

TANAMAN SEBAGAI BIOREAKTOR PROTEIN FARMASEUTIK

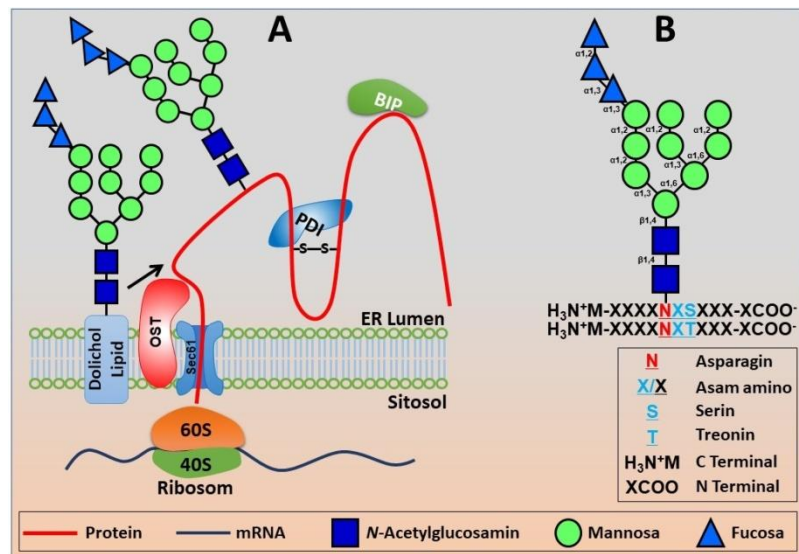


Rikno Harmoko

Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI
Laboratorium Genetika Molekuler Dan Modifikasi Jalur Biosintesis
Tanaman
Komplek Cibinong Science Center (CSC) Jl. Raya Bogor Km. 46, Cibinong
Jawa Barat (16911)
Email: rikno.harmoko@lipi.go.id

1. Sistem ekspresi dan permasalahannya

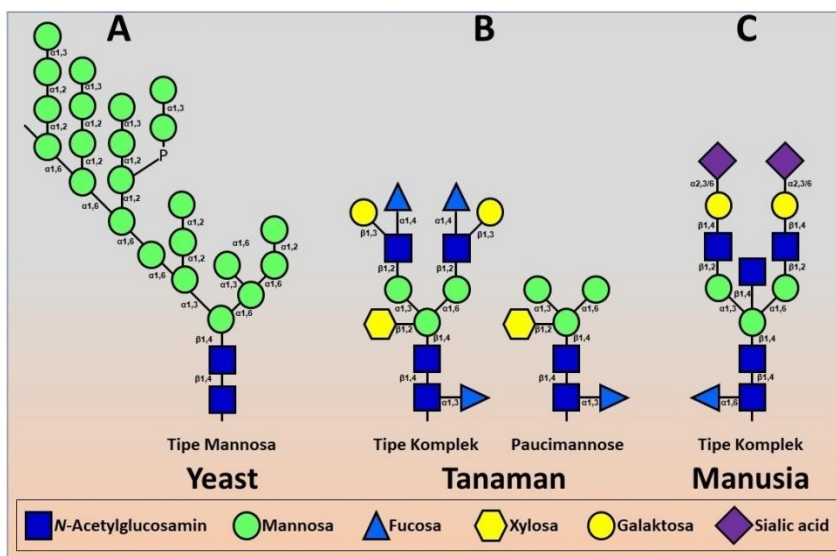
Pada tahun 1978, David Goeddel menggunakan bakteri *Escherichia coli* untuk memproduksi insulin yang dibiayai oleh sebuah perusahaan bioteknologi Genentech Inc. Bekerja sama dengan Eli Lilly & Co., Genentech kemudian memasarkan insulin rekombinan pertama dengan nama produk Humulin® pada tahun 1982 (Quianzon & Cheikh, 2012). Setelah itu, bakteri menjadi sistem ekspresi yang secara luas digunakan untuk memproduksi protein rekombinan secara komersial, khususnya protein-protein dengan struktur sederhana. Mengingat bakteri merupakan organisme prokariotik, maka ia tidak memiliki sistem endomembran sehingga tidak mampu melakukan proses modifikasi protein seperti *N-glycosylation* dan *protein folding*. Oleh karena itu, maka bakteri tidak bisa digunakan untuk memproduksi protein yang memiliki struktur kompleks seperti glycoprotein. Produksi rekombinan glycoprotein ini menjadi sangat



Gambar 1. *N-glycosylation* dan *protein folding* di ER. **A.** *N-glycan* (oligosakarida) ditransfer OST dari Dolichol lipid kesekuen protein yang barudisintesis. Protein folding dikatalisis oleh protein chaperon seperti BIP (Binding protein) dan pembentukan ikatan disulfida difasilitasi oleh PDI (Protein disulfide isomerase). **B.** *N-Glycan* ditempelkan konsensus sekuens NXS/T dimana X adalah sembarang asam amino selain prolin.

