. (2015). "Engineering and expression of a human rotavirus candidate vaccine in *Nicotiana benthamiana*". *Virology Journal* 12, 205 DOI 10.1186/s12985-015-0436-8
- Pillet, S.; Couillard, J.; Trépanier, S.; Poulin, J.; Yassine-Diab, B.; Guy, B.; Ward, B.J.; Landry, N. (2019). "Immunogenicity and safety of a quadrivalent plant derived virus like particle influenza vaccine candidate—Two randomized Phase II clinical trials in 18 to 49 and > 50 years old adults". *PLoS ONE* 14(6), e0216533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216533>.
- Qiu, X.; Wong, G.; Audet, J.; Bello, A.; Fernando, L.; Alimonti, J.; y col. (2014). "Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp". *Nature* 514: 47-53.
- Rademacher, T.; Sack, M.; Arcalis, E.; Stadlmann, J.; Balzer, S.; Altmann, F.; Quendler, H.; Stiegler, G.; Kunert, R.; Fischer, R.; Stoger, E. (2008) Recombinant antibody 2G12 produced in maize endosperm efficiently neutralize HIV-1 and contains predominantly singleGlcNAc N-glycans. *Plant Biotechnol J* 6:189–201.
- Rademacher, T.; Sack, M.; Blessing, D.; Fischer, R.; Holland, T.; Buyel, J. (2019). "Plant cell packs: a scalable platform for recombinant protein production and metabolic engineering". *Plant Biotechnol. J.* 17: 1560-1566.
- RosalesMendoza, S.; TelloOlea, M. (2015). "Carrot cells: A pioneering platform for biopharmaceuticals production". *Mol. Biotechnol.* 57: 219-232.
- Ruf, S.; Karcher, D.; Bock, R. (2007). "Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 6998-7002.
- Ruhlman, T.; Verma, D.; Samson, N.; Daniell, H. (2010). "The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression". *Plant Physiol.* 152: 2088-2104.
- Santos, R.; Abranches, R.; Fischer, R.; Sack, M.; Holland, T. (2016). "Putting the spotlight back on plant suspension cultures". *Front. Front. Plant Sci.* 7: 297.
- Schell, J.; Van Montagu, M. (1977). "The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*, a natural vector for the introduction of *nif* genes in plants?" *Genetic Engineering for Nitrogen Fixation* 159-179.
- Schillberg, S.; Raven, N.; Fischer, R.; Twyman, R.M.; Schiermeyer, A. (2013). "Molecular farming of pharmaceutical proteins using plant suspension cell and tissue cultures". *Curr. Pharm. Des.* 19: 5531-5542.
- Sedeghati, B.; Haddad, R.; Bandhpour, M. (2020). "Transient expression of human serum albumin (HSA) in tobacco leaves". *Molecular Biology Reports* <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05640-y>.
- Sharma, A.; Sharma, M. (2009). "Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities". *Biotechnology Advances* 27: 811-832.
- Shanmugaraj, B.; Bulaon, C.; Phoolcharoen, W. (2020). "Plant Molecular Farming: A Viable Platform for Recombinant Biopharmaceutical Production". *MDPI Plants* 9: 842-861.
- Shelduki, Y. (2008). "Agrobacterium-mediated transient expression as an approach to production of recombinant proteins in plants". *Recent Pat. Biotechnol.* 2: 198-208.
- Shin, Y.J.; Hong, S.Y.; Kwon, T.H.; Jang, Y.S.; Yang, M.S. (2003) High level of expression of recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor in transgenic rice cell suspension culture. *Biotechnology and Bioengineering* 82 (7): 778-783
- Sijmons, P.C.; Dekker, B.; Schrammeijer, B.; Verwoerd, T.C.; van den Eizen, P.J.M.; Hoekema, A. (1990). "Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants". *Bio/ Technology* 8: 217-221.
- Strasser, R.; Stadlmann, J.; Schahs, M.; Stiegler, G.; Quendler, H.; Mach, L.; Glössl, J.; Weterings, K.; Pabst, M.; Steinkellner, H. (2008). "Generation of glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure". *Plant Biotechnol. J.* 6: 392-402.
- Steinkellner, H; Castilho, A. (2015). "N-Glyco-engineering in plants: update on strategies and major achievements". *Methods Mo.l Biol.* 1321: 195-212.
- Stoger, E.; Sack, M.; Perrin, Y.; Vaquero, C.; Torres, E.; Twyman, R.; Christou, P.; Fischer, R. (2002). "Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems". *Mol. Breed.* 9: 149-158.
- Su, J.; Zhu, L.; Sherman, A.; Wang, X.; Lin, S.; Kamesh, A.; y col. (2015). "Low cost industrial production of coagulation factor IX bioencapsulated in lettuce cells for oral tolerance induction in hemophilia B". *Biomaterials* 70: 84-93.
- Suslow, T.; Thomas, B.R.; Bradford, K.J. (2002). "Biotechnology provides new tools for planting". University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 8043. <https://doi.org/10.3733/ucanr.8043>
- Svab, Z.; Maliga, P. (2007). "Exceptional transmission of plastids and mitochondria from the transplastomic pollen parent and its impact on transgene containment". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 7003-7008.
