

综述



朱建华, 博士, 教授, 博士/硕士研究生导师, 暨南大学中药生物技术研究副所长、中药学系副主任, 英国爱丁堡大学分子植物科学研究所访问学者, 广东省自然科学基金杰出青年基金获得者, 广东省特支计划科技创新青年拔尖人才和广州市“珠江科技新星”计划入选者。承担国家自然科学基金、广东省杰出青年科学基金、广东省特支计划科技创新拔尖人才等课题20余项; 发表SCI论文60余篇; 参编著作6部, 副主编1部; 申请专利10余项, 其中授权4项。中国生物化学与分子生物学会工业专业分会委员, 中国中西医结合学会第八届中药专业委员会青年委员; 教育部学位与研究生教育发展研究中心通讯评议专家, 担任*International Journal of Biological Macromolecules*、*Food & Function*等杂志审稿人。

植物平台生产单克隆抗体的优化策略

陈子晴, 刘 德, 于荣敏, 朱建华*

(暨南大学中药生物技术研究, 广州 511400)

摘要: 治疗性单克隆抗体主要为免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)。作为重组蛋白生物药物, IgG具有广泛的临床适应性。植物平台为治疗性重组蛋白的生产提供了快速、灵活和易于扩展的替代平台, 在个性化治疗蛋白的生产和流行性疾病药物开发时期受到广泛关注。由于单克隆抗体在生产过程中容易受到多种翻译后修饰途径的影响, 植物平台生产的重组单克隆抗体可能存在微观异质性, 从而影响抗体的稳定性、生物活性或引起不必要的免疫原性。本文就以下两方面展开综述: 植物平台中特异性 β -1,2-木糖和核心 α -1,3-岩藻糖的消除、 β -1,4-半乳糖基化途径的引入和其他糖基化修饰方式的修改等优化策略进展; 植物源重组抗体表达体系、培养体系和下游加工方式的优化策略进展, 以提高植物源单抗的有效性、安全性和生产条件。

关键词: 植物平台; 重组蛋白; 单克隆抗体; 植物糖工程; 生产优化

The optimization strategies for the production of monoclonal antibodies on plant platforms

CHEN Ziqing, LIU De, YU Rongmin, ZHU Jianhua*

(Biotechnological Institute of Chinese Materia Medica, Jinan University, Guangzhou 511400, China)

Abstract: The major component of therapeutic monoclonal antibodies is mainly immunoglobulin G (IgG), which has broad clinical indications as recombinant protein biopharmaceuticals. Plant-based platforms offer fast, flexible and easily scalable alternative platforms for the production of therapeutic recombinant proteins

收稿日期: 2024-04-26

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2022SFGC0105); 广州市科技计划项目(2023A03J0613); 广东省自然科学基金项目(2024A1515010301)

第一作者: E-mail: czq15521206217@163.com

*通信作者: E-mail: tzhujh@jnu.edu.cn

and have received much attention during the production of personalized therapeutic proteins and the period of drug development for pandemic diseases. Due to the susceptibility of monoclonal antibodies to multiple post-translational modification pathways during production, recombinant monoclonal antibodies produced by plant-based platforms may have microscopic heterogeneity, which may affect the stability, bioactivity, or unintended immunogenicity of the antibodies. In order to improve the efficiency, security, and yield of plant-derived monoclonal antibodies, this paper reviewed the following two aspects of related developments. First, we talked about the optimization strategies such as the removal of specific β -1,2-xylose and core α -1,3-fucose, the introduction of β -1,4-galactosylation pathway, and the modification of other glycosylation modifications in plant platforms. Then, research progresses in optimization strategies of plant-derived recombinant antibody expression system, culture system, and downstream processing methods were discussed.

Key Words: plant platform; recombinant protein; monoclonal antibody; plant glycan engineering; production optimization

治疗性重组蛋白如疫苗、抗体、激素和细胞因子的主要生产平台为原核系统(如细菌)和真核系统(包括酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞)。由于无菌环境的需求、上述平台生产重组蛋白的上游生产成本较高,易携带和传播人类病原体、细菌细胞和酵母细胞不能在分泌途径中进行人源蛋白类似的翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)等,为重组单克隆抗体的异源生产带来局限性。

植物平台作为治疗性药物生产来源已有很长的研究历史,近年来基于合成生物学的方法推动了植物平台生产各种生物制剂的应用^[1]。植物平台因具有高效、低成本、易于规模化、不能传播人类病原体等特性^[2],在生产“人源化”治疗蛋白和流行性疾病药物开发时期受到科学家的广泛关注。1986年,人们首次提出“分子农业”,即使用植物生产治疗性蛋白质作为一种替代生物制造方法。2012年,第一个用于人类的植物来源(胡萝卜细胞)的治疗性蛋白质(taliglucerase alfa, 商品名 Elelyso[®])作为酶替代疗法被FDA批准用于治疗戈谢病^[3]。2022年,加拿大卫生部审批通过了本土研发的冠状病毒样颗粒疫苗(CoVLP, 商品名 Covifenz[®]),这是世界首个获批的植物源人体疫苗,针对严重急性呼吸系统综合征冠状病毒(SARS-CoV-2)^[4],体现了大规模流行性疾病期间分子农业的应用潜力。近年来,治疗性单克隆抗体对于治疗癌症、阿尔茨海默病和其他疾病的应用

大幅增加^[5,6]。现代基因工程技术已经彻底改变了外源基因引入植物细胞的过程。植物源重组抗体的生产调控实现了精度和灵活性的提高。遗憾的是,目前并没有植物源的人类抗体药物获批上市应用。