penting karena sepertiga dari farmaseutik protein adalah glycoprotein dan 50% dari protein yang disintesis sel mamalia juga dalam bentuk glycoprotein (Apweiler *et al.*, 1999; Walsh & Jefferis, 2006). Untuk memproduksi rekombinan glycoprotein, maka digunakanlah sel eukariotik sebagai sistem ekspresi untuk memfasilitasi proses *N-glycosylation* dan *protein folding*. Sel eukariotik

memiliki *secretory pathway* yang tersusun atas *endoplasmic reticulum* (ER), golgi, vesikel, lisosom (pada sel mamalia), vakuola (pada sel tumbuhan) dan membran sel. Protein dan lipid ditranslokasi dari ER ke membran sel melalui *secretory pathway*. Proses modifikasi protein seperti *N-glycosylation* dan *protein folding* difasilitasi oleh protein-protein fungsional yang ada di *secretory pathway*.



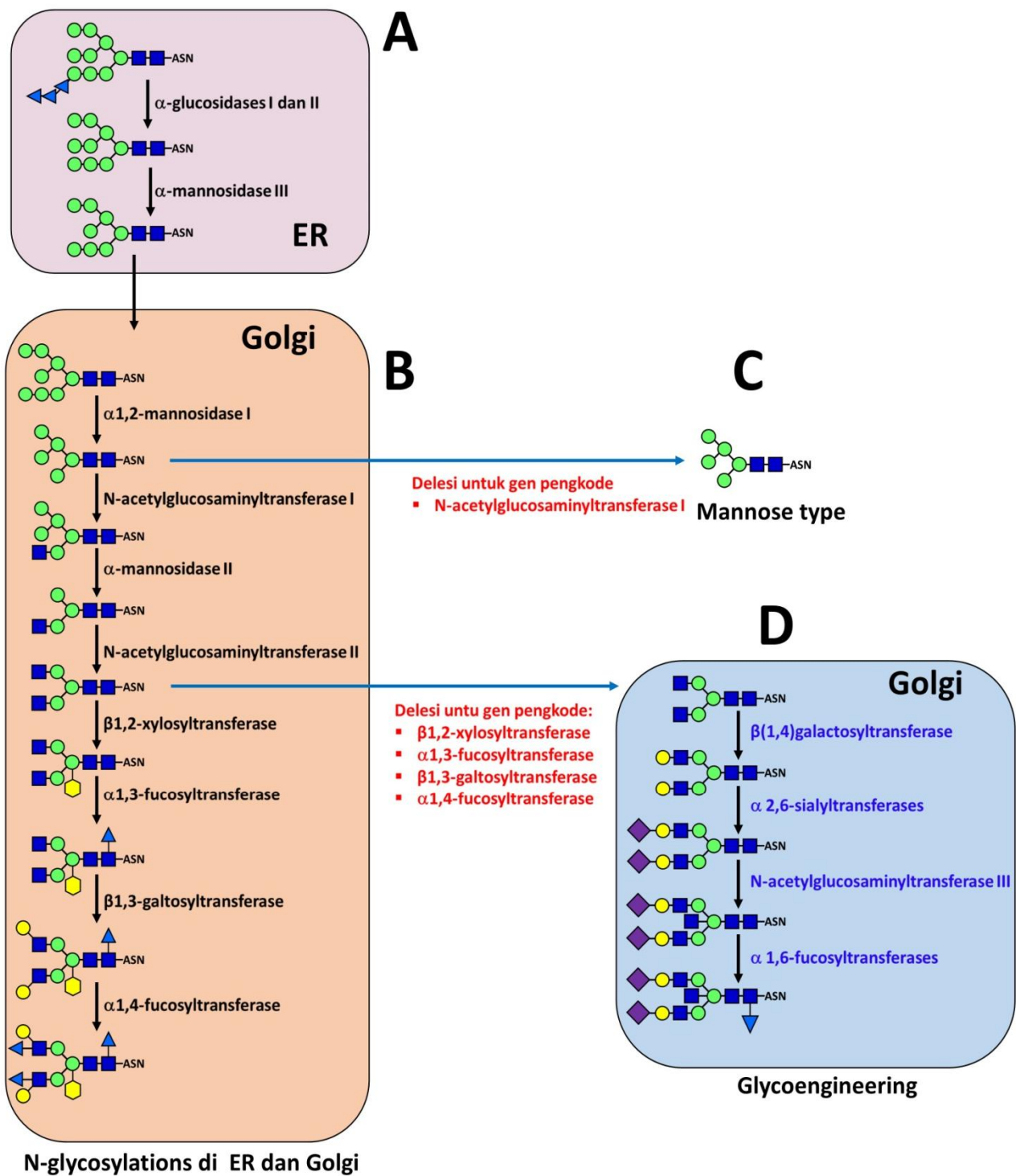
Gambar 2. Struktur N-glycan pada A. Yeast, B. Tanaman, C. Manusia

