

## **BIOFACTORIES: PRODUCCIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS EN PLANTES**

M. DOLORS LUDEVID I MARGARITA TORRENT

*Centre de Recerca en Agrigenòmica*

Adreça per a la correspondència: M. Dolors Ludevid. Centre de Recerca en Agrigenòmica. C. de Jordi Girona, 18-26. 08034 Barcelona.  
Adreça electrònica: [dlmgmd@cid.csic.es](mailto:dlmgmd@cid.csic.es).

### **RESUM**

Fins al començament del segle XXI, les plantes havien estat la font de remeis per a malalties en humans. Després, els extractes vegetals van ser substituïts per productes produïts a escala industrial per síntesi química. Durant les darreres dècades del segle XX, va aparèixer una alternativa a la síntesi química gràcies al desenvolupament de l'enginyeria genètica en bacteris, llevats i cèl·lules animals per a la producció de proteïnes recombinants. Amb el desenvolupament recent de les metodologies de transformació vegetal, les plantes ofereixen un sistema alternatiu al bacterià o al de cultiu de cèl·lules animals, per a la producció de proteïnes recombinants a baix cost i segur per a la salut humana. En aquest article il·lustrem els avantatges i desavantatges de diferents sistemes vegetals (transformació estable i transitòria), les seves limitacions i reptes. També exposem les millores que actualment s'estan duent a terme, emprant espècies diferents de plantes i sistemes diferents d'expressió per tal de consolidar aquestes factories per a la producció de proteïnes terapèutiques senzilles o molt complexes.

**Paraules clau:** biofactoria vegetal, proteïna recombinant, planta transgènica, proteïna terapèutica.

### **MOLECULAR FARMING: PLANT MADE BIOPHARMACEUTICALS**

#### **SUMMARY**

Plants were the main source for human drugs until the beginning of the nineteenth century when plant-made pharmaceuticals were partly supplanted by drugs produced by the industrial methods of chemical synthesis. During the last decades of twentieth century, genetic engineering has offered an alternative to chemical synthesis using bacteria,

yeast and animal cells as a factories for the production of recombinant proteins. With the recent development of plant-based recombinant protein production systems, plants offer a safe and extremely cost effective alternative to microbial and mammalian cell cultures. Here, we evaluate the advantages and disadvantages of different plant expression systems (stable nuclear, or transient transformations) and their current limitations or challenges. We also illustrate that current improvements in plant expression systems and plant hosts are making them suitable as alternative factories for the production of either simple or highly complex recombinant proteins.

**Key words:** molecular pharming, plant-made pharmaceuticals, recombinant protein, transgenic plant, therapeutic protein.

En els darrers trenta anys s'ha dedicat un gran esforç al desenvolupament de tecnologies per a la producció de proteïnes recombinants en sistemes *in vitro* i *in vivo*. Cada sistema té els seus avantatges i inconvenients a l'hora d'expressar proteïnes heteròlogues. Encara que la demanda de proteïnes terapèutiques i enzims industrials creix dia a dia, actualment la capacitat de producció per a la majoria de proteïnes recombinants és limitada. És per això que cal avaluar els diferents sistemes biològics d'expressió i escollir aquell que garanteixi la producció d'un producte funcional i amb un cost efectiu. De fet, cap sistema és ideal per a qualsevol proteïna recombinant, i normalment caldrà utilitzar un sistema biològic o un altre, depenent d'un gran nombre de factors, com la toxicitat del producte, el rendiment, les característiques específiques de la proteïna, les estratègies de purificació, els costos de producció, el confinament, els problemes ambientals, la percepció pública, etc.

## LES PLANTES COM A BIOFACTORIES

Durant milers d'anys les plantes s'han utilitzat com a font d'alimentació i de productes terapèutics. El primer text conegut sobre plantes medicinals va ser escrit fa

més de 4.500 anys a la Xina sota la direcció de l'emperador Shen-Nung, i s'hi descriuen 365 plantes medicinals. Més a prop, 1.500 anys aC, els egipcis ja empraven extractes vegetals com a medicines. Els papirs d'Ebers descriuen set-cents remeis provinents de plantes, com la *Mandragora officinarum*, el *Ricinus communis* i el *Cannabis*. El gran gir en la història dels medicaments es va produir des del principi del segle xx fins als anys setanta, quan els productes farmacèutics van ser dominats per la indústria química amb el desenvolupament de processos com més va més sofisticats per a l'extracció, purificació i síntesi de compostos actius. Com a complement als processos de síntesi i extracció, l'enginyeria genètica va entrar a la indústria farmacèutica al començament dels setanta i va obrir la possibilitat de biosintetitzar, en bacteris, llevats o cèl·lules animals, molècules complexes que no es podien sintetitzar químicament o en les quals el procés d'extracció de les plantes es feia inaccessible. Recentment la transformació genètica de vegetals ha forçat la introducció de les plantes dins el món de la indústria farmacèutica a causa de la recerca de nous sistemes de producció de proteïnes recombinants. És evident que les plantes són una alternativa per expressar de manera eficient i barata proteïnes recombinants, i ofereixen avantatges sobre altres sistemes

d'expressió, com per exemple a) baix cost de producció, productes lliures de virus i prions que infectin humans, b) la producció a gran escala de proteïnes terapèutiques d'acord amb la demanda global i c) a diferència de la fermentació microbiana, les plantes són capaces de dur a terme modificacions posttraduccionalment generalment necessàries per a l'activitat de moltes proteïnes terapèutiques (Walsh i Jefferis, 2006; Gomord i Faye, 2004; Twyman *et al.*, 2003). La seroalbúmina humana va ser la primera proteïna recombinant produïda en plantes transgèniques de patata i tabac (Sijmons *et al.*, 1990), i a partir d'aleshores la utilització de les plantes com a sistema d'expressió es va ampliar a altres proteïnes com citocines, collagen, enzims industrials, anticossos i vacunes humanes i animals (Ma *et al.*, 2005; Gomord *et al.*, 2004). Les propietats d'utilitzar les plantes com a bioreactors en lloc de microorganismes, cultius cel·lulars d'animals o animals transgènics les han documentades científicament aquests darrers anys molts investigadors (Ma *et al.*, 2003; Fisher *et al.*, 2004; Menkhaus *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005; Gomord *et al.*, 2005).

Tot i la preocupació social per aquesta tecnologia, s'han fet moltes millores en els sistemes de transformació que han portat a la creació de plataformes de producció de proteïnes recombinants en plantes. Així, el Departament d'Agricultura dels Estats Units va aprovar per primera vegada una proteïna produïda en plantes, una vacuna contra la paramixovirosi aviària (malaltia de Newcastle) desenvolupada per Dow AgroSciences en cultius de cèl·lules vegetals modificades genèticament. Un altre exemple és la utilització de plantes modificades genèticament en casos en què es fa necessari un increment ràpid de producció d'anticossos (Ma *et al.*, 1995). De fet, la producció d'immunoglobulines en plantes ens diu que les cèl·lules vegetals són capaces de

sintetitzar, acoblar *via* ponts disulfur i processar correctament les cadenes lleugeres i pesades dels anticossos.

Les estratègies emprades per a l'expressió de proteïnes en plantes han evolucionat ràpidament, s'han emprat moltes espècies vegetals i s'han desenvolupat nous procediments de transformacions estables i procediments per a transformacions transitòries.

## PLANTES TRANSGÈNIQUES

Els primers assajos per expressar proteïnes recombinants en plantes es van fer als anys vuitanta coincidint amb el desenvolupament de les tècniques de transformació del genoma nuclear de plantes (Horsch *et al.*, 1985). En els primers assajos per aconseguir plantes transgèniques que expressessin un producte terapèutic es va utilitzar el mètode clàssic d'inserció d'un DNA exogen en el genoma nuclear de la planta emprant un bacteri intermediari, *Agrobacterium*, i el tabac com a planta hoste (McCormick *et al.*, 1999). La introducció d'una seqüència promotora a l'inici de la construcció de DNA és essencial per a la transcripció del transgèn. El promotor del virus del mosaic de la col-i-flor (CaMV) (Fang *et al.*, 1989) ha estat el més utilitzat. És un promotor constitutiu, és a dir, que permet l'expressió del transgèn en qualsevol teixit de la planta, encara que no amb la mateixa intensitat d'expressió. És necessari, a més, que el plasmidi (DNA) contingui un gen que confereixi resistència a un herbicida (per exemple, kanamicina) per poder separar després de la transformació aquelles plantes que són transgèniques de les que no ho són. Si la proteïna recombinant es vol expressar en un teixit concret caldrà utilitzar un promotor que tan sols permeti la transcripció en aquell teixit. Un

bon exemple en són els promotors dels gens de proteïnes de reserva de la llavor, que, introduïts en el transgèn, expressaran la proteïna recombinant únicament a la llavor de la planta. Cal tenir en compte, però, que la transformació estable nuclear té inconvenients, entre d'altres: *a*) silenciament de l'RNA del transgèn, del qual parlarem més endavant, *b*) fenòmens epigenètics (metilacions produïdes en el transgèn) i *c*) efecte de posició (depenent d'on s'insereixi el transgèn en el genoma pot anul·lar la seva transcripció i, per tant, l'expressió de la proteïna).