糖基化修饰已被证实可以调节治疗性重组蛋白(特别是单克隆抗体)的生物活性,如疗效、半衰期和免疫原性。因此,控制糖基化机制对于进一步了解聚糖的生物学作用和生成特定糖基化修饰的单克隆抗体具有重要意义。然而,植物细胞内的糖基化模式高度复杂,酶的混杂性以及哺乳动物相似的糖基化反应模块的缺失,常导致重组蛋白形成异质聚糖结构。Makrydaki等^[7]开发的SUGAR-TARGET平台,利用固定化酶技术在体外环境中对糖基化反应顺序进行控制,调节自然条件下酶相互竞争的问题,提高重组蛋白糖基化谱的均一性。植物源重组单克隆抗体的生产效率及质量控制一直是科学家们研究的热点。本文对植物平台生产免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)在N-糖基化修饰方式和重组抗体生产方式(包括植物特异性聚糖的消除、人源糖基化途径的引入)、表达体系、培养体系和下游加工方式等的优化策略进展进行了综述,并对植物表达系统在治疗性重组单抗中的应用前景进行展望。

1 植物表达体系

基于植物的重组蛋白生产可解决日益增长的疾

病预防或治疗的需求, 是一个可行的替代方案, 并开辟了其他系统无法实现的可能性。近几十年来, 植物生物技术领域在重组蛋白的表达生产方面取得了重大进展, 主要得益于分子生物学的进步。植物基因工程的核心是植物的稳定转化技术和瞬时转化技术。稳定的遗传转化对植物自身生长和繁殖特性要求严格, 而瞬时转化技术作为一种高效便捷的手段, 已被广泛应用于治疗性重组蛋白的上游生产和下游加工修饰等相关研究。

1.1 瞬时表达系统

植物有两种类型的瞬时表达系统^[8], 一种是基于植物病毒的感染, 如烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV); 另一种是农杆菌介导的侵染。基于植物病毒系统的表达载体主要以植物病毒(如RNA病毒)为主, 目的基因在体外进行转录, 通过直接侵染、基因枪或农杆菌侵染等途径将目的基因导入植物细胞, 由于植物病毒可自主复制, 该方法存在病毒载体感染生态系统的风险^[9]。在农杆菌介导的侵染中, 通过注射或真空浸润的方法使带有目的基因的农杆菌悬浮液浸润植物叶片, 通过递送T-DNA将目的基因转移到宿主植物细胞的细胞核基因组中, 在病毒复制系统的帮助下进行基因扩增和表达。一般来说, 通过农杆菌侵染的方法, 重组蛋白的表达比通过传统植物转化获得的表达量更高、更有效。经典的病毒载体是TMV衍生的magnICON系统^[10], 绿色荧光蛋白通过magnICON系统在本氏烟草中瞬时表达, 一周内的产量为4 mg/g。通过瞬时表达系统, 植物能够生产抗体、疫苗、替代疗法酶、受体调节剂和生物活性小分子。

1.2 稳定表达系统

植物稳定表达系统通常分为细胞核转化和叶绿体转化。细胞核转化通常使用农杆菌侵染或基因

枪介导的方法, 将外源目的基因整合至植物基因组, 并利用组织培养技术生成外源基因稳定遗传的组织或植株, 以持续产生目的蛋白。细胞核稳定转化的重组蛋白表达系统在储存和上游生产所需成本较低, 在治疗性蛋白药物的生产和运输条件欠缺的地区具有可持续发展的价值; 但细胞核的稳定转化需要经过多代筛选才能得到纯合植株, 且由于整合位点的随机性, 外源蛋白表达量一般较低, 生产周期长和转基因植物的潜在基因污染风险阻碍了外源蛋白的商业化^[11]。Ma等^[12]利用烟草稳定转化生产人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)中和抗体P2G12 (plant-derived antibody 2G12), 并通过阴道途径给药在人体中使用P2G12。P2G12是首个进入一期临床试验的符合药品生产质量管理规范标准的转基因植物源单克隆抗体。

叶绿体转化通常利用聚乙二醇法或基因枪法将表达载体导入叶绿体中, 通过同源重组将目的基因定点整合至叶绿体基因组中, 与细胞核转化一样, 需经多代筛选培养得到纯合植株, 外源蛋白在叶绿体中稳定表达。由于植物细胞中含有大量的叶绿体, 外源基因在叶绿体基因组中为高拷贝表达(有100~10 000个拷贝)^[13]。因此, 相较于细胞核转化法, 叶绿体转化法能够积累的重组蛋白更多, 如CTB-胰岛素在叶绿体中的融合积累率比在细胞核中的表达量高160倍^[14]。并且, 由于叶绿体转化的质体基因组遗传属于母性遗传, 外源转基因不能通过花粉传播, 对环境潜在的威胁较小^[15]。然而, 叶绿体不能对重组蛋白进行复杂的PTMs, 限制了其表达具有复杂结构或特异性聚糖修饰的治疗性蛋白。Dubey等^[16]研究指出, 叶绿体中含有基本的聚糖, 从而使得在叶绿体中引入聚糖修饰途径生产糖蛋白成为可能(表1)。

表1 不同植物表达系统的优缺点

植物表达系统	优点	缺点
细胞核稳定转化	宿主种类多, 转基因后代种子运输和储存成本低, 易于规模化种植	蛋白表达量低, 得到稳定转化植株的周期长, 具有转基因环境污染风险
叶绿体稳定转化	蛋白质表达量高, 稳定性强, 母性遗传可防止外源基因随花粉而逃逸	无糖基化修饰途径, 不能生产复杂蛋白质或糖蛋白
瞬时表达系统	蛋白表达量高, 操作简便, 生产周期短, 基因编辑灵活, 外源基因不随宿主遗传后代基因组, 无转基因污染风险	批间重复性易受技术条件影响, 蛋白质的稳定积累易受多因素影响