N-glycosylation adalah penambahan oligosakarida (N-glycan) pada sekuen asparagin-X-serin/treonin dimana X adalah semua asam amino selain proline seperti terlihat pada Gambar 1A dan B (Strasser, 2016). Protein yang mengalami proses *N-glycosylation* di *secretory pathway* disebut glycoprotein. Keberadaan N-glycan pada protein berperan penting terhadap sifat dasar protein seperti aktifitas, kelarutan dan stabilitasnya. N-glycan juga diperlukan dalam proses sekresi protein, *intracellular* dan *extracellular signaling*. Protein Calnexin, calreticulin, binding protein (BiP) yang ada di ER memfasilitasi terjadinya *protein folding*, sedangkan protein disulfide isomerase (PDI) mengkatalisasi pembentukan ikatan sulfida pada sekuen protein yang terlihat pada Gambar 1A (Dacks *et al.*, 2009; Liu & Li, 2014).

Yeast, sebagai organisme eukariotik, telah digunakan juga sebagai sistem ekspresi untuk memproduksi rekombinan glycoprotein. Salah satu spesies yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, digunakan secara komersial untuk memproduksi vaksin hepatitis B (Valenzuela *et al.*, 1982). Sebagaimana sel bakteri, media tumbuh yeast tergolong sederhana dan relatif murah sehingga tidak membebani biaya produksi. Yeast dapat memfasilitasi proses *protein folding* dan *N-glycosylation* sehingga mampu memproduksi rekombinan glycoprotein. Akan tetapi, rekombinan glycoprotein dari yeast mengalami *hyperglycosylation*, yaitu penambahan struktur N-glycan tipe. *Hyperglycosylation* tidak diinginkan dalam mannanosa dimana jumlah residu mannanosa (Gambar 2A) bisa mencapai 200 – 300 (Nakamura *et al.*, 1993; Thak *et al.*, 2018) industri protein farmaseutik, karena struktur

N-glycan ini sangat berbeda dengan struktur N-glycan protein manusia. Yeast juga memiliki beberapa kelemahan seperti: kemampuan memproduksi rekombinan protein rendah, keberadaan plasmid kurang stabil didalam sel dan kapasitas produksi sulit untuk ditingkatkan (Dominguez *et al.*, 1998).

Sejak tahun 1990, sel mamalia digunakan sebagai sistem ekspresi karena mampu memfasilitasi *protein folding* dan membentuk struktur N-glycan yang otentik sesuai dengan protein aslinya (Andersen & Krummen, 2002). Oleh karena itu, lebih dari 50% produk protein farmaseutik, vaksin dan antibody yang mendapat izin dari FDA diproduksi dari sel mamalia (Andersen & Krummen, 2002; Wurm, 2004). Walaupun demikian, sel mamalia memiliki kelemahan, yaitu: biaya produksi yang mahal dan kapasitas produksi yang sulit untuk ditingkatkan (Twyman *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2007). Hal ini disebabkan karena media tumbuh sel mamalia tergolong mahal, dibutuhkan *fermentor system* yang canggih dan tenaga ahli untuk menumbuhkan sel mamalia pada skala industri. Selain itu, sel mamalia juga memiliki resiko terkontaminasi oleh patogen hewan atau manusia (Twyman *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2007).



Gambar 3. N-glycosylation pathway pada tanaman. **A.** N-glycosylation di ER, **B.** N-glycosylation di golgi, **C.** Struktur N-glycan pada delesiGnTI, **D.** Startegi glycoengineering untukmendapatkanstrukturN-glycan yang identikdenganstruktur N-glycan manusia. Gen yang didelesiditandaidenganwarnamerah, sementara gene yang diinsersiditandaidenganwarnabiru.

2. Tanaman sebagai sistem ekspresi alternatif

2.1 Keunggulan tanaman sebagai sistem ekspresi

Sebagai organisme eukariotik, tanaman dapat digunakan sebagai alternatif sistem ekspresi dalam industri farmasi. Tanaman memiliki sistem endomembrane yang memungkinkan untuk memfasilitasi *protein folding* dan *N-glycosylation* guna menghasilkan glycoprotein. Pemanfaatan tanaman untuk memproduksi protein rekombinan seperti protein farmasetik, vaksin, antibodi dan protein komersial yang lain dikenal sebagai *Molecular Farming* (Tschofen *et al.*, 2016). Untuk memproduksi protein rekombinan, tanaman hanya memerlukan cahaya matahari, air dan pupuk, sehingga dari segi biaya produksi jauh lebih murah dibanding sistem ekspresi lain. Kapasitas produksi lebih mudah untuk ditingkatkan dengan cara menanam lebih banyak tanaman pada lahan yang lebih luas (Twyman *et al.*, 2005; Merlin *et al.*, 2014). Jika produksi dilakukan pada kultur sel tanaman, media tumbuhnya hanya berupa unsur hara makro, mikro, vitamin dan hormon tumbuh yang jauh lebih murah dari media tumbuh sel mamalia, yeast atau bakteri (Avesani *et al.*, 2014; Baeshen *et al.*, 2014). Protein rekombinan dari kultur sel tanaman bebas dari kontaminasi patogen mamalia karena sel tanaman

tidak menggunakan media yang berasal dari hewan. Selain itu patogen mamalia tidak dapat tumbuh pada media tumbuh sel tanaman (Hellwig *et al.*, 2004).