- Tabayashi, N.; Matsumura, T. (2014). "Forefront study of plant biotechnology for practical use: Development of oral drug for animal derived from transgenic strawberry." *Soc. Biotechnol. J. Japan* 92: 537-539.
- Tekoah, Y.; Shulman, A.; Kishner, T.; Ruderfer, I.; Fux, L.; Nataf, Y.; y col. (2015). "Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture-the Protalix experience". *Plant Biotechnol. J.* 13: 1199-1208.

- Testa, D.; Liao, M.-J.; Ferencz-Biro, K.; Rashidbaigi, A.; DiPaola, M. (1997) Composition Containing Human Alpha Interferon Species Proteins and Method for Use Thereof. U.S. Patent 5,676,942, 14 October 1997.
- Thanavala, Y.; Mahoney, M.; Pal, S.; Scott, A.; Richter, L.; Natarajan, N.; y col. (2005). "Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis b". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102: 3378-3382.
- Tokuhara, D.; Álvarez, B.; Mejima, M.; Hiroiwa, T.; Takahashi, Y.; Kurokawa, S.; y col.; (2013). "Ricebased oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection". *J. Clin. Investig.* 123: 3829-3838.
- Tremblay, R.; Wang, D.; Jevnikar, A.; Ma, S. (2010). "Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins". *Biotechnol. Adv.* 28 (2): 214-221.
- Tusé, D.; Ku, N.; Bendandi, M.; Becerra, C.; Collins, Jr. R.; Langford, N.; Inogés Sancho, S., y col. (2015). "Clinical safety and immunogenicity of tumor-targeted, plant-made Id-KLH conjugate vaccines for follicular lymphoma". *Biomed Res Int* 648 143. doi: 10.1155/2015/648143.
- Vermij, P.; Waltz, E. (2006). "USDA approves the first plantbased vaccine". *Nat. Biotechnol.* 24: 234.
- Weintraub, J.A.; Hilton, J.; White, J.M.; Hoover, C.I.; Wycoff, K.L.; Yu, L.; Larrick, J.W.; Featherstone, J.D.B. (2005). "Clinical trial of a plant-derived antibody on recolonization of mutans streptococci". *Caries Res.* 39: 241-250.
- Witcher, D.; Hood, E.; Peterson, D.; Bailey, M.; Bond, D.; Kusnadi, A.; y col. (1998). "Commercial production of β -glucuronidase (GUS): A model system for the production of proteins in plants". *Mol. Breed.* 4: 301-312.
- Wolternik-van Loo, S.; Ayala, A.; Hooykaas, P.; van Heusden, G. (2015). "Interaction of the *Agrobacterium tumefaciens* virulence protein VurD2 with histones". *Microbiology* 161(Pt2): 401-410.
- Wongsamuth, R.; Doran, P. (1997). "Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots". *Biotechnol. Bioeng.* 54: 401-415.
- Woodard, S.; Mayor, J.; Bailey, M.; Barker, D.; Love, R.; Lane, J. y col. (2003). "Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: Characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants". *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38: 123-130.
- Xu, J.; Dolan, M. (2011). "Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures." *Biotechnol. Adv.* 20: 278-299.
- Xu, J.; Dolan, M.C.; Medrano, G.; Cramer, C.L.; Weathers, P.J. (2012). "Green factory: plants as bioproduction platforms for recombinant proteins". *Biotechnol Adv.* 30: 1171-1184.
- Yamaki, S.; Hachimura, H.; Ogawa, M.; Kanegae, S.; Sugimoto, T.; Amimoti, A. (2020). "Long-term follow-up study after administration of a canine interferon- α preparation for feline gingivitis". *The Journal of Veterinary Medical Science*, 232-236.
- Yu, D.; McLean, M.; Hall, C.; Ghosh, R. (2008). "Purification of a human immunoglobulin G₁ monoclonal antibody from transgenic tobacco using membrane chromatographic processes". *Journal of Chromatography A* 1187: 128-137.
- Yusibov, V.; Rabindran, S. (2008). "Recent progress in the development of plant derived vaccines". *Expert Rev. Vaccines* 7: 1173-1183.
- Yusibov, V.; Mamedov, T. (2010). "Plant as an Alternative System for Expression of Vaccine Antigens". *Proceedings of ANAS (Biological Sciences)* 65(5-6): 195-200.
- Zambryski, P. (2013). "Fundamental discoveries and simple recombination between circular plasmid DNAs led to widespread use of *Agrobacterium tumefaciens* as a generalized vector for plant genetic engineering". *Int. J. Dev. Biol.* 57: 449-452.
- Zhang, Y.; Lee, C.; Wehner, N.; Imdahl, F.; Svetlana, V.; Weiste, C.; Dröge-Laser, W.; Deeken, R. (2015). "Regulation of oncogene expression in T-DNA-transformed host plant cells". *PLOS Pathogens* 11(1): e1004620. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004620>.
- Zhang, B.; Shanmugaraj, B.; Daniell, H. (2017). "Expression and functional evaluation of biopharmaceuticals made in plant chloroplasts". *Curr. Opin. Chem. Biol.* 38: 17-23.
- Zischewski, J.; Sack, M.; Fischer, R. (2016). "Overcoming low yields of plant-made antibodies by a protein engineering approach". *Biotechnol J.* 11: 107-116.