2 N-糖基化修饰方式的优化

IgG在重链保守结构域的297位天冬酰胺(Asn297)处具有两个相同的N-糖基化位点,其他蛋白质如双特异性单克隆抗体或Fc融合蛋白,可能有额外的N-糖基化位点^[17]。IgG通过Fab段的互补决定区识别抗原,通过其Fc段和Fc γ 受体(Fc γ receptor, Fc γ R)结合发挥效应功能,如抗体依赖的细胞毒作用(antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC)、抗体依赖的细胞吞噬作用(antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP)和补体依赖的细胞毒作用(complement-dependent cytotoxicity, CDC)^[18,19]。

IgG-Fc段上的N-聚糖影响其与Fc γ R的结合亲和力,进而影响抗体的功能效应。植物产生的N-聚糖结构与哺乳动物糖蛋白上的N-聚糖结构相似,但植物高尔基体缺乏能够进行 β -1,4-半乳糖基化、唾液酸化、核心 α -1,6-岩藻糖基化和二等分N-聚糖基化的糖基转移酶。单克隆抗体N-聚糖结构中核心 α -1,6-岩藻糖残基的缺失已被证实可以增强Fc结构域与Fc γ R III a的结合,从而提高抗体的ADCC效应^[20],末端 β -1,4-半乳糖的存在增强了其与补体的结合从而增强了CDC效应^[21]。然而植物特异性N-聚糖残基的存在,如 β -1,2-木糖和核心 α -1,3-岩藻糖,有可能影响重组单抗的生物活性、血清半衰期和治疗效果^[22]。因此,植物特异性聚糖残基的消除和 β -1,4-半乳糖基化途径的引入是优化植物平台以生产“人源化”N-聚糖修饰的重组抗体的重要策略。

2.1 植物特异性聚糖残基的消除

尽管未证实植物特异性聚糖残基的存在使人类免疫原性和不良过敏反应的风险增加,但消除植物平台与哺乳动物细胞生产单克隆抗体N-聚糖的异质性一直是科学家们研究的重点^[23]。2003年,有研究首次报道了利用随机T-DNA插入突变集合使拟南芥的 β -1,2-木糖基转移酶(β -1,2-xylosyltransferase, XylT)和核心 α -1,3-岩藻糖基转移酶(α -1,3-fucosyltransferase, FucT)部分失活^[24];随后利用目的基因靶向整合替换^[25]、RNA干扰技术^[26]、转录激活因子样效应核酸酶技术^[27]等对XylT和FucT基因进行干扰或敲除,均没有得到酶功能

完全丧失的植物细胞系或植株。直到第三代基因编辑技术CRISPR/Cas9出现, Hanania等^[28]和Mercx等^[29]利用该技术靶向多重敲除XylT和FucT基因,生成了内源性蛋白及重组蛋白中完全不含 β -1,2-木糖和核心 α -1,3-岩藻糖的烟草BY-2细胞系。Jansing等^[30]利用CRISPR/Cas9和杂交技术生成XylT和FucT基因完全敲除的本氏烟草植株,并生产不含植物特异性糖残基的中和抗体2G12,其与CD64的亲和力远高于野生型本氏烟草生产的2G12,且与CHO生产的2G12相似。Pantazica等^[31]利用CRISPR/Cas9开发的“人源化”本氏烟草底盘与野生型底盘相比,所产生的HBV抗原显著增加了S/preS1乙型肝炎病毒抗原的免疫原性和小鼠的病毒中和抗体免疫应答。Göritz等^[32]使用CRISPR/Cas9对普通烟草进行多重基因编辑,针对4个FucT和2个XylT基因的三个保守区域,利用免疫印迹、质谱分析证明,叶片总可溶蛋白及重组生产的广泛中和的抗HIV-1人类IgG1抗体中不含植物特异性聚糖残基。

免疫细胞表面的Fc γ R的结合可以激活免疫细胞,通过统称为抗体效应功能的过程去除或中和抗体包被的靶标,抗体Fc与Fc γ R的相互作用受到Fc结构域内高度保守的N-糖基化位点的聚糖结构影响。而单克隆抗体中植物特异性聚糖残基是否消除是生产过程中的一个关键质量属性^[33],它们的消除已被证明改善了抗体的效应功能。Stelter等^[34]研究证明,人胚肾HEK细胞中产生的VRC01比具有典型植物糖基化的VRC01对重组人Fc γ R I的亲和力高30倍,并且植物源VRC01与低亲和力受体Fc γ R II a、Fc γ R II b和Fc γ R III a的结合能力有限。然而,通过去除核心岩藻糖和木糖来改造植物聚糖可显著提高植物生产的VRC01对Fc γ R I的亲和力,并恢复对Fc γ R II a和Fc γ R II b的结合活性。此外,与HEK细胞衍生的VRC01相比,不携带岩藻糖和木糖的抗体对Fc γ R III a的亲和力提高了10~20倍^[34],显著增强了ADCC效应。Rattanapisit等^[35]利用糖工程 Δ XF本氏烟草生产用于免疫疗法的免疫检查点抑制剂——纳武利尤单抗(nivolumab,一种抗PD-1单克隆抗体IgG4),与人IgG4阴性对照相比,植物生产的nivolumab增强了IL-2和IFN- γ 的表达,证明与商业化nivolumab一样,植物源nivolumab可以促进T细胞效应的激活。