2.2 Jenis-jenis tanaman yang digunakan sebagai sistem ekspresi

Tembakau merupakan tanaman yang paling umum digunakan sebagai sistem ekspresi karena mampu menghasilkan biomasa yang tinggi. Tembakau merupakan tanaman model yang digunakan dalam kajian biologi molekuler sehingga prosedur rekayasa genetiknya sudah banyak diketahui. Walaupun demikian, tembakau memiliki kekurangan sebagai sistem ekspresi karena menghasilkan senyawa alkaloid berupa nikotin yang dianggap merugikan bagi kesehatan manusia. Ekspresi protein rekombinan pada jaringan daun tembakau rentan terdegradasi akibat aktivitas endogenous protease pada saat proses pemanenan (Twyman *et al.*, 2003). Biji tanaman secara alami mengakumulasi protein seperti glutelin dan prolamin dalam jumlah cukup besar (Shewry & Halford, 2002). Biji-bijian juga memiliki sifat *desiccation tolerance* sehingga bisa disimpan dalam waktu yang cukup panjang (Dekkers *et al.*, 2015). Berdasarkan karakteristik tersebut, biji dianggap memiliki lingkungan yang cocok untuk memproduksi dan menyimpan

protein rekombinan. Antibodi dan vaksin yang diekspresikan pada biji, dilaporkan aktifitasnya tidak menurun walaupun disimpan selama beberapa tahun (Fiedler & Conrad, 1995; Oakes *et al.*, 2009). Beberapa tanaman penghasil biji yang umum digunakan sebagai sistem ekspresi adalah jagung, padi, gandum dan kedelai (Nochi *et al.*, 2009; He *et al.*, 2011; Powell *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2017). Tanaman penghasil buah, umbi dan sayur juga digunakan sebagai sistem ekspresi. Vaksin, antibody dan antigen telah sukses diekspresikan pada tomat, kentang dan wortel (Tacket *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2006). Vaksin virus norwalk yang diproduksi dari kentang telah digunakan untuk uji klinis pada manusia (Tacket *et al.*, 2000).

2.3. Komersialisasi produk *molecular farming*

Aplikasi *molecular farming* pertama kali dilakukan untuk memproduksi antibody pada kentang. Setahun kemudian, *human serum albumin* juga bisa diproduksi menggunakan transgenik kentang dan tembakau (Hiatt *et al.*, 1989; Sijmons *et al.*, 1990). Pada tahun 1997, sebuah perusahaan Bioteknologi asal Amerika, ProdiGene Inc, sukses mengkomersialkan protein rekombinan Avidin yang diproduksi pada biji jagung. Protein rekombinan ini merupakan produk *molecular farming* pertama yang sukses

dikomersialkan sebagai *technical reagent* (Hood *et al.*, 1997). Tahun 2003, ProdiGene, Inc., kembali meluncurkan TrypZean™, yaitu rekombinan Trypsin yang juga diproduksi dari biji jagung. TrypZean™ digunakan sebagai reagent dalam kultur sel hewan. Karena TrypZean™ diproduksi dari biji jagung sehingga bebas dari kontaminan yang berasal dari sel hewan (Krishnan & Woodard, 2014).

Pharma-Planta Consortium, sebuah konsorsium yang dibiayai oleh Uni Eropa beranggotakan 33 lembaga riset dan industri dari Eropa dan Afrika selatan, berhasil memproduksi *HIV-neutralizing monoclonal antibody* dari tembakau. Antibodi tersebut telah mendapat ijin dari Uni Eropa untuk uji klinis fase I pada manusia (<http://www.pharma-planta.net/>). Hormon terapi untuk *diabetes mellitus*, Insulin, juga telah diproduksi dari *Safflower* oleh perusahaan bioteknologi asal Kanada, SemBio Sys Inc. Terkait dengan hormon tersebut, SemBio Sys Inc. sudah mendapat ijin uji klinis fase I/II dari FDA (Food and Drug Administration) di Amerika dan sedang mengajukan uji yang sama di Eropa (<http://www.sembiosys.ca/diabetes/>).