## EXPRESSIÓ TRANSITÒRIA

L'expressió transitòria és l'expressió de proteïnes en un sistema biològic sense integrar el transgèn en el seu genoma nuclear. Aquest és el mètode més ràpid conegut per a la producció de proteïnes en plantes. És un sistema que no requereix fer créixer les plantes transgèniques al camp, ja que poden créixer en medis confinats (hivernacles), permet estandarditzar els processos de producció i, el més important, resoldre el problema del silenciament gènic, co-transformant el transgèn emprat amb una proteïna vírica supressora del silenciament. Hi ha tres vies diferents per aconseguir una expressió transitòria de la proteïna recombinant: *a*) la transformació directa (bombardeig de partícules cobertes del DNA, transformació de protoplasts amb polietilenglicol, i microinjecció), *b*) infecció vírica de la planta —el virus estarà modificat genèticament, de manera que s'introdueix el transgèn corresponent a la proteïna que volem expressar (Alamillo *et al.*, 2006)— i *c*) infecció bacteriana —el plasmidi que conté el transgèn s'introdueix en *Agrobacterium tumefaciens*, que, alhora, s'introduirà dins les cèl·lules vegetals per siste-

mes de buit o a pressió emprant una xeringa (Kapila *et al.*, 1997). Avui dia el més utilitzat és aquest darrer mètode, amb el qual s'han produït anticossos, vacunes i altres productes farmacèutics.

## PLANTES HOSTES

Les espècies vegetals més freqüentment utilitzades per a la producció de proteïnes terapèutiques són aquelles de les quals aprofitem la llavor, com l'arròs, el blat de moro i el gira-sol, o bé aquelles que tinguin molta biomassa foliar, com el tabac i l'al·fals.

### Llavors de cereals com a bioreactors

En el context dels sistemes de plantes utilitzades com a bioreactors cal assenyalar el paper de les llavors. Les llavors són òrgans que acumulen naturalment una gran quantitat de proteïna, que es manté estable en un entorn petit i compacte amb baix contingut en aigua. Així doncs, a les qualitats pròpies que tenen les plantes en general per produir proteïnes recombinants (absència de patògens animals, facilitat d'escalat i producció barata de biomassa) cal afegir la facilitat de transport i d'emmagatzematge estable que permeten les llavors. S'ha demostrat que diverses proteïnes recombinants, incloent-hi anticossos i vacunes, s'acumulen en bona quantitat a les llavors, on es mantenen funcionals al llarg dels anys en condicions ambientals.

Les llavors més utilitzades es corresponen amb els cultius de gra més estesos arreu del món, els cereals en primer lloc i a bona distància els llegums. Cal destacar que aquestes llavors són objecte de consum directe i, per tant, presenten bones perspectives d'aplicació en vacunacions, apor-

tació de nutracèutics i tractament de malalties per via oral (Nochi *et al.*, 2007). En aquests casos no cal purificar el producte i, en conseqüència, s'abarateix extraordinàriament la producció.

El blat de moro i l'arròs són els cereals més utilitzats en les plataformes industrials de producció de proteïnes en llavors. Ambdós tenen avantatges, com són un gran rendiment anual de gra, la disponibilitat de sistemes de transformació eficients que inclouen l'ús de promotors ben caracteritzats, i l'existència de pràctiques agrícoles de cultiu, recollecció i emmagatzement molt ben establertes. El principal inconvenient que té el blat de moro és que és una planta de pol·linització creuada i, per tant, un cop transformat està sotmès a importants restriccions normatives que en regulen el creu. L'arròs, per contra, és una planta que s'autopol·linitza i que, per tant, presenta baix risc de flux genètic amb espècies relacionades. A la taula 1 es mostren algunes de les proteïnes recombinants obtingudes utilitzant les llavors transgèniques de blat de moro i d'arròs com a biofactories, i s'assenyalen les seves aplicacions i les empreses o grups acadèmics implicats en l'estudi i la producció. La primera proteïna recombinant comercialitzada produïda en plantes, l'avidina, es va obtenir de blat de moro transformat amb el gen corresponent del pollastre (Hood *et al.*, 1997). Des de llavors s'han llençat al mercat diverses proteïnes d'aplicació industrial produïdes en cereals, com la tripsina, la laccasa o la cel·lulasa (vegeu la taula 1). També s'han dut a terme diferents plataformes tecnològiques empresarials per produir proteïnes d'aplicació terapèutica, algunes en fases molt avançades de les proves clíniques requerides pels organismes sanitaris pertinents (com la vacuna Lt-B, la lactoferrina i el lisozim, vegeu la taula 1).

El tercer cereal utilitzat com a bioreactor és l'ordi. Encara que el seu rendiment en gra és menor que el del blat de moro i l'arròs, la seva producció és també més barata i s'autopol·linitza. Algunes empreses l'han inclòs en les seves plataformes tecnològiques (com Ventria Bioscience), i dues empreses d'Islàndia, ORF Genetics i Maltagen, l'han adoptat com a sistema de producció aprofitant l'avinentesa que la flora local no permet pol·linització creuada amb l'ordi (Sparrow *et al.*, 2007). L'entorn islandès, doncs, és un bon sistema natural de confinament per a l'ordi transgènic.

Els llegums es troben a gran distància dels cereals pel que fa al seu ús per a la producció i comercialització de proteïnes recombinants. Els casos més estudiats són el pèsol i la soja, tots dos autopollinitzants i amb un gran contingut de proteïnes a les seves llavors (30-40 % del pes). Entre els resultats més prometedors trobem uns bons nivells d'acumulació d'anticossos expressats en el pèsol (Saalbach *et al.*, 2001), la vacuna Lt-B i un pèptid hipotensor a les llavors de soja transformada (Moravec *et al.*, 2007; Yamada *et al.*, 2008). El desenvolupament dels llegums com a biofactories està encara retardat i, en particular, manca un bon mètode de transformació de la soja (Lau i Sun, 2009).

Finalment, cal esmentar el paper que tenen les llavors de plantes oleaginoses en les plataformes tecnològiques de producció de proteïnes recombinants. Les llavors oleaginoses, com les de la colza, el gira-sol o el càrtam (o safrà bord), tenen una característica que les fa útils com a bioreactors. Aquestes llavors emmagatzemen els olis en uns òrgans anomenats *coscos oleics* (*oil bodies*), que tenen una proteïna de membrana, l'oleosina, ben caracteritzada. L'empresa SemBioSys disposa d'una tecnologia basada en la fusió de l'oleosina a la proteïna d'interès que facilita l'extracció dels

TAULA 1. Exemples significatius de proteïnes industrials i terapèutiques produïdes en llavors

Llavor	Producte	Aplicació	Empresa o grup acadèmic
Blat de moro	Avidina	Diagnòstic	Prodigene i Sigma
	Tripsina	Enzim industrial	Prodigene i Sigma
	Peroxidasa	Enzim industrial	Applied Biotech Institute
	Laccasa	Enzim industrial	Applied Biotech Institute
	Cellulasa	Enzim industrial	Applied Biotech Institute
	Avicidina (anticòs)	Càncer colorectal	NeoRx/Monsanto
	Vacuna Lt-B	Diarrea	Prodigene
	Vacuna HN	Virus Newcastle	Guerrero-Andrade <i>et al.</i> , 2006
Arròs	Seroalbúmina humana	Cirrosi, cirurgia	Ventria Biosciences
	Lactoferrina	Nutrició infantil i diarrea	Ventria Biosciences
	Lisozim	Nutrició infantil i diarrea	Ventria Biosciences
	Toxina B del còlera	Còlera	Nochi <i>et al.</i> , 2007
	Vacuna proteïna SS1	Hepatitis B	Qian <i>et al.</i> , 2008
Càrtam	Insulina	Diabetis	SemBioSys
	Somatotropina de carpa	Additiu piscifactoria	SemBioSys

Dades tretes de Lau i Sun, 2009; Spök *et al.*, 2008; Ramessar *et al.*, 2008; Basaran i Rodríguez-Cerezo, 2008, i de les webs de les empreses.

productes i n'abareixen la purificació. La planta més utilitzada és el càrtam, i cal destacar l'entrada en el mercat de la somatotropina de la carpa i la producció d'insulina (vegeu la taula 1). Aquesta proteïna terapèutica es troba en fase molt avançada de les proves clíniques i podria ser comercialitzada vora el 2011 (vegeu la taula 1).