重组单克隆抗体上植物特异性聚糖残基的消除可以降低潜在的免疫原性, 在增强抗体-抗原结合亲和力和抗体效应功能方面具有重要意义。

2.2 β -1,4-半乳糖基化途径的引入

植物糖基化途径不存在能够对蛋白质进行 β -1,4-半乳糖基化的 β -1,4-半乳糖基转移酶(β -1,4 galactosyltransferase, GalT), 然而N-聚糖的半乳糖残基显著影响抗体的CDC效应。研究表明, 抗体的半乳糖基化会增强IgG1和IgG3的CDC效应^[36], 但仍然不能赋予IgG2和IgG4激活补体系统的能力。大多数糖基转移酶为II型膜蛋白, 由N端的高尔基体定位基序CTS及酶催化结构域组成。高尔基体定位基序为一段相对较短的氨基酸序列, 包括细胞质尾部、跨膜结构域和茎区^[37]。由于重组蛋白N-聚糖结构的形成与各种糖基修饰酶在高尔基体中的分布相关, 近年来许多研究报道了将哺乳动物GalT的CTS区与不同高尔基体腔室定位的糖基转移酶的CTS区进行替换, 研究总蛋白和重组蛋白N-糖基化方式的改变。Schneider等^[38]将大鼠 α -2,6-唾液酸转移酶(α -2,6-sialyltransferase, ST)的CTS区替换为人GalT的CTS区(推测ST在高尔基体后期腔室发挥作用), 生成STGalT稳定表达的植株, 其表达的IgG1抗体4E10的N-聚糖具有高达90%的末端半乳糖化结构, 其中双分支末端半乳糖基化占60%。STGalT稳定表达的植株叶片总可溶性蛋白中的半乳糖基化结构占30%~40%, 比过表达全长GalT的叶片中的含量增加了三倍, 强调了糖基转移酶靶向适合的高尔基体对高效加工N-聚糖的重要性。Navarre等^[39]将烟草 β -1,4-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(β -1,4-N-acetylglucosamine transferase, GnT I)的CTS区与人 β -1,4-GalT的CTS区进行替换, 建立稳定表达GnT-GalT的烟草BY-2细胞悬浮培养体系, 所生产的分泌型重组抗体IgG2中半乳糖基化结构占41.2%; 同时, 植物特异性聚糖含量大幅减少, 这是由于GnT I的CTS将GalT引导至顺式(早期)高尔基体发挥作用。

异源N-聚糖修饰酶在植物中的稳定表达耗时较长并可能伴随对植物生长发育的剧烈影响, 可能由于前体UDP-Gal的消耗影响了富含多糖的植物细胞壁的构建。Vézina等^[40]研究了本氏烟草中GalT与重组抗体的瞬时共表达, 该策略实现了重组抗

体的高产量以及其N-聚糖的快速修饰。Nguyen等^[41]将拟南芥 β -1,3-半乳糖基转移酶的胞质尾部及跨膜结构域与鼠类GalT的茎区及催化结构域进行融合, 生成的 β 1,3 β 1,4-GalT在本氏烟草中与伐利鲁单抗(varlilumab)瞬时共表达, 4.4%的重组抗体带有双分支末端均半乳糖基化的N-聚糖。与稳定转化相比, 糖基转移酶与重组抗体的瞬时共表达是研究重组单抗N-聚糖修饰方式的快速、简便的方法。

2.3 其他修改方式

N-聚糖上的末端唾液酸残基减弱了重组抗体的CDC效应, 也显著降低了含有核心岩藻糖残基的单克隆抗体的ADCC, 这可能是由于高度唾液酸化的IgG-Fc构象封闭, 减少了与自然杀伤细胞或骨髓细胞上Fc γ Rs的结合^[42]。但唾液酸残基的存在似乎有利于增强抗体稳定性, 因为去唾液酸化抗体血浆清除率和半衰期均降低, 进而影响药物的效力^[43]。Izadi等^[44]在本氏烟草中引入哺乳动物唾液酰化的整个生物合成途径来实现重组抗体IgG1的N-聚糖的末端唾液酰化, 包括引入前体CMP-N乙酰神经氨酸(CMP-Neu5Ac)的生物合成、激活、运输和将CMP-Neu5Ac转移到末端半乳糖上的六个基因。目前由于转基因对植物发育和表型的影响, 唾液酰化途径引入的相关研究多数采用瞬时表达技术, 重组蛋白唾液酰化效率低下及酶基因表达的不稳定性仍是需要解决的难题^[45]。

由于在糖基化初始阶段, 高等植物和哺乳动物在内质网中形成相同的高聚甘露糖形式的N-聚糖, 常通过添加内质网保留基序(SE)KDEL/HDEL将重组蛋白保留在内质网中, 来避免蛋白质传递到高尔基体进行复杂的N-聚糖下游修饰所产生的异质性。Rattanapisit等^[35]在单抗重链N端添加信号肽, 并在C端连接一个短氨基酸序列SEKDEL, 表达出高聚甘露糖型(Man5-Man9)的nivolumab, 其与商业化nivolumab具有相同的体外抗原结合能力。但该策略形成的高聚甘露糖结构会加速抗体在体内的清除^[46], 对主要依赖Fc结构的抗体效应发挥作用的抗体如IgG1和IgG3的应用具有局限性。由于内质网含有的蛋白酶类型少、活性低^[47], 重组蛋白不易降解失活, 添加内质网保留基序已被证明可以增加重组抗体的积累量。Kommineni等^[48]利

用甘露糖苷酶 I 抑制剂 kifunensine 影响重组单抗在本氏烟草中的表达过程,以生产寡聚甘露糖型的利妥昔单抗(rituximab);其靶向淋巴瘤细胞系 Wil14-S 的 ADCC 活性增加了 14 倍。Rodriguez Benavente 等^[49]证明,抑制 N-聚糖加工可提高人自然杀伤细胞的抗体结合亲和力和效应功能。Beihammer 等^[50]将一种来自杜氏利什曼原虫的单亚基寡糖基转移酶(*Leishmania donovani* oligosaccharyltransferase, *LdOST*)与 IgG1-Fc 上的 N-聚糖占有率从 50% 提高至 97%,表明 *LdOST* 的共表达降低了植物源抗体的异质性,并有助于提高其稳定性和效应功能。植物源单克隆抗体 N-聚糖基化方式的修改是提高单抗稳定性、安全性和有效性的关键策略。