Perusahaan bioteknologi asal Israel, Protalix Biotherapeutics Inc., berhasil memproduksi Taliglucerase alfa dari sel wortel. Taliglucerase alfa adalah bentuk rekombinan dari Glucocerebrosidase yang

digunakan sebagai protein terapi untuk *Gaucher's disease*. (Grabowski *et al.*, 2014; Tekoah *et al.*, 2015). Pada tahun 2012, setelah lolos enam fase uji klinis, Taliglucerase alfa akhirnya mendapat *approval* dari US FDA untuk digunakan sebagai obat pada manusia (Pastores *et al.*, 2016). Taliglucerase alfa juga mendapat *approval* dari Kementrian Kesehatan Isarel pada 2012 dan Kementrian Kesehatan Brazil pada 2013. Protalix Biotherapeutics Inc. bekerja sama dengan beberapa perusahaan farmasi kemudian mengkomersialkan Taliglucerase alfa dengan nama ELELYSO® di Amerika Serikat, Bio-Manguinhos alfataliglicerase di Brazil dan UPLYSO™ di Amerika latin (<http://protalix.com/>).

2.4. Strategi merekayasa struktur N-glycan pada tanaman

Sel tanaman dan mamalia memiliki kesamaan pada awal proses *N-glycosylation* di ER. N-glycan dengan struktur $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ditempelkan pada konsensus sekuen Asn-X-Ser/Thr dari protein yang baru terbentuk. N-glycan tersebut kemudian mengalami modifikasi yaitu penghilangan glukosa dan mannososa oleh enzyme Glucosidase dan Mannosidase. Sehingga ketika glycoprotein keluar dari ER memiliki N-glycan struktur $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (Gambar 1 dan Gambar 3A). Selanjutnya, pemrosesan N-glycan di golgi berbeda antara sel tanaman

dan hewan. Pada sel tanaman terjadi penambahan $\beta 1,2\text{Xylo}$ dan $\alpha 1,3\text{fucosa}$ sedangkan pada sel hewan terjadi penambahan $\alpha 1,6\text{Fucosa}$, $\beta 1,4$ galaktosa dan $\alpha(2,3)$ Sialic acid. Perbedaan proses *N-glycosylation* di golgi ini menyebabkan perbedaan struktur N-glycan pada sel mamalia dan sel tanaman seperti Gambar 2B dan 2C (Gomord *et al.*, 2010; Yoo *et al.*, 2014).

Perbedaan struktur N-glycan yang dibentuk oleh sel mamalia dan sel tanaman merupakan kendala dalam memproduksi rekombinan glycoprotein dengan *molecular farming*. Memproduksi glycoprotein pada tanaman dengan struktur N-glycan yang identik dengan sel mamalia merupakan tantangan yang cukup sulit untuk dipecahkan. Oleh karena itu dibutuhkan rekayasa agar N-glycan yang dihasilkan oleh sel tanaman bisa identik dengan N-glycan yang dihasilkan oleh sel mamalia. Berikut ini dua strategi yang dapat dilakukan untuk merekayasa N-glycan pada sel tanaman agar identik dengan N-glycan sel mamalia, yaitu:

3. Subcellular protein targeting

Subcellular protein targeting adalah merekayasa agar protein rekombinan berada di organel tertentu. Misalnya, merekayasa agar protein rekombinan selalu berada di ER sehingga tidak mengalami

modifikasi N-glycan lanjutan di golgi. Sehingga struktur N-glycan yang dihasilkan di ER berupa tipe mannosia ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ dan $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$) dan tidak mengandung β 1,2 xylosa dan α 1,3 fucosa (Gambar 3A). Salah satu pendekatan yang dapat dilakukan yaitu dengan menambahkan sekuen KDEL pada sekuen protein rekombinan. KDEL-tag adalah sekuen protein yang terdiri dari lisin (K), Asam Aspartat (D), Asam Glutamat (E), Leusin (L) berfungsi untuk mencegah agar protein tetap berada di ER (Petruccioli *et al.*, 2006). Dengan memanfaatkan sekuen KDEL ini, IgG monoklonal antibodi yang diekspresikan pada daun tembakau dilaporkan memiliki struktur N-glycan tipe mannosia yang homogen (Triguero *et al.*, 2005).

Teknik yang lain yaitu dengan mengarahkan protein target untuk disimpan di vakuola dengan memanfaatkan *vacuolar targeting sequence*. Teknik ini digunakan oleh Protalix Biotherapeutics Inc. untuk mengekspresikan Taliglucerase/Glucocerebrosidase di vakuola sel wortel. Dalam Teknik ini, *signal sequence* ditambahkan pada N-terminal dan *vacuolar targeting sequence* ditambahkan pada C-terminal pada cDNA Glucocerebrosidase. Dengan demikian, protein Glucocerebrosidase akan mengalami proses *N-glycosylation* di secretory