Aquestes espècies vegetals no són exclusives; n'hi ha d'altres emergents que s'investiguen actualment en diverses companyies, com les algues, les moltes i els cultius de cèl·lules vegetals, perquè ofereixen dos avantatges importants: a) d'acord amb la demanda social, permeten confinar els organismes modificats genèticament i b) d'acord amb la regulació vigent per a la producció de proteïnes terapèutiques,

aquests sistemes poden créixer en un entorn que protegeix el medi ambient.

## MOLSES

Són organismes pluricel·lulars eucariotes i, per tant, amb capacitat per processar posttraduccionalment proteïnes, com per exemple, formar ponts disulfur, glicosilacions, etc. *Physcomitrella patens* és una de les moltes més emprades per la seva facilitat de transformació via transfecció de protoplasts. És una planta fotòtrofa fàcil de fer créixer en suspensions cel·lulars i en condicions estrictament controlades (Shaefer *et al.*, 1997). Una de les característiques interessants de *P. patens* és que és possible

mantenir aquesta molsa en l'estat haploide tant en cultiu líquid com en cultiu sòlid. Així, després de la transformació s'aconseguiran cultius cellulars estables que mantinguin el nivell de proteïna recombinant requerit durant llargs períodes de temps. La producció de proteïnes recombinants es pot incrementar afegint a les construccions genètiques un pèptid senyal, que farà que la proteïna se secreti fora de les cèl·lules. En aquest cas, la purificació de la proteïna recombinant es farà molt més efectiva i menys costosa. Fins ara, han estat produïdes amb aquest sistema diverses proteïnes terapèutiques, com per exemple, factors de creixement humans, seroalbúmina humana i anticossos (Baur *et al.*, 2005; Weise *et al.*, 2007). L'avantatge fonamental d'aquesta molsa és que és l'únic cas, dels analitzats fins ara en plantes pluricel·lulars, que admet la recombinació homòloga en el seu DNA nuclear, i alhora és un procés eficient. Això representa una eina molt valuosa per dirigir la introducció de gens exògens i per a l'eliminació de gens no desitjats (genoanul·lació). Aquesta eina ha fet que la producció de proteïnes recombinants en *P. patens* estigui molt desenvolupada, especialment per la possibilitat de modificar els processos de glicosilació de proteïnes introduint o eliminant gens d'enzims de glicosilació. Així, una soca de *P. patens* ha estat modificada genèticament, de manera que no pot afegir els sucres 1,2-xilosa ni 1,3-fucosa a les proteïnes recombinants (perjudicials per a humans), però sí que pot afegir sucres idèntics als que afegeixen a les proteïnes els humans. Altres avantatges són que es poden produir proteïnes en suspensions cel·lulars (confinament) i una optimització quantitativa dels nivells de producció (Shuster *et al.*, 2007).

## ALGUES

Les algues, eucariotes unicel·lulars, esdevenen hostes emergents per a la producció de proteïnes recombinants. *Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Traselmis suecica* i *Odontella aurita* poden produir quantitats considerables de proteïnes recombinants (Franklin i Mayfield, 2004). De fet, *C. reinhardtii* es pot fer créixer a gran escala, per exemple en contenidors de 500.000 l, a cost molt baix. Comparant-les amb les plantes de terra, les algues tenen un creixement molt més ràpid, dupliquen el nombre de cèl·lules cada 4-8 h i, a més, la purificació de les proteïnes recombinants es fa més fàcil i el tipus i la mida de les cèl·lules és uniforme; per tant, no hi ha un gradient d'expressió de les proteïnes degut a diferències d'expressió en teixits diferents de la planta. Tot això facilita la purificació de proteïna i redueix la pèrdua de biomassa. *C. reinhardtii* pot produir proteïnes recombinants i secretar-les al medi, de manera que redueix els costos de producció. S'ha produït en aquest organisme un anticòs humà; les dues cadenes es van acoblar correctament i l'anticòs era capaç de reconèixer les proteïnes del virus de l'herpes (Mayfield *et al.*, 2003; Mayfield i Franklin, 2005). Una altra possibilitat per utilitzar *Chlamydomonas* com a hoste és la producció de proteïnes recombinants en el seu cloroplast. La introducció d'un gen exogen dins el genoma propi dels cloroplasts, com veurem més endavant, permet expressar proteïnes dins aquest orgànu. *C. reinhardtii* té un únic cloroplast enorme (ocupa el 40 % del volum de la cèl·lula). La transformació del genoma d'aquest orgànu d'algues es va fer al final dels anys vuitanta (Boynton *et al.*, 1988). Aquesta estratègia de transformació de plastidis té l'inconvenient que les proteïnes codificades en el genoma dels cloroplasts no estan

glicosilades i, per tant, impedeix produir proteïnes recombinants que requereixen l'addició de sucres. També, s'ha de considerar que l'ús de codons de les algues està esbiaixat respecte al de moltes plantes, i per tant cal modificar la seqüència del DNA que introduïm perquè es tradueixi eficaçment en aquest organisme.

### *Lemna*

*Lemna gibba* i *Lemna minor*, anomenades lleties d'aigua, són plantes que floten i es desenvolupen a l'aigua a molts indrets del món. A causa de les seves condicions senzilles de creixement, aquestes plantes s'adapten perfectament al cultiu intensiu i, per tant, ofereixen la possibilitat de produir grans quantitats de biomassa per unitat de temps. De fet, *Lemna* duplica la seva mida cada 24-48 hores. Es poden transformar genèticament emprant mètodes de bombardeig de partícules o via *Agrobacterium*. Les proteïnes recombinants produïdes en *Lemna* es poden purificar directament de la planta o bé, si es vol, utilitzar la planta directament fresca o assecada. Com en el cas d'altres hostes, *Lemna* permet la secreció de la proteïna al medi sempre que la construcció de DNA introduïda contingui un pèptid senyal (Gasdaska *et al.*, 2003). *Lemna* té la capacitat de modificar posttraduccionalment les proteïnes heteròlogues expressades, i també és capaç d'expressar i processar proteïnes terapèutiques complexes, com anticossos monoclonals humans. L'activitat d'aquest anticòs és semblant en el mateix anticòs produït en cultius cel·lulars animals (cèl·lules CHO) (Cox *et al.*, 2006).

## SUSPENSIONS CEL·LULARS DE PLANTES SUPERIORS

Fins als anys vuitanta, els cultius cel·lulars es van utilitzar fonamentalment per a la producció de metabòlits secundaris amb valor terapèutic, com el taxol, l'ajmalicina i la shikonina (Honda *et al.*, 1988). Els cultius cel·lulars de plantes superiors ens ofereixen avantatges respecte de les plantes cultivades al terra o fins i tot de les crescudes en hivernacles, ja que poden créixer en condicions controlades i estèrils per evitar la contaminació de patògens animals, plaguicides i fertilitzants. A diferència de les plantes transgèniques, que triguen mesos a créixer, els cultius cel·lulars poden créixer molt ràpidament; per exemple, les cèl·lules BY-2 de tabac dupliquen el seu nombre cada 12 h en condicions òptimes de creixement. De fet, una gran quantitat de proteïnes terapèutiques han estat produïdes amb aquest sistema. El seu potencial ha estat recentment demostrat amb l'expressió d'al·lèrgens d'àcars, altament immunoreactius i correctament modificats posttraduccionalment. Un altre exemple, en aquest cas amb cultius de cèl·lules de pastanaga, és la producció d'un enzim, la glucocerebrosidasa, producte terapèutic aplicat a pacients amb la malaltia de Gaucher (Shaaltiel *et al.*, 2007). L'empresa d'Islàndia Protalix està produint aquest enzim, amb el nom de *taliglucerasa alfa*, en cultius cel·lulars de pastanaga. Actualment el producte està en les darreres fases d'assajos clínics per ser aprovat per la FDA.

Per a la producció de proteïnes recombinants en cultius cel·lulars es requereixen instal·lacions costoses, fermentadors, sales de cultiu estèrils, etc. La inversió econòmica pot encarir tot el procés i finalment el producte, si ho comparem amb proteïnes produïdes en plantes al terra. De totes maneres, cal considerar que el procés de puri-



ficació de les proteïnes és molt més eficient si la biomassa prové de cultius cellulars que si prové de plantes senceres o de gra. De fet, el procés de purificació d'una proteïna recombinant a partir de biomassa vegetal representa un 80 o un 90 % del cost final del producte (Kusnadi *et al.*, 1997). Tenint en compte aquest aspecte i el valor afegit del producte caldria analitzar molt bé quina estratègia és la menys costosa. Com en el cas de les algues, els cultius cellulars de plantes superiors són uniformes en tipus i mida, i aquest fet és molt important per al processament posterior de la biomassa. La proteïna produïda en aquestes cèl·lules tindrà característiques moleculars homogènies. Així, a diferència de les plantes transgèniques crescudes a terra, en què una modificació posttraduccional, com la glicosilació, pot ser diferent en plantes joves i en plantes velles, en cultius cellulars probablement la proteïna produïda tindrà una glicosilació homogènia.