3 重组抗体生产方式的优化

重组抗体通过体外克隆抗体重链和轻链 DNA 序列产生。与杂交瘤技术生产的单克隆抗体相比,重组抗体具有高批间一致性、无动物源病原体、易于工程化改造和持续供应等优势。利用植物平台生产重组抗体,可通过重组抗体表达体系的设计和培养技术的改进(如优化影响植物生长和健康的营养和物理参数)来提高重组抗体的产量和质量,控制生产成本。

3.1 表达体系的优化

重组抗体表达体系(如 IgG 序列设计、表达载体中表达元件的优化、密码子优化和转录后基因沉默抑制),已被证明可调整重组抗体的半衰期、增强异源基因的翻译效率、增加重组单抗的表达和积累水平,优化了植物源单抗的表达和体内生物活性。

3.1.1 IgG 优化

IgG 半衰期的延长与其在 pH6 的环境下对新生儿 Fc 受体(neonatal Fc receptor, FcRn)的亲合力增加有关,IgG-Fc 区域与 FcRn 的结合可以减弱溶酶体对 IgG 的降解。Grandits 等^[51]在三种 HIV 广泛中和抗体的 Fc 区域引入 M252Y/S254T/T256E(YTE)或 M428L/N434S(LS)突变,抗体的体内清除率下降了 22%~28%。这种方法使单克隆抗体的半衰期延长了 3~4 倍,已被广泛用于延长不同亚型 IgG 的半衰期^[52]。Rattanapisit 等^[53]通过对抗 PD-L1 抗体阿替利

珠的重链糖基化保守碱基进行 N298A/D359E/L361M 突变,生产无糖基化修饰的抗体,商业化抗体 Tecentriq 在体外与人 PD-L1 具有相当的抗原结合能力。通过 Fc 区域的氨基酸突变对 IgG 序列进行改造,可以延长 IgG 半衰期,对于不依赖 ADCC、ADCP、CDC 等抗体效应发挥功能的抗 PD-L1 抗体,其阻断 PD-1/PD-L1 免疫抑制通路的功能不受影响。

3.1.2 载体设计

植物系统表达重组蛋白常用的载体骨架有来自 TMV、马铃薯病毒 X(potato virus X, PVX)、豇豆花叶病毒(cowpea mosaic virus, CPMV)和 DNA 双生病毒豆黄矮病毒(bean yellow dwarf virus, BeYDV)等的病毒骨架。基于 TMV 和 PVX 的 magnICON 载体和基于 CPMV 的 pEAQ 载体在治疗性蛋白的植物异源表达中占主导地位^[54]。来自花椰菜花叶病毒的 35S 启动子或其变体在目前全球种植的所有转基因作物中占 60% 以上,是植物基因工程中应用最广泛的启动子之一,它可以驱动外源基因在双子叶植物中高效表达。35S 启动子包含 TATA 盒、CAAT 盒等顺式作用元件,并可插入增强子序列或配体激活的基因表达盒,或被设计为两段重复的短序列(约 90 bp)的增强型启动子。目前,依赖于 35S 启动子驱动表达的多功能 MIDAS-P 系统已被开发,通过在一个载体中克隆多重基因来实现抗 HIV “鸡尾酒疗法”混合物的瞬时共表达^[55]。5'和 3'非翻译区(untranslated region, UTR)对 mRNA 的稳定性和翻译有很大的影响。Diamos 等^[56]构建的 BeYDV 表达载体检测了多种 5'UTR 和 3'UTR 对增强重组蛋白在本氏烟草中表达的影响,结果显示,来自拟南芥的光系统 K 亚基基因上游 40~60 bp 作为翻译增强子,活性高于广泛使用的来自 TMV 的 5'UTR;将烟草 Rb7 基质附着区(Rb7-MAR)添加在重组蛋白表达盒的 3'端,rituximab 的瞬时表达产量增加了 3.4 倍,并且使用含有 MAR 的载体可显著减少叶组织坏死,提高植物重组蛋白的生产效率。Rozov 等^[57]研究了转运信号肽将重组蛋白靶向转运到具有低蛋白酶活性或适当糖基化机制的细胞区室,大大提高了重组蛋白在植物细胞中的积累效率。上述结果说明,可以通过非翻译区和载体骨架的设计、信号肽的添加等优化策

略, 增强重组IgG异源表达效率。

3.1.3 密码子优化

密码子优化是一种分子生物学技术, 通过不改变其编码的氨基酸序列而修改其核苷酸序列来增强特定宿主生物体中基因的表达。它使用生物信息学工具识别宿主中普遍存在的同义密码子, 并通过宿主植物编码蛋白的偏好密码子替换使用频率低的密码子来修改基因序列以提高表达效率^[58]。在优化过程中需要考虑几个因素, 包括密码子频率、GC含量、mRNA二级结构和顺式调节元件^[59]。Parvathy等^[60]分析了植物中的密码子使用偏差, 表明密码子优化是在翻译水平上使基因表达增加了75~80倍, 引入增强表达的抗虫基因增强了植物抵御虫害的能力。这些优化同时也为满足植物细胞中增加重组蛋白产量的需求提供了重要的价值。遗憾的是, 密码子优化带来的问题, 如对蛋白质功能的潜在影响和对免疫原性增加的影响, 还需要通过临床试验后期或上市后的药物反馈来评价^[61]。