pathway dan akhirnya disimpan di vakuola. Struktur N-glycan yang dihasilkan dari teknik ini adalah tipe N-glycan spesifik pada vakuola yaitu *paucimannose type* yang mengandung β 1,2 xylosa dan α 1,3 fucosa (Gambar 2B) seperti dilaorkan Grabowski *et al.*, 2014. Struktur N-glycan tipe *paucimannose* pada Taliglucerase memberikan keuntungan tersendiri karena *paucimannose* menyebabkan Taliglucerase dikenali oleh reseptornya di *macrophage* sehingga terjadi interaksi. Sedangkan jika Glucocerebrosidase diproduksi di sel mamalia, maka akan menghasilkan struktur N-glycan tipe kompleks yang justru menghambat interaksi antara Glucocerebrosidase dan reseptornya. Glucocerebrosidase dengan N-glycan tipe kompleks perlu dipangkas secara *in vitro* untuk menghasilkan N-glycan dengan tipe mannosia, sehingga biaya produksi menjadi lebih mahal (Bosch & Schots, 2010; Stoger *et al.*, 2014).

4. Glycoengineering

Tujuan glycoengineering adalah untuk menghasilkan N-glycan yang identik dengan struktur N-glycan manusia. Hal itu dapat dicapai dengan memanfaatkan teknik rekayasa genetika, yaitu dengan cara mematikan gen yang mengkode Glycosyltransferase yang tidak diinginkan dan memasukkan gen yang mengkode Glycosyltransferase

yang dibutuhkan pada tanaman. Beberapa Glycosyltransferase tanaman yang perlu dimatikan fungsinya adalah β 1,2 xylosyltransferase, α 1,3 fucosyltransferase, β 1,3-galactosyltransferase dan α 1,4-fucosyltransferase (Leonard *et al.*, 2002; Strasser *et al.*, 2004; Strasser *et al.*, 2007). Delesi empat gen tersebut akan menghilangkan β 1,2 xylose dan α 1,3 fucose pada core N-glycan serta β 1,3-galactose dan α 1,4-fucose pada terminal N-glycan. Delesi keempat gen tersebut dapat dilakukan dengan teknik genom editing atau RNAi. Selanjutnya, memasukkan gene glycosyltransferase dari mamalia yang dibutuhkan untuk memodifikasi N-glycan di tanaman, yaitu β 1,4-galactosyltransferase dan Sialyltransferases, α 1,6-fucosyltransferase dan N-acetylglucosaminyltransferase III (Miyoshi *et al.*, 1999; Qasba *et al.*, 2008; Castilho *et al.*, 2011; Geisler *et al.*, 2015; Yang & Wang, 2016). Empat gene tersebut dibutuhkan untuk menambah gugus α 1,6-fucosa, β 1,4-galaktosa, α 2,3 Sialic acid pada N-glycan dan β 1,4N-acetylglucosamin (Gambar 3D). *Glycoengineering* juga dilakukan untuk menghasilkan N-glycan sesuai dengan struktur yang dibutuhkan oleh target protein. Misalnya, Glucocerebrosidase memerlukan struktur N-glycan tipe mannosia agar dapat dikenali oleh reseptornya. Untuk mendapatkan struktur tersebut dari tanaman maka cukup mematikan fungsi gen

N-acetylglucosaminyl transferase-I (GnT1). GnT1 adalah glycosyltransferase pada cis-golgi yang mentransfer N-acetylglucosamin pada terminal mannosan-glycan. Karena *N-glycosylation* merupakan proses enzimatik yang berurutan, sehingga jika GnT1 dimatikan fungsinya maka proses enzimatik selanjutnya tidak berjalan. Dengan demikian tanaman mutan *gnt1* menghasilkan struktur N-glycan tipe mannosan (Gambar 3C) tanpa β 1,2 xylosa dan α 1,3 fucosa (He *et al.*, 2012; Fanata *et al.*, 2013).