### **Estratègies per incrementar els rendiments i la purificació de les proteïnes recombinants**

Una de les limitacions del sistema d'expressió en plantes són els baixos rendiments detectats per algunes proteïnes terapèutiques. S'han desenvolupat diferents estratègies per millorar els rendiments: des de l'optimització de l'ús de codons fins a la manipulació del transport subcel·lular de les proteïnes.

**Optimització de l'ús de codons.** Per millorar la fidelitat de la traducció de la proteïna recombinant en plantes pot ser important adaptar la seqüència codificant de la proteïna que volem expressar a la utilitzada normalment per la planta hoste (Hamada *et al.*, 2005). Per exemple, l'expressió en tabac i tomàquet d'un gen bacterià (el

*cryIA*) modificat parcialment (un 3 % de la seva seqüència) o totalment (un 21 % modificat) s'expressava entre deu i cent vegades més en plantes sense modificar (Perlak *et al.*, 1991).

**Supressors del silenciament gènic post-transcripcional.** El silenciament de l'RNA, també anomenat *silenciament gènic post-transcripcional en plantes* (PTGS), té un paper molt important en la defensa de molts organismes eucariotes contra les infeccions víriques. Els virus produeixen proteïnes que tenen l'habilitat de suprimir el silenciament de l'RNA de la cèl·lula hoste (Voinnet, 2005). Per exemple, cada virus específic de plantes sembla que produeix el seu supressor del silenciament propi i, actualment, se n'estan caracteritzant un gran nombre (les proteïnes HC-Pro, p19, p25, etc.). Avui dia la més ben caracteritzada és la p19, codificada pel virus del nanisme ramificat del tomàquet (TBMV) (Sholthof *et al.*, 1995). El silenciament no tan sols pot tenir lloc per la presència del virus, sinó que també es pot iniciar per la presència de gens exògens. Per tant, en plantes transgèniques el silenciament està dirigit als transcrits del transgèn, i això provoca una davallada de l'expressió del producte. Aquest fenomen es pot evitar expressant simultàniament un supressor del silenciament i el gen exogen. El rendiment d'expressió del producte pot augmentar fins a cinquanta vegades (Voinnet *et al.*, 2003).

**Expressió de proteïnes recombinants dirigida a orgànuls o compartiments subcel·lulars.** Representa una estratègia per incrementar els nivells d'expressió i simplificar els primers passos de purificació de la proteïna. En aquest context, ha estat molt eficient l'expressió de proteïnes recombinants dirigides al reticle endoplasmàtic (RE), al cloroplast, al vacúol i als cossos oleics (*oil bodies*). Generalment, les proteïnes s'han expressat en teixits vegetals que

permeten una gran producció de biomassa; per exemple, en fulles de tabac, alfals o altres llegums. En patata, blat de moro, soja, blat o arròs, la proteïna s'expressa específicament a la llavor o als tubercles. Cada estratègia té els seus avantatges i els seus inconvenients. Les empreses productores han escollit sistemes diferents; així, Dow AgroSciences i Protalix produeixen les proteïnes en cultius cellulars per transformació nuclear, Bayer en tabac per transformació vírica i cloroplàstica, Medicago en tabac per transformació nuclear, SemBioSys en gira-sol per transformació nuclear i Ventia en arròs i ordi per transformació nuclear.

*Secreció.* La secreció a l'espai intracel·lular o apoplast ha estat i és actualment una de les estratègies emprades per a la producció de moltes proteïnes recombinants. Només cal afegir a la seqüència dels gens exògens un pèptid senyal a l'N-terminal que li permetrà l'entrada a l'RE i la secreció posteriorment. Els cultius de cèl·lules vegetals són el sistema idoni per a la producció per secreció, eviten el processament complicat de biomassa i faciliten el procés de purificació de la proteïna.

*Reticle endoplasmàtic.* Mentre que la secreció per defecte d'una proteïna dins el sistema d'endomembranes tan sols depèn del pèptid senyal, l'expressió i el transport a altres compartiments de la via de secreció (RE, vacúols) requereixen pèptids senyal addicionals. L'RE vegetal és molt plàstic i tolera grans acumulacions de proteïna sense que quedi malmès el desenvolupament o la reproducció de la planta. L'expressió de proteïnes recombinants a l'RE ha estat àmpliament utilitzada, incrementa l'estabilitat proteica i, en conseqüència, incrementa els nivells d'expressió comparats amb els nivells que s'obtenen per secreció (Wandelt *et al.*, 1992). De fet, l'únic senyal per retenir una proteïna exògena a l'RE és,

a part del pèptid senyal, un tetrapèptid (H/KDEL) que s'afegirà al C-terminal de la seqüència. Aquesta estratègia ha estat eficaç per a l'expressió d'immunoglobulines, vacunes i altres proteïnes terapèutiques (Ko *et al.*, 2003).

*Cossos lipídics: proteïnes de fusió.* Els cossos lipídics són uns orgànuls que s'originen a l'RE i que acumulen lípids en les llavors de les plantes. Estan envoltats d'una monocapa de fosfolípids en contacte directe amb els lípids acumulats a dintre. Aquesta membrana de fosfolípids conté una proteïna transmembrana molt abundant, l'oleosina. Les parts N-terminal i C-terminal estan localitzades al citoplasma i la part central dins la membrana lipídica. Les fusions proteiques N-terminals o C-terminals d'oleosina a proteïnes d'interès s'expressaran en els cossos lipídics de la llavor mirant cap al citoplasma. L'avantatge d'aquest sistema és que les proteïnes recombinants es poden aïllar fàcilment d'altres proteïnes de la llavor per flotació (els cossos lipídics són menys densos que l'aigua). Un inconvenient d'aquest sistema és que la proteïna, en estar expressada mirant al citoplasma, no es pot aprofitar de les modificacions posttraduccionals que li podria oferir l'RE —formació de ponts disulfur, glicosilacions i la interacció amb proteïnes de tipus xaperones per a l'estructuració correcta (Parmenter *et al.*, 1995).

*Cossos proteics: proteïnes de fusió.* Les llavors emmagatzemen una quantitat enorme de proteïnes en uns orgànuls envoltats de membrana anomenats *cossos proteics* (PB). Aquests orgànuls poder tenir un origen vacuolar (PSV) o bé de l'RE. Les prolamines, una de les famílies de proteïnes de reserva de la llavor dels cereals, s'acumulen a l'RE, on s'agregen i formen PB. L'activitat proteolítica d'aquests orgànuls és molt baixa perquè evita que les proteïnes entrin en el cicle de control de qualitat de l'RE (*ER-as-*

*sociate degradation*, ERAD) (Tsai *et al.*, 2002); per tant, és una diana molt eficaç per acumular proteïnes recombinants. Recentment s'han desenvolupat diferents tecnologies que permeten expressar i acumular proteïnes terapèutiques en cossos proteics induïts en cèl·lules diferents de les cèl·lules de la llavor, com per exemple en teixits vegetatius. Sorprenentment, plantes transgèniques d'*Arabidopsis thaliana* transformades amb el domini N-terminal ric en prolina de g-zeïna, una proteïna de reserva de blat de moro, expressaven de manera estable aquest domini i l'acumulaven en cossos proteics. Els cossos proteics «induïts» eren semblants als originals de la llavor de blat de moro, però en aquest cas presents en cèl·lules de la fulla (Geli *et al.*, 1994). Aquest fenomen va estimular el desenvolupament d'una tecnologia, Zera, per a la producció de proteïnes recombinants basada en la fusió del pèptid Zera a l'N-terminal de la proteïna d'interès i l'expressió en plantes. Zera és una seqüència polipeptídica de noranta-tres aminoàcids que conté: *a*) el pèptid senyal de g-zeïna, *b*) un domini repetitiu de vuit unitats de Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu, *c*) un altre domini ric en prolina amb seqüència Pro-X (X és qualsevol aminoàcid) i *d*) sis cisteïnes distribuïdes al llarg de la seqüència. El més interessant és que l'expressió i acumulació de les proteïnes fusionades a Zera no tan sols indueixen la formació de PB en sistemes vegetals, sinó que també ho fan en cèl·lules d'insectes, fongs i cultius cel·lulars animals (Torrent *et al.*, 2009b). Aquesta estratègia presenta tres avantatges importants per a la producció de proteïnes recombinants: *a*) les proteïnes fusionades a Zera romanen estables en els cossos proteics (Alvarez *et al.*, 2010), *b*) els PB formats *de novo* són orgànuls densos que es poden aïllar fàcilment per densitat, fet que facilita enormement la recuperació de la proteïna (Torrent *et al.*, 2009a) i *c*) la

presència d'aquests PB no afecta el creixement normal de la planta. La introducció d'una seqüència de consens d'un lloc de tall per a una proteasa específica entre Zera i la proteïna d'interès permet, després de l'aïllament dels PB, alliberar Zera i purificar la proteïna recombinant per mètodes clàssics de purificació de proteïnes. L'empresa ERA Biotech actualment desenvolupa i comercialitza la tecnologia Zera per a la producció de proteïnes terapèutiques, enzims i proteïnes industrials (vegeu les figures 1 i 2).