3.1.4 转录后基因沉默抑制

转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)是生物细胞抵抗外来核酸入侵及保持生物自身基因组完整性的防御机制。植物中的外源基因表达受到RNA沉默的限制, 植物病毒具有编码RNA沉默抑制因子的能力, 因此可以用于抵抗植物对外源基因RNA的沉默效应。例如, 番茄丛矮病毒编码的p19元件通过隔离短干扰RNA来抑制外源基因的RNA沉默, 将p19元件整合到载体骨架中^[55], 或作为单独的表达质粒与重组蛋白共表达, 可以使外源基因的表达增加10~20倍^[62]。将varlilumab表达载体与p19表达载体在本氏烟草中瞬时共表达, 单抗产量为174 µg/g, 是对照组的3.2倍^[41]。PTGS是目前广泛使用的提高植物重组蛋白表达水平的优势策略。

3.2 培养体系的优化

用于重组蛋白生产的植物培养技术, 除了常用的土壤栽培外, 植物细胞悬浮培养技术及水培技术使植物源重组蛋白在大规模生产上具有竞争力。植物细胞悬浮培养是指在离体条件下, 将愈伤组织或其他易分散的组织置于液体培养基中进行震荡培养, 得到分散的悬浮细胞, 携带重组蛋

白表达质粒的细胞可通过继代培养使细胞增殖, 从而大量生产重组蛋白。水培技术通过营养物质的可控供给以及浇灌技术的优化, 提高了植物细胞重组蛋白的生产效率和经济效益。水培技术与植物细胞悬浮培养技术均避免了天气、害虫、土壤和基因流等不确定因素, 并可通过对表达质粒进行添加分泌信号肽等方法, 实现重组蛋白分泌至液体培养基, 无需从植物生物质中纯化重组蛋白, 降低下游回收成本, 广泛应用于植物源重组抗体的生产。

3.2.1 无菌化培养

植物细胞无菌化悬浮培养是一种可靠的植物细胞培养技术, 可提供温度、pH值、营养供应和氧气水平等受控参数, 并具有简单的纯化和下游处理方法, 使其成为生产重组蛋白尤其是分泌蛋白的一种优秀替代平台。烟草BY-2细胞中某些治疗蛋白的生产力, 如最大产量超过12 mg/L的单克隆抗体M100, 已达到约8 pg/细胞/天^[8], 接近CHO细胞20~40 pg/细胞/天的典型速率。Sheva等^[63]开发了一种创新方法, 在利用CRISPR/Cas技术靶向敲除烟草BY2细胞*XylT/FucT*后, 利用热诱导型启动子启动靶向T-DNA边界区域的表达盒, 自切除转基因BY2细胞的整个CRISPR/Cas9-gRNA表达模块, 生成非转基因细胞系, 防止潜在的脱靶基因修饰, 以供治疗性重组蛋白生产使用。植物细胞生物反应器中的最新进展包括代谢产物生产的基因工程、促进生长的微载体优化和模拟自然环境的3D培养系统^[64]。各种类型的生物反应器包括连续搅拌罐式反应器、一次性生物反应器、气运式生物反应器和光生物反应器^[65]。这些技术共同推动了更高效、更高产的植物细胞培养过程, 并应用于生产生物制药、营养保健品和其他有价值的化合物。

3.2.2 水培技术

水培是指在营养丰富的水中栽培植物, 可以有或没有惰性介质(如沙子、砾石或珍珠岩)的机械支撑。与土壤栽培相比, 水培系统的主要优点是通过自动浇水和施肥来节省劳动力, 并通过泵循环将养分回收, 最大限度地减少可持续农业中的水资源损失。近年来, 灯芯系统、深水培养、深流技术、营养膜技术、潮起潮落系统、气培法和滴

灌系统等水培技术相继发展^[66]。由于水培系统是相对封闭的,避免了开放种植环境中土壤传播的疾病。Kashima等^[67]利用水培系统生产出了MucoRice-CTB(一种以大米为基础的口服霍乱疫苗)。水培系统也被用于培养本氏烟草以产生两种不同效力的SARS-CoV-2中和抗体^[68]。Nguyen等^[41]利用水培技术生产varlilumab的产量比土培增加3.5倍,并指出水培条件可以增加抗坏血酸在植物中的积累,抗坏血酸可以清除农杆菌产生的过量活性氧,从而抑制农杆菌表达引起的植物叶片坏死。因此,水培系统有助于改善转化和增强农业渗透。

另外,利用毛状根培养系统,转基因植物根系可以将完整形态的IgG分泌至水培培养基中,在一周内产量达46 µg/mL^[69],并且植物激素的诱导可使水培培养基中分泌蛋白的积累进一步增加^[70]。水培培养基中所含蛋白酶的种类和活性明显低于植物叶片细胞间液,并且下游纯化回收流程简化、成本降低。因此,根茎分泌生产平台是一种简单、经济、高效的单克隆抗体生产方式。

4 下游加工技术的优化

商业化规模生产植物重组蛋白的主要困难是纯化的复杂性和高成本。例如,与其他生产系统相比,植物制造的生物制药下游加工的一个重要问题是处理植物提取物以快速去除纤维颗粒、植物色素和酚类化合物。在单克隆抗体的纯化中,常用的是基于抗体和配体(细菌来源的蛋白A、G或L)之间的可逆相互作用的亲和层析技术,疏水相互作用色谱法、羟基磷灰石色谱法、混合模式色谱法、阳离子和阴离子交换色谱法等技术^[71]也可以应用于抗体纯化。Faye等^[72]使用蛋白A磁珠从未澄清的粗植物提取物中快速纯化了SARS-coV-2刺突蛋白的中和抗体M15及其scFv-Fc同源物S15,融合了澄清、纯化和浓缩的步骤,减少了抗体与粗提取物中酚类化合物和蛋白酶的接触时间。因此,开发绿色、简单、高效和低成本的下