Daftar Pustaka

- Andersen DC, Krummen L. 2002. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol*13(2): 117-123.
- Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. 1999. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*1473(1): 4-8.
- Avesani L, Merlin M, Gecchele E, Capaldi S, Brozzetti A, Falorni A, Pezzotti M. 2014. Comparative analysis of different biofactories for the production of a major diabetes autoantigen. *Transgenic Res*23(2): 281-291.
- Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, Bora RS, Ahmed MM, Ramadan HA, Saini KS, Redwan EM. 2014. Cell factories for insulin production. *Microb Cell Fact*13: 141.
- Bosch D, Schots A. 2010. Plant glycans: friend or foe in vaccine development? *Expert Rev Vaccines*9(8): 835-842.
- Castilho A, Gattinger P, Grass J, Jez J, Pabst M, Altmann F, Gorfer M, Strasser R, Steinkellner H. 2011. N-glycosylation engineering of plants for the biosynthesis of glycoproteins with bisected and branched complex N-glycans. *Glycobiology*21(6): 813-823.
- Dacks JB, Peden AA, Field MC. 2009. Evolution of specificity in the eukaryotic endomembrane system. *Int J Biochem Cell Biol*41(2): 330-340.
- Dekkers BJ, Costa MC, Maia J, Bentsink L, Ligterink W, Hilhorst HW. 2015. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. *Planta*241(3): 563-577.
- Dominguez A, Ferminan E, Sanchez M, Gonzalez FJ, Perez-Campo FM, Garcia S, Herrero AB, San Vicente A, Cabello J, Prado M, et al. 1998. Non-conventional yeasts as hosts for heterologous protein production. *Int Microbiol*1(2): 131-142.
- Fanata WI, Lee KH, Son BH, Yoo JY, Harmoko R, Ko KS, Ramasamy NK, Kim KH, Oh DB, Jung HS, et al. 2013. N-glycan maturation is crucial for cytokinin-mediated development and cellulose synthesis in *Oryza sativa*. *Plant J*73(6): 966-979.
- Feng H, Li X, Song W, Duan M, Chen H, Wang T, Dong J. 2017. Oral Administration of a Seed-based Bivalent Rotavirus Vaccine Containing VP6 and NSP4 Induces Specific Immune Responses in Mice. *Front Plant Sci*8: 910.
- Fiedler U, Conrad U. 1995. High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds. *Biotechnology (N Y)*13(10): 1090-1093.
- Geisler C, Mabashi-Asazuma H, Kuo CW, Khoo KH, Jarvis DL. 2015. Engineering beta1,4-galactosyltransferase I to reduce secretion and enhance N-glycan elongation in insect cells. *J Biotechnol*193: 52-65.

- Gomord V, Fitchette AC, 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 Biotechnol J*8(5): 564-587.
- Grabowski GA, Golembo M, Shaaltiel Y. 2014. Taliglucerase alfa: an enzyme replacement therapy using plant cell expression technology. *Mol Genet Metab*112(1): 1-8.
- He X, Galpin JD, Tropak MB, Mahuran D, Haselhorst T, von Itzstein M, Kolarich D, Packer NH, Miao Y, Jiang L, et al. 2012. Production of active human glucocerebrosidase in seeds of *Arabidopsis thaliana* complex-glycan-deficient (cgl) plants. *Glycobiology*22(4): 492-503.
- He Y, Ning T, Xie T, Qiu Q, Zhang L, Sun Y, Jiang D, Fu K, Yin F, Zhang W, et al. 2011. Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A*108(47): 19078-19083.
- Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, Fischer R. 2004. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat Biotechnol*22(11): 1415-1422.
- Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K. 1989. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*342(6245): 76-78.
- Hood EE, Witcher DR, Maddock S, Meyer T, Baszczyński C, Bailey M, Flynn P, Register J, Marshall L, Bond D, et al. 1997. Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. 3(4): 291-306.
- Krishnan A, Woodard SL. 2014. TrypZean™: An Animal-Free Alternative to Bovine Trypsin. In: Howard J., Hood E. (eds) Commercial Plant-Produced Recombinant Protein Products. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*68: 43-63.
- Leonard R, Costa G, Darrambide E, Lhernould S, Fleurat-Lessard P, Carlue M, Gomord V, Faye L, Maftah A. 2002. The presence of Lewis a epitopes in *Arabidopsis thaliana* glycoconjugates depends on an active alpha4-fucosyltransferase gene. *Glycobiology*12(5): 299-306.
- Liu Y, Li J. 2014. Endoplasmic reticulum-mediated protein quality control in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci*5: 162.
- Merlin M, Gecchele E, Capaldi S, Pezzotti M, Avesani L. 2014. Comparative Evaluation of Recombinant Protein Production in Different Biofactories: The Green Perspective. *BioMed Research International*2014: 14.
- Miyoshi E, Noda K, Yamaguchi Y, Inoue S, Ikeda Y, Wang W, Ko JH, Uozumi N, Li W, Taniguchi N. 1999. The alpha1-6-fucosyltransferase gene and its biological significance. *Biochim Biophys Acta*1473(1): 9-20.
- Nakamura S, Takasaki H, Kobayashi K, Kato A. 1993. Hyperglycosylation of hen egg white lysozyme in yeast. *J Biol Chem*268(17): 12706-12712.
- Nochi T, Yuki Y, Katakai Y, Shibata H, Tokuhara D, Mejima M, Kurokawa S, Takahashi Y, Nakanishi U, Ono F, et al. 2009. A rice-based oral cholera vaccine induces macaque-specific systemic neutralizing antibodies but does not influence pre-existing intestinal immunity. *J*