Darrerament s'han descrit altres tecnologies basades en proteïnes de fusió. Un exemple en són els biopolímers sintètics derivats de l'elastina de mamífers (ELP), que contenen una repetició del pentapèptid VPGXG i que, fusionats a una proteïna d'interès, es transporten a l'RE del tabac. La proteïna de fusió expressada s'acumula en cossos proteics (Conley *et al.*, 2009b), que es poden aïllar per *inverse transition cycling* (ITC) (Conley *et al.*, 2009a). El procés de recuperació de la proteïna i la purificació són, però, cars i difícils.

Un altre exemple recent són les fusions gèniques d'hidrofobines a proteïnes d'interès i la seva expressió en plantes de tabac. Les hidrofobines són unes proteïnes petites secretades en fongs. L'estabilitat de la proteïna està determinada per les vuit cisteïnes presents a la seva seqüència que formen ponts disulfur intramoleculars. En la natura les hidrofobines tenen tendència a autoacoblar-se i confereixen un cert grau d'hidrofobicitat a les hifes dels fongs, fet que els permet créixer (Wang *et al.*, 2005). Aquestes proteïnes, un cop fusionades a les proteïnes d'interès, poden modificar la hidrofobicitat de la proteïna d'interès quan s'expressen en plantes. Això permet que, un cop expressada la proteïna quimèrica, es pugui purificar de la biomassa vegetal amb un sistema de partició en dues fases

de surfactants i medi aquós (ATPS). El sistema concentra d'una manera fàcil i barata les fusions d'hidrofobina dins les micelles formades, i es recupera en la fase del surfactant (Linder *et al.*, 2002).

## TRANSFORMACIÓ DE CLOROPLASTS

En les plantes superiors els plastidis tenen el seu genoma propi (plastoma), que oscilla entre 120 i 180 quilobases, i és poliploide, és a dir, una cèl·lula pot tenir entre

1.000 i 10.000 còpies idèntiques del plastoma. Aquestes peculiaritats han motivat l'interès per desenvolupar tècniques de transformació de cloroplasts per a la producció de proteïnes recombinants. La transformació es basa fonamentalment en la inserció del gen escollit mitjançant el bombardeig de partícules sobre el teixit verd, la recombinació homòloga posterior que tindrà lloc entre seqüències fronteres al gen d'interès i les seqüències diana del genoma dels cloroplasts, i finalment l'eliminació de les còpies del plastoma no transformades en medis selectius (Maliga

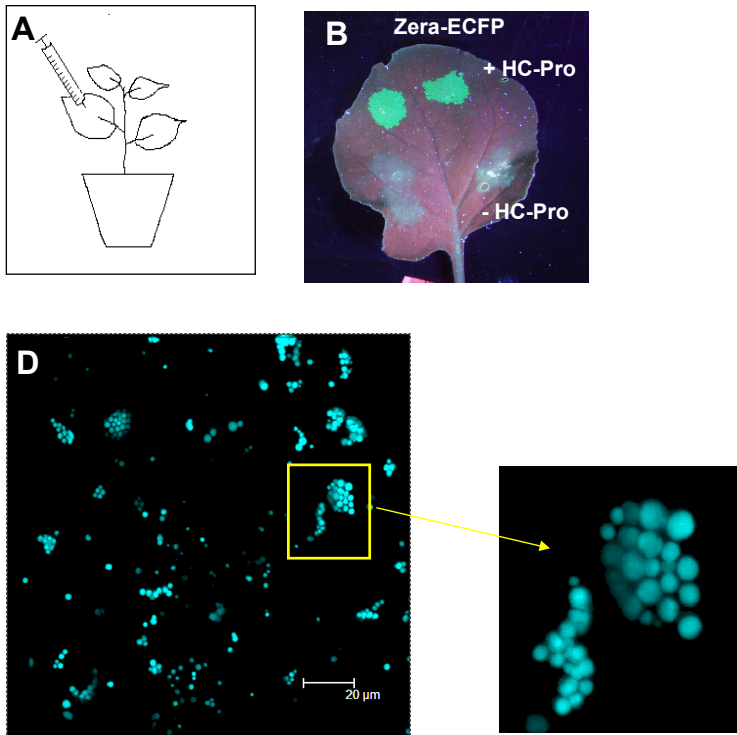


FIGURA 1. Cossos proteics induïts en cèl·lules epidèrmiques de fulles de tabac (*N. benthamiana*). Transformació transitòria per agroinfiltració amb una xeringa (A i B) amb el gen de fusió: Zera-proteïna fluorescent (ECFP) i un supressor de silenciament (HcPro). Es pot observar la diferència del nivell d'expressió cotransformant o no amb el gen víric *HcPro*. L'expressió del gen està dirigida pel promotor constituïtiu CaMV 35S. Imatge al microscopi confocal dels cossos proteics plens de proteïna fluorescent formats a les fulles de tabac (D) (vegeu l'ampliació).

*et al.*, 2004; Bock *et al.*, 2007; Koop *et al.*, 2007).

La inserció d'un gen exogen (transgèn) en el genoma dels cloroplasts permet normalment una acumulació de la proteïna recombinant molt elevada, que podria fluctuar entre el 2 i el 70 % de la proteïna total soluble (TSP) (Oey *et al.*, 2008; Fernandez-SanchezMillan *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008) i d'altres avantatges com la integració precisa dels transgens per recombinació homòloga, l'absència d'efectes epigenètics (silenciament gènic i efectes posicionals). A més, a causa de l'herència materna dels plastidis, evita la transmissió del transgèn pel pol·len de les plantes modificades genèticament a altres plantes, i garanteix així la contenció del transgèn (Svab i Maliga, 2007; Ruf *et al.*, 2007), aspecte especialment important quan parlem de producció de proteïnes terapèutiques. Encara que els cloroplasts tinguin un origen eucariota, recentment s'ha observat que tenen la capacitat de dur a terme la formació de ponts

disulfur i d'altres modificacions posttraduccionals (Bally *et al.*, 2008). La glicosilació, però, és una modificació que no es dona en cloroplasts i, per tant, no és possible la producció de glicoproteïnes.

## GLICOSILACIÓ

Més d'un terç de les proteïnes terapèutiques estan glicosilades. Com en altres sistemes de producció de proteïnes recombinants com cultius cel·lulars de mamífer, cèl·lules d'insecte o llevats, les plantes no són capaces d'efectuar el mateix tipus de glicosilació que fan les cèl·lules humanes. Hi ha dos tipus de glicosilació en proteïnes: la N-glicosilació i l'O-glicosilació. La N-glicosilació la pateixen només aquelles proteïnes que entren en l'RE (o dit d'una altra manera, en la ruta de secreció) i que tenen en la seva seqüència d'aminoàcids la seqüència de consens asparagina-X-serina o treonina (X és qualsevol aminoàcid excepte prolina i àcid aspàrtic). Les glicosidases i glicosiltransferases de l'RE afegeixen un complex de sucres en l'asparagina d'alt contingut en manosa (Man9-5GlcNAc2). Aquesta glicosilació és comuna en totes les cèl·lules eucariotes, incloent-hi les cèl·lules animals i vegetals. Però, en cèl·lules vegetals, els complexos de Man9-5GlcNAc2 es modificaran fora de l'RE, a l'aparell de Golgi, on s'afegeix  $\alpha$ -1,3-fucosa o  $\beta$ -1,2-xilosa. Aquestes modificacions no ocorren en les cèl·lules humanes, en què hi ha  $\alpha$ -1,6-fucosa i  $\beta$ -1,4-galactosa i àcid siàlic. La xilosa i la fucosa afegides en les proteïnes recombinants produïdes en plantes poden provocar al·lèrgies i, per tant, poden ser insegures si s'injecten en humans (Gomord *et al.*, 2005). S'estan utilitzant diferents tècniques per resoldre aquest problema. Una és expressar la proteïna a l'RE afegint-li, com hem comentat abans, la seqüència KDEL