游加工技术是植物重组蛋白规模化生产的关键。

发展,植物平台生产治疗性重组蛋白逐步实现了生产过程的精确调控,植物源单克隆抗体的生产通过表达系统的选择、N-聚糖基化方式的修改、表达体系和培养体系的设计以及下游加工技术的优化,增强了与哺乳动物细胞生产的单克隆抗体的同质化水平,弥补了哺乳动物细胞平台的劣势。虽然植物生产平台可能无法完全取代微生物发酵技术和哺乳动物细胞培养技术,但在个性化医疗和单克隆抗体、治疗酶和疫苗的定制化生产方面具有优势,其可扩展性和成本效益为大规模生产提供了前所未有的机会(图1)。

尽管植物表达系统在少数情况下证明了它们相对于已建立的商业化生产平台在经济和技术上的优势,但由于产品下游加工困难、质量参差不齐以及规模化产量相对较低等问题,植物平台应用于治疗性重组蛋白的商业化生产仍面临许多挑战。基于植物细胞包(plant cell packs)的自动化瞬时表达方案实现了植物细胞中瞬时表达的批内和批间变异系数(CV)<5%,同时成本降低了约54%^[73],有利于提高通量和进行质量控制,是一种有前景的植物生产平台模块。未来植物源重组单抗的研究仍然集中在消除与人源化单抗在结构上(特别是糖基修饰)的异质性;增产、增效的优化策略;下游加工的成本控制以及生产规范化等问题。我们需要进一步开展毒性研究、治疗监测、进行临床

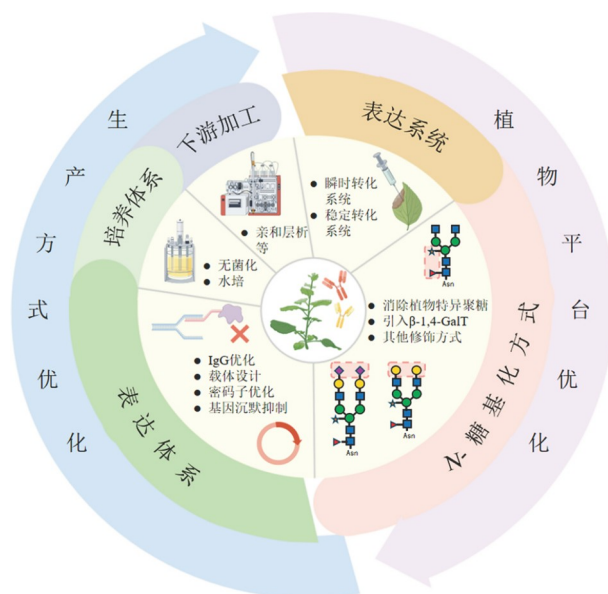


图1 植物平台生产重组IgG的优化策略

5 总结与展望

目前,基于合成生物学和现代基因工程技术的

试验以及获得监管机构的批准, 以推进植物表达系统应用于生物制药行业。

参考文献

- [1] Shanmugaraj B, Bulaon CJ, Phoolcharoen W. Plant molecular farming: a viable platform for recombinant biopharmaceutical production. *Plants*, 2020, 9(7): 842
- [2] Sheshukova EV, Komarova TV, Dorokhov YL. Plant factories for the production of monoclonal antibodies. *Biochem Moscow*, 2016, 81(10): 1118-1135
- [3] Cullufi P, Tomori S, Velmishi V, et al. Taliglucerase alfa in the longterm treatment of children and adolescents with type 1 Gaucher disease: the albanian experience. *Front Pediatr*, 2024, 12: 1352179
- [4] Hager KJ, Pérez Marc G, Gobeil P, et al. Efficacy and safety of a recombinant plant-based adjuvanted Covid-19 vaccine. *N Engl J Med*, 2022, 386(22): 2084-2096
- [5] Perneczky R, Jessen F, Grimmer T, et al. Anti-amyloid antibody therapies in Alzheimer's disease. *Brain*, 2023, 146(3): 842-849
- [6] Kaplon H, Crescioli S, Chenoweth A, et al. Antibodies to watch in 2023. *mAbs*, 2023, 15(1): 2153410
- [7] Makrydaki E, Donini R, Krueger A, et al. Immobilized enzyme cascade for targeted glycosylation. *Nat Chem Biol*, 2024, 20(6): 732-741
- [8] Schillberg S, Raven N, Spiegel H, et al. Critical analysis of the commercial potential of plants for the production of recombinant proteins. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 720
- [9] Burnett MJB, Burnett AC. Therapeutic recombinant protein production in plants: challenges and opportunities. *Plants People Planet*, 2020, 2(2): 121-132
- [10] Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R, et al. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(6): 718-723
- [11] Fausther-Bovendo H, Kobinger G. Plant-made vaccines and therapeutics. *Science*, 2021, 373(6556): 740-741
- [12] Ma JK, Drossard J, Lewis D, et al. Regulatory approval and a first-in-human phase I clinical trial of a monoclonal antibody produced in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13(8): 1106-1120
- [13] Cardi T, Lenzi P, Maliga P. Chloroplasts as expression platforms for plant-produced vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 2010, 9(8): 893-911
- [14] Khan I, Daniell H. Oral delivery of therapeutic proteins bioencapsulated in plant cells: preclinical and clinical advances. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2021, 54: 101452
- [15] Venkatesh J, Park SW. Plastid genetic engineering in *Solanaceae*. *Protoplasma*, 2012, 249(4): 981-999
- [16] Dubey KK, Kumar A, Baldia A, et al. Biomanufacturing of glycosylated antibodies: challenges, solutions, and future prospects. *Biotechnol Adv*, 2023, 69: 108267
- [17] Higel F, Seidl A, Sörgel F, et al. N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *Eur J Pharm BioPharm*, 2016, 100: 94-100
- [18] Mimura Y, Katoh T, Saldova R, et al. Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy. *Protein Cell*, 2018, 9(1): 47-62
- [19] van der Horst HJ, Nijhof IS, Mutis T, et al. Fc-engineered antibodies with enhanced Fc-effector function for the treatment of B-cell malignancies. *Cancers*, 2020, 12(10): 3041
- [20] Ferrara C, Grau S, Jäger C, et al. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγRIII and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(31): 12669-12674
- [21] Raju TS. Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Curr Opin Immunol*, 2008, 20(4): 471-478
- [22] Fischer R, Holland T, Sack M, et al. Advances in glycobiotechnology: glyco-engineering of plant-based expression systems[M]. Switzerland: Cham: Springer, 2021: 137-166
- [23] Shaaltiel Y, Tekoah Y. Plant specific N-glycans do not have proven adverse effects in humans. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(7): 706-708
- [24] Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, et al. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 2003, 301(5633): 653-657
- [25] Huether CM, Lienhart O, Baur A, et al. Glyco-engineering of moss lacking plant-specific sugar residues. *Plant Biol*, 2005, 7(3): 292-299
- [26] Strasser R, Stadlmann J, Schähs M, et al. Generation of glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure. *Plant Biotechnol J*, 2008, 6(4): 392-402
- [27] Li J, Stoddard TJ, Demorest ZL, et al. Multiplexed, targeted gene editing in *Nicotiana benthamiana* for glyco-engineering and monoclonal antibody production. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(2): 533-542
- [28] Hanania U, Ariel T, Tekoah Y, et al. Establishment of a tobacco BY2 cell line devoid of plant-specific xylose and