- Immuno*183(10): 6538-6544.
- Oakes JL, Bost KL, Piller KJ. 2009. Stability of a soybean seed-derived vaccine antigen following long-term storage, processing and transport in the absence of a cold chain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*89(13): 2191-2199.
- Pastores GM, Shankar SP, Petakov M, Giraldo P, Rosenbaum H, Amato DJ, Szer J, Chertkoff R, Brill-Almon E, Zimran A. 2016. Enzyme replacement therapy with taliglucerase alfa: 36-month safety and efficacy results in adult patients with Gaucher disease previously treated with imiglucerase. *Am J Hematol*91(7): 661-665.
- Petrucelli S, Otegui MS, Lareu F, Tran Dinh O, Fitchette AC, Circosta A, Rumbo M, Bardor M, Carcamo R, Gomord V, et al. 2006. A KDEL-tagged monoclonal antibody is efficiently retained in the endoplasmic reticulum in leaves, but is both partially secreted and sorted to protein storage vacuoles in seeds. *Plant Biotechnol J*4(5): 511-527.
- Powell R, Hudson LC, Lambirth KC, Luth D, Wang K, Bost KL, Piller KJ. 2011. Recombinant expression of homodimeric 660 kDa human thyroglobulin in soybean seeds: an alternative source of human thyroglobulin. *Plant Cell Rep*30(7): 1327-1338.
- Qasba PK, Ramakrishnan B, Boeggeman E. 2008. Structure and function of beta -1,4-galactosyltransferase. *Curr Drug Targets*9(4): 292-309.
- Quianzon CC, Cheikh I. 2012. History of insulin. *J Community Hosp Intern Med Perspect*2(2).
- Shewry PR, Halford NG. 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot*53(370): 947-958.
- Sijmons PC, Dekker BM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, van den Elzen PJ, Hoekema A. 1990. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Biotechnology (N Y)*8(3): 217-221.
- Stoger E, Fischer R, Moloney M, Ma JK. 2014. Plant molecular pharming for the treatment of chronic and infectious diseases. *Annu Rev Plant Biol*65: 743-768.
- Strasser R, Altmann F, Mach L, Glossl J, Steinkellner H. 2004. Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex N-glycans lacking beta1,2-linked xylose and core alpha1,3-linked fucose. *FEBS Lett*561(1-3): 132-136.
- Strasser R, Bondili JS, Vavra U, Schoberer J, Svoboda B, Glossl J, Leonard R, Stadlmann J, Altmann F, Steinkellner H, et al. 2007. A unique beta1,3-galactosyltransferase is indispensable for the biosynthesis of N-glycans containing Lewis a structures in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*19(7): 2278-2292.
- Tacket CO, Mason HS, Lososky G, Clements JD, Levine MM, Arntzen CJ. 1998. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat Med*4(5): 607-609.
- Tacket CO, Mason HS, Lososky G, Estes MK, Levine MM, Arntzen CJ. 2000. Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J Infect Dis*182(1): 302-305.
- Tekoah Y, Shulman A, Kizhner T, Ruderfer I, Fux L, Nataf Y, Bartfeld D, Ariel T, Gingis-Velitski S, Hanania U, et al. 2015. Large-scale production of pharmaceutical proteins

- in plant cell culture-the Protalix experience. *Plant Biotechnol J*13(8): 1199-1208.
- Thak EJ, Kim J, Lee DJ, Kim JY, Kang HA. 2018. Structural analysis of N-/O-glycans assembled on proteins in yeasts. *J Microbiol*56(1): 11-23.
- Triguero A, Cabrera G, Cremata JA, Yuen CT, Wheeler J, Ramirez NI. 2005. Plant-derived mouse IgG monoclonal antibody fused to KDEL endoplasmic reticulum-retention signal is N-glycosylated homogeneously throughout the plant with mostly high-mannose-type N-glycans. *Plant Biotechnol J*3(4): 449-457.
- Tschofen M, Knopp D, Hood E, Stoger E. 2016. Plant Molecular Farming: Much More than Medicines. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*9(1): 271-294.
- Twyman RM, Schillberg S, Fischer R. 2005. Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opin Emerg Drugs*10(1): 185-218.
- Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R. 2003. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol*21(12): 570-578.
- Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, Hall BD. 1982. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*298(5872): 347-350.
- Walsh G, Jefferis R. 2006. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotechnol*24(10): 1241-1252.
- Wurm FM. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol*22(11): 1393-1398.
- Yang Q, Wang LX. 2016. Mammalian alpha-1,6-Fucosyltransferase (FUT8) Is the Sole Enzyme Responsible for the N-Acetylglucosaminyltransferase I-independent Core Fucosylation of High-mannose N-Glycans. *J Biol Chem*291(21): 11064-11071.
- Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. 2007. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol*127(3): 335-347.
- Yoo J, Ko K, Lee S, Lee K. 2014. Glycoengineering in plants for the development of N-glycan structures compatible with biopharmaceuticals. *Plant Biotechnology Reports*8(5): 357-376.
- Zhang X, Buehner NA, Hutson AM, Estes MK, Mason HS. 2006. Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein. *Plant Biotechnol J*4(4): 419-432.