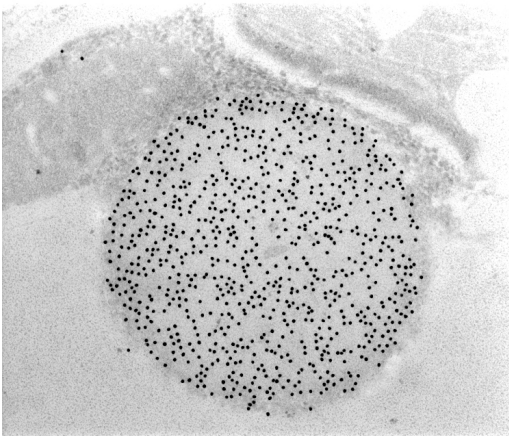


FIGURA 2. Immunocitoquímica al microscopi electrònic d'un cos proteic. Talls ultrafins de cèl·lules epidèrmiques de fulla de tabac transformades amb Zera-proteïna fluorescent incubades amb un anticòs anti-Zera i marcatge amb proteïna A conjugada amb or de 10 nm. S'observa un cos proteic ple de la proteïna recombinant.

(Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2007). Una via més econòmica és eliminar les glicosiltransferases que afegeixen fucosa i xilosa per tècniques de genoanul·lació. Aquest sistema s'ha emprat en la producció d'anticossos monoclonals en *Lemna* (Cox *et al.*, 2006) i d'un factor de creixement en moltes (Kaprivova *et al.*, 2004).

## BIOSEGURETAT, RISCOS I REGULACIONS

Encara ara, en el món industrialitzat s'utilitzen les fórmules més bàsiques de medicines que provenen de plantes, i que consisteixen fonamentalment en extractes o infusions de plantes senceres (remeis etnobotànics). Amb el pas dels anys, però, s'han estès els productes farmacèutics convencionals sintetitzats químicament i a hores d'ara també productes complexos produïts en bacteris o cèl·lules animals a partir de DNA recombinant (GMO). Actualment ja hi ha plataformes de producció de productes recombinants en plantes i, per tant, s'han creat regulacions específiques per a aquests productes. Desafortunadament, a causa de la percepció negativa del públic en general a les plantes modificades genèticament, és possible que s'alenteixin les necessitats reals de determinats productes terapèutics. El Servei Internacional per a l'Adquisició d'Aplicacions Agrobiotecnològiques (ISAAA, 2006, <http://www.isaaa.org>) preveu que cap al 2015 més de vint milions de pagesos plantaran, en quaranta països, dos-cents milions d'hectàrees de llavors modificades genèticament. Per això s'ha desenvolupat un sistema rigorós de bioseguretat per cobrir aquestes plantacions i poder donar unes bases serioses a la regulació que dirigirà la producció de productes en plantes modificades genèticament. La diferència fonamental entre la

primera generació de plantes transgèniques és que aquestes produïen millores econòmicament rentables (per exemple, resistència a herbicides) en plantes emprades normalment per a consum alimentari, tant humà com animal. La nova regulació permetrà produir a alts rendiments productes que no siguin per a consum humà i animal. Les proteïnes recombinants produïdes entraran dins la regulació de productes farmacèutics i es formularan com qualsevol producte final, seguint estrictament les bones pràctiques de manufactura (GMP) associades a la indústria farmacèutica i les seves regulacions a Europa —23/93/EU per a productes farmacèutics produïts per DNA recombinant: CPMP (2006), *Draft Guideline on the Quality of Biological Active Substances produced by stable transgene expression in higher plants*. European Agency for the evaluation of Medicinal products, EMEA—, equivalents a la Food and Drug Administration (FDA) dels Estats Units d'Amèrica. El fet que la regulació europea encara s'estigui elaborant és per la dificultat d'estandarditzar la terminologia emprada en dues àrees ben diferents: l'agricultura biotecnològica i la farmacèutica.

### Directives de la Comunitat Europea

*Regulacions ambientals:* 98/81/EC (aïllament en l'ús d'OMG); 2001/18/EC (alliberament al camp); 1829/2003/EC (comercialització).

*Regulació de productes farmacèutics:* 2001/10/EC (assajos clínics); 23/93/726/2004 (productes biotecnològics); 2001/82/2004/28/EC (medicines per a veterinària); 2001/83/2004/27/EC (medicines per a humans); 2004/24/EC (herbolaris).

Molts dels problemes que envolten la bioseguretat en plantes modificades genèti-

cament es deuen al fet que la societat vol que es garanteixi que no hi hagi barreja de plantes transgèniques amb no transgèniques, és a dir, preservar la identitat i un seguiment rigorós. Es necessita que la biologia de la producció en hostes vegetals tingui en compte l'impacte ambiental, la seguretat dels aliments i la salut humana. En el context de la bioseguretat s'ha d'escollir la millor opció, i això no vol dir la més econòmica ni la més rentable. Les plantes idònies per a bioseguretat inclouen aquelles que tenen esterilitat masculina (com algunes varietats de patata), les que no permeten encreuar-se amb les seves homòlogues no transgèniques (com la soja en alguns països) i plantes que no entren en la cadena alimentària (tabac). Com hem comentat abans, les plantes que no es cultiven normalment com per exemple, *Lemna*, podrien tenir molts avantatges. El teixit vegetal on s'expressi la proteïna també té la seva importància. Així, les llavors redueixen la possibilitat que els herbívors i altres organismes que s'aprofiten de les fulles s'exposin al producte. De totes maneres, l'expressió en fulles permet recollir la biomassa abans que la planta floreixi, i així s'evita la dispersió del pol·len i la dispersió de llavors. Als Estats Units i el Canadà ha estat prohibit l'ús de colza i alfals transgènic perquè són espècies pollinitzades per abelles, es poden encreuar amb espècies locals no transgèniques i tenen dormància plurianual.

La localització de les plantes transgèniques també té la seva importància. Reduirem el risc de contaminació ambiental si les plantes creixen confinades. Aquelles proteïnes terapèutiques que han estat produïdes en plantes en un medi confinat tenen més probabilitats de ser aprovades per les regulacions que hi ha actualment. Normalment les plantes productores de productes farmacèutics no són l'objectiu dels

pagesos: són productes d'alt valor afegit, que no necessiten grans extensions de cultiu i que normalment es produeixen amb condicions de confinament rigorós.

Cal considerar que la transparència és un requisit important en qualsevol procés regulador. En la majoria de països cal demanar permisos o l'aprovació de les autoritats competents tant en el cas d'alliberament al camp com en el moment de la comercialització. Podeu trobar informació sobre això a Europa a <http://gmoinfo.jrc.it>. Els països on no hi ha regulació però que formen part del Protocol de Bioseguretat de Cartagena (<http://biodiv.org/biosafety>) han de notificar qualsevol moviment o transport de plantes modificades genèticament.

Les mesures que disminueixen el risc de producció per a un producte farmacèutic determinat depenen de diferents factors, com per exemple les propietats de la molècula, la biologia de l'hoste vegetal i el medi ambient on creix. Alguns mètodes per reduir els riscos (Sparrow *et al.*, 2007; Commandeur *et al.*, 2003) són:

- Preservació de la identitat, és a dir, l'ús de varietats particulars que siguin visualment diferents dels no transgènics, com tomàquets blancs, blat de moro de color porpra o llavors amb una proteïna marcador fluorescent.

- Aconseguir l'expressió de la proteïna després de la collita.

- Aïllament físic amb l'establiment de distàncies de cultiu amb espècies no transgèniques sexualment compatibles.

- Aïllament temporal, és a dir, cultiu de les plantes en períodes diferents per evitar el risc que s'encreuin.

- Eliminació física de les flors (s'utilitza actualment en blat de moro).

El control d'aquestes pràctiques l'està duent a terme als Estats Units l'agència APHIS. El control inclou el pla de conten-

ció per a la producció del producte, la manipulació i el transport de les plantes. Si són llavors, el temps de pollinització, la collita, la destrucció de la part vegetativa de la planta, el transport, el confinament, i l'ús de les instal·lacions per a l'emmagatzematge.

Finalment és important considerar que les proteïnes terapèutiques tenen un potencial intrínsec d'induir reaccions immunoal·lèrgiques no desitjades. Això és especialment rellevant si es tracta d'una administració via venosa d'aquests productes, tant els produïts en bacteris com els produïts en cultius animals o en plantes. El fet que hi hagi al·lèrgies alimentàries suggereix que els productes produïts en plantes poden provocar seriosos problemes d'hipersensibilitat, encara que restringits a pocs pacients. Per tant, cal utilitzar els mateixos mètodes emprats per controlar el risc associat a l'expressió de proteïnes recombinants en bacteris i cèl·lules animals per a proteïnes terapèutiques derivades de plantes.