- fucose as a platform for the production of biotherapeutic proteins. *Plant Biotechnol J*, 2017, 15(9): 1120-1129
- [29] Mercx S, Smargiasso N, Chaumont F, et al. Inactivation of the $\beta(1,2)$ -xylosyltransferase and the $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase genes in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells by a multiplex CRISPR/Cas9 strategy results in glycoproteins without plant-specific glycans. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 403
- [30] Jansing J, Sack M, Augustine SM, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of six glycosyltransferase genes in *Nicotiana benthamiana* for the production of recombinant proteins lacking β -1,2-xylose and core α -1,3-fucose. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17(2): 350-361
- [31] Pantazica A-M, van Eerde A, Dobrica M-O, et al. The “humanized” N-glycosylation pathway in CRISPR/Cas9-edited *Nicotiana benthamiana* significantly enhances the immunogenicity of a S/preS1 hepatitis B virus antigen and the virus-neutralizing antibody response in vaccinated mice. *Plant Biotechnol J*, 2023, 21(6): 1176-1190
- [32] Göritzer K, Grandits M, Grünwald-Gruber C, et al. Engineering the N-glycosylation pathway of *Nicotiana tabacum* for molecular pharming using CRISPR/Cas9. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 1003065
- [33] Sha S, Agarabi C, Brorson K, et al. N-Glycosylation design and control of therapeutic monoclonal antibodies. *Trends Biotechnol*, 2016, 34(10): 835-846
- [34] Stelter S, Paul MJ, Teh AY, et al. Engineering the interactions between a plant-produced HIV antibody and human Fc receptors. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18(2): 402-414
- [35] Rattanapisit K, Phakham T, Buranapraditkun S, et al. Structural and *in vitro* functional analyses of novel plant-produced anti-human PD1 antibody. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 15205
- [36] Peschke B, Keller CW, Weber P, et al. Fc-galactosylation of human immunoglobulin gamma isotypes improves C1q binding and enhances complement-dependent cytotoxicity. *Front Immunol*, 2017, 8: 646
- [37] Tu L, Banfield DK. Localization of golgi-resident glycosyltransferases. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(1): 29-41
- [38] Schneider J, Castilho A, Pabst M, et al. Characterization of plants expressing the human β 1,4-galactosyltransferase gene. *Plant Physiol Biochem*, 2015, 92: 39-47
- [39] Navarre C, Smargiasso N, Duvivier L, et al. N-glycosylation of an IgG antibody secreted by *Nicotiana tabacum* BY-2 cells can be modulated through co-expression of human β -1,4-galactosyltransferase. *Transgenic Res*, 2017, 26(3): 375-384
- [40] Vézina LP, Faye L, Lerouge P, et al. Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants. *Plant Biotechnol J*, 2009, 7(5): 442-455
- [41] Nguyen KD, Kajiura H, Kamiya R, et al. Production and N-glycan engineering of Varlilumab in *Nicotiana benthamiana*. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1215580
- [42] Ahmed AA, Giddens J, Pincetic A, et al. Structural characterization of anti-inflammatory immunoglobulin g fc proteins. *J Mol Biol*, 2014, 426(18): 3166-3179
- [43] Luo C, Chen S, Xu N, et al. Glycoengineering of pertuzumab and its impact on the pharmacokinetic/pharmacodynamic properties. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 46347
- [44] Izadi S, Kunnummel V, Steinkellner H, et al. Assessment of transient expression strategies to sialylate recombinant proteins in *N. benthamiana*. *J Biotechnol*, 2023, 365: 48-53
- [45] Bohlender LL, Parsons J, Hoernstein SNW, et al. Stable protein sialylation in physcomitrella. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 610032
- [46] Goetze AM, Liu YD, Zhang Z, et al. High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans. *Glycobiology*, 2011, 21(7): 949-959
- [47] Strasser R. Protein quality control in the endoplasmic reticulum of plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2018, 69(1): 147-172
- [48] Kommineni V, Markert M, Ren Z, et al. *In vivo* glycan engineering via the mannosidase I inhibitor (Kifunensine) improves efficacy of rituximab manufactured in *Nicotiana benthamiana* plants. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(1): 194
- [49] Rodriguez Benavente MC, Hughes HB, Kremer PG, et al. Inhibiting N-glycan processing increases the antibody binding affinity and effector function of human natural killer cells. *Immunology*, 2023, 170(2): 202-213
- [50] Beihammer G, König-Beihammer J, Kogelmann