## BIBLIOGRAFIA

- ALAMILLO, J. M.; MONGUER, W.; SOLA, I.; GARCÍA, B.; PERRIN, Y.; BESTANGO, M.; BURRONE, O. R.; SABELLA, P.; PLANA-DURÁN, J.; ENJUANES, L.; LOMONOSOFF, G.; GARCÍA, J. A. (2006). «Use of virus vector for the expression in plants of active full length and single chain anti-coronavirus antibodies». *Biotechnol. J.*, 1: 1103-1111.
- ALVAREZ, M. L.; TOPAL, E.; MARTÍN, F.; CARDINEAU, G. A. (2010). «Higher accumulation of F1-V fusion recombinant protein in plants after induction of protein body formation». *Plant Mol. Biol.*, 72: 75-89.
- BALLY, J.; PAGET, E.; DROUX, M.; JOB, C.; DUBALD, M. (2008). «Both the stroma and thylakoid lumen of tobacco chloroplasts are competent for the formation of disulfide bonds in recombinant proteins». *Plant Biotechnol. J.*, 6: 46-61.
- BASARAN, P.; RODRÍGUEZ-CEREZO, E. (2008). «Plant molecular farming: opportunities and challenges». *Crit. Rev. Biotech.*, 28: 153-172.
- BAUR, A.; RESKI, R.; GORR, G. (2005). «Enhanced recovery of a secreted recombinant human growth factor using stabilizing additives and by co-expression of human serum albumin in the moss *Physcomitrella patens*». *Plant Biotechnol. J.*, 3: 331-340.
- BOCK, R. (2007). «Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming». *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18: 100-106.
- BOYNTON, J. E.; GILLHAM, N. W.; HARRIS, E. H.; HOSLER, J. P.; JOHNSON, A. M.; JONES, A. R.; RANDOLPH-ANDERSON, B. L.; ROBERTSON, D.; KLEIN, T. M.; SHARK, K. B. (1988). «Chloroplast transformation in *Clamydomonas* with high velocity microprojectiles». *Science*, 240: 1534-1538.
- COMMANDEUR, U.; TWYMAN, R. M.; FISHER, R. (2003). «The biosafety of molecular farming in plants». *AgBiotechNet*, 5: 1-9.
- CONLEY, A. J.; JOENSUU, J. J.; JEVIKAR, A.; MENASSA, R.; BRANDLE, J. E. (2009a). «Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants». *Biotechnol. Bioeng.*, 103: 562-573.
- CONLEY, A. J.; JOENSUU, J. J.; MENASSA, R.; BRANDLE, J. E. (2009b). «Induction of protein body formation in plant leaves by elastin-like polypeptide fusions». *BMC Biol.*, 7: 48.
- COX, K. M.; STERLING, J. D.; REGAN, J. T.; GASDASKA, J. R.; FRANTZ, K. K.; PEELE, C. G.; BLACK, A.; PASSMORE, D.; MOLDOVAN-LOOMIS, C.; SRINIVASAN, M.; CUISON, S.; CARDARELLI, P. M.; DICKEY, L. F. (2006). «Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*». *Nat. Biotechnology*, 24: 1591-1597.
- FANG, R. X.; NAGY, F.; SIVASUBRAMANIAM, S.; CHUA, A. H. (1989). «Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mvirus 35S promoter in transgenic plants». *Plant Cell*, 1: 141-150.
- FERNANDEZ-SANCHEZ MILLAN, A.; ORTIGOSA, S. M.; HERVAS-STUBBS, S.; CORRAL-MARTINEZ, P.; SEGUISIMARRO, J. M.; GAETAN, J.; COURSAGET, P.; VERAMENDI, J. (2008). «Human papilloma virus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic». *Plant Biotechnol. J.*, 6: 427-441.
- FISHER, R.; STOGER, E.; SSHILLBERG, S.; CHRISTOU, P.; TWYMAN, R. M. (2004). «Plant-based production of biopharmaceuticals». *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 7: 152-158.



- FRANKLIN, S. E.; MAYFIELD, S. P. (2004). «Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas*». *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7: 159-165.
- GASDASKA, J. R.; SPENCER, D.; DICKEY, L. F. (2003). «Advantages of therapeutic protein production in the aquatic plant *Lemma*». *Bioprocessing J.*, 3: 50-56.
- GELI, M. I., TORRENT, M.; LUDEVID, D. (1994). «Two structural domains mediate two sequential events in  $\gamma$ -zein targeting: protein endoplasmic retention and protein body formation». *Plant Cell*, 6: 1911-1922.
- GOMORD, V.; CHAMBERLAIN, P.; JEFFERIS, R.; FAYE, L. (2005). «Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities». *Trends Biotechnol.*, 23: 559-565.
- GOMORD, V.; FAYE, L. (2004). «Post-translational modification of therapeutic proteins in plants». *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7: 171-181.
- GOMORD, V.; SOURROUILLE, C.; FITCHETTE, A. C.; BARDOR, M.; PAGNY, S.; LEROUGE, P.; FAYE, L. (2004). «Production and glycosylation of plant made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge». *Plant Biotechnol. J.*, 2: 83-100.
- GUERRERO-ANDRADE, O.; LOZA-RUBIO, E.; OLIVERA-FLORES, T.; FEHERVARI-BONE, T.; GOMEZ-LIM, M. A. (2006). «Expresión of the newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies». *Transgenic Res.*, 15: 455-463.
- HAMADA, A.; YAMAGUCHI, K. I.; OHNISHI, N.; HARADA, M.; NIKUMARU, S.; HONDA, H. (2005). «High level production of yeast (*Schwanniomyces occidentalis*) phytase in transgenic rice plants by a combination of signal sequence and codon modification of the phytase gene». *Plant Biotechnol. J.*, 3: 43-55.
- HONDA, G.; SAKAKIBARA, F.; YAZAKI, K.; TABATA, M. (1988). «Isolation of deoxyshikonine, an antidermatophytic principle from *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures». *J. Nat. Prod.*, 51: 152-154.
- HOOD, E. E.; WITCHER, D. R.; MADDOCK, S.; MEYER, T.; BASZCZYNSKI, C.; BAILEY, M.; FLYNN, P.; REGISTER, J.; MARSHALL, L.; BOND, D. (1997). «Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification». *Mol. Breed.*, 3: 291-306.
- HORSCH, R.; FRY, J. E.; HOFFMAN, N.; EICHOULTZ, D.; ROGERS, S.; FRALEY, R. (1985). «A simple and general method for transferring genes into plants». *Science*, 227: 1229-1231.
- KAPILA, J.; RYCKE, R. DE; MONTAGU, M. VAN; ANGENON, G. (1997). «An *Agrobacterium* mediated transient gene expression system for intact leaves». *Plant Sci.*, 122: 101-108.
- KAPRIVOVA, A.; STREMMER, C.; ALTMAN, F.; HOFFMANN, A.; KOPRIVA, S.; GORR, G.; RESKI, R.; DEKER, F. L. (2004). «Targeted knock-outs of *Physcomitrella* lacking plant specific immunogenic N-glycans». *Plant Biotechnol. J.*, 2: 517-523.
- KO, K.; TEKOAH, Y.; RUDD, P. M.; KOPROWSKI, H. (2003). «Function and glycosylation of plant derived antiviral monoclonal antibody». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 8013-8018.
- KOOP, H. U.; HERZ, S. GOLDS, T. J.; NICKELSEN, J. (2007). «The genetic transformation of plastids». *Top. Curr. Genet.*, 19: 457-510.
- KUSNADI, A. R.; NIKOLOV, Z. L.; HOWARD, J. A. (1997). «Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations». *Biotechnol. Bioeng.*, 56: 473-484.
- LAU, O. S.; SUN, S. S. M. (2009). «Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production». *Biotechnol. Adv.*, DOI 10.1016/j.biotechadv.2009.05.005.
- LINDER, M. B.; SZILVAY, G. R.; NAKARI-SETÄLÄ, T.; SÖDERLUND, H.; PENTTILÄ, M. (2002). «Surface adhesion of fusion proteins containing the hydrophobins HFBI and HFBII from *Trichoderma reesei*». *Protein Sci.*, 11: 2257-2266.
- MA, J. K.-C.; DRAKE, P. M.; CHRISTOU, P. (2003). «The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants». *Nat. Rev. Genet.*, 4: 794-805.
- MA, J. K.; BARROS, E.; BOCK, R.; CHRISTOU, P.; DALE, P. J.; DIX, P. J.; FISCHER, R.; IRWIN, J.; MAHONEY, R.; PEZZOTTI, M.; SCHILLBERG, S.; SPARROW, P.; STOGER, E.; TWYMAN, R. M. (2005). «Molecular farming for new drugs and vaccines. Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants». *EMBO Reports*, 6: 593-599.
- MA, J. K.; CHICKWAMBA, R.; SPARROW, P.; FISHER, R.; MAHONEY, R.; TWYMAN, R. M. (2005). «Plant-derived pharmaceuticals—the road forward». *Trends Plant Sci.*, 10: 580-585.
- MA, J. K.; HIATT, A.; HEIN, M.; VINE, N. D.; WANG, F.; STABILA, P.; DOLLEWEERD, C. VAN; MOSTOV, K.; LERNER, T. (1995). «Generation and assembly of secretory antibodies in plants». *Science*, 268: 716-719.
- MALIGA, P. (2004). «Plastid transformation in higher plants». *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55: 289-313.
- MAYFIELD, S. P.; FRANKLIN, S. E. (2005). «Expression of human antibodies in eukariotic micro-algae». *Vaccine*, 23: 1828-1832.
- MAYFIELD, S. P.; FRANKLIN, S. E.; LERNER, R. A. (2003). «Expression and assembly of a fully active

- antibody in algae». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 438-442.
- McCORMICK, A. A. [et al.] (1999). «Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 703-708.
- MENKHAUS, T. J.; BAI, Y.; ZHANG, C.; NIKOLOV, Z. L.; GLATZ, C. E. (2004). «Considerations for the recovery of recombinant proteins from plants». *Bio-technol. Prog.*, 20: 1001-1014.
- MORAVEC, T.; SCHMIDT, M. A.; HERMAN, E. M.; WOODFORD-THOMAS, T. (2007). «Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine». *Vaccine*, 25: 1647-1657.
- NOCHI, T.; TAKAGI, H.; YUKI, Y.; YANG, L.; MASUMURA, T.; MEJINA, M. (2007). «Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle free vaccination». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 10986-10991.
- OEY, M.; LOHSE, M.; KREKEMEYER, B.; BOCK, R. (2008). «Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic». *Plant J.*, 57: 436-445.
- PARMENTER, D. L.; BOOTHE, J. G.; ROOIJEN, G. J. VAN; YEUNG, E. C.; MOLONEY, M. M. (1955). «Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partition». *Plant Mol. Biol.*, 29: 1167-1180.
- PERLAK, F. I.; FUCHS, R. I.; DEAN, D. A.; MCPERSON, S. L.; FISCHHOFF, D. A. (1991). «Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 3324-3328.
- QIAN, B.; SHEN, H.; LIANG, W.; GUO, X.; ZHANG, C.; WANG, Y. (2008). «Immunogenicity of recombinant hepatitis B virus surface antigen fused with preS1 epitopes expressed in rice seeds». *Transgenic Res.*, 17: 621-631.
- RAMESSAR, K.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. (2008). «Molecular farming in cereal crops». *Phytochem. Rev.*, 7: 579-592.
- RUE, S.; KARCHER, D.; BOCK, R. (2007). «Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 6998-7002.
- SAALBACH, I.; GIERSBERG, M.; CONRAD, U. (2001). «High level expression of a single-chain Fv fragment (scFv) antibody in transgenic pea seeds». *J. Plant Physiol.*, 158: 529-533.
- SAINT-JORE-DUPAS, C.; FAYE, L.; GOMORD, V. (2007). «From planta to pharma with glycosilation in the toolbox». *Trends Biotechnol.*, 25: 317-323.
- SHAALTIEL, Y.; BARTFELD, D.; HASHMUELI, S.; BAUM, G.; BRILL-ALMON, E.; GALILI, G.; DYM, O.; BOLDIN-ADAMSKY, S. A.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L.; FUTERMAN, A. H.; AVIEZER, D. (2007). «Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant system». *Plant Biotechnol. J.*, 5: 579-590.
- SHAEFER, D. G.; ZRYD, J. P. (1997). «Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*». *Plant J.*, 11: 1195-1206.
- SHOLTHOF, H. B.; SHOLTH, K. B.; JACKSON, A. O. (1995). «Identification of tomato bushy stunt virus host-specific symptom determinants by expression of individual genes from potato virus X vector». *Plant Cell*, 7: 1157-1172.
- SHUSTER, M.; JOST, W.; MUDE, G. C.; WIEDERKUM, S.; SCHWAGER, C.; JANZEK, E.; ALTMANN, F.; STADLMANN, J.; STEMMER, C.; GORR, G. (2007). «In vivo glyco-engineered antibody with improved lytic potential produced by an innovative non-mammalian expression system». *Biotechnol. J.*, 2: 700-708.
- SIJMONS, P. C.; DEKKER, B. M.; SCHRAMEIJER, B.; VERWOERD, T. C.; ELZEN, P. J. VAN DER; HOEKEMA, A. (1990). «Production of correctly processed serum albumin in transgenic plants». *Bio/Technology*, 8: 217-221.
- SPARROW, P. A. C.; IRWIN, J. A.; DALE, P. J.; TWYMAN, R. M.; MA, J. K. C. (2007). «Pharma-planta: Road testing the developing regulatory guidelines for plant-made pharmaceuticals». *Transgenic Res.*, 16: 147-161.
- SPÖK, A.; TWYMAN, R. M.; FISCHER, R.; MA, J. K. C.; SPARROW, P. A. C. (2008). «Evolution of a regulatory framework for pharmaceuticals derived from genetically modified plants». *Trends Biotechnol.*, 26: 506-517.
- 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.
- TORRENT, M.; LLOMPART, B.; RAMASSAMY, S. L.; TOUS, I. L.; BASTIDA, M.; MARZABAL, P.; PARVINEN, A. W.; SALOHEIMO, M.; HEIFETZ, P. B.; LUDEVID, M. D. (2009a). «Eukaryotic protein production in designed storage organelles». *BMC Biol.*, 7: 5.
- TORRENT, M.; LLOP-TOUS, I.; LUDEVID, D. (2009b). «Protein body induction: a new tool to produce and recover recombinant proteins in plants». A: Faye, L.; Gomord, V. [ed.]. *32 recombinant proteins from plants, methods in molecular biology*, 1a ed. Heidelberg: Humana Press, p. 193-208.

- TSAI, B.; YE, Y.; RAPOPORT, T. A. (2002). «Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol». *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3: 246-255.
- TWYMAN, R. M.; STOGER, E.; SCHILLBERG, S.; CHRISTOU, P.; FISHER, R. (2003). «Molecular farming in plants: host systems and expression technology». *Trends Biotechnol.*, 21: 570-578.
- VOINNET, O. (2005). «Induction and suppression of RNA: insights from viral infections». *Nat. Rev. Genet.*, 6: 206-220.
- VOINNET, O.; RIVAS, S.; MESTRE, P.; BAULCOMBE, D. (2003). «An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus». *Plant J.*, 33: 949-956.
- WALSH, G.; JEFFERIS, R. (2006). «Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins». *Nat. Biotechnol.*, 24: 1241-1252.
- WANDEL, C. I.; KHAN, M. R.; CRAIG, S.; SCHOEDER, H. E.; SPENCER, D.; HIGGINS, T. J. (1992). «Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants». *Plant J.*, 2: 181-192.
- WANG, X.; SHI, F.; WOSTEN, H. A.; HEKTOR, H.; POOLMAN, B.; ROBILLARD, G. T. (2005). «The SC3 hydrophobin self-assembles into a membrane with distinct mass transfer properties». *Biophys. J.*, 88: 3434-3443.
- WEISE, A.; ALTMAN, F.; RODRIGUEZ-FRANCO, M.; SJOBERG, E.; BAUMENR, W.; LAUNHARDT, H.; KIERTZMANN, M.; GORR, G. (2007). «High-level expression of secreted complex glycosylated recombinant human erythropoietin in the *Phycomitrella* delta-fuc-t and delta-xyl-t mutant». *Plant Biotechnol. J.*, 5: 389-401.
- YAMADA, Y.; NISHIZAWA, K.; YOKOO, M.; ZHAO, H.; ONISHI, K.; TERAISHI, M. (2008). «Anti-hypertensive activity of genetically modified soybean seeds accumulating novokinin». *Peptides*, 29: 331-337.
- ZHOU, F.; BADILLO-CORONA, J. A.; KARCHER, D.; GONZALEZ-RABADE, N.; PIEPENBURG, K.; BORCHERS, A. M.; MALONEY, A. P.; KAVANAGH, T. A.; GRAY, J. C.; BOCK, R. (2008). «High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes». *Plant Biotechnol. J.*, 6: 897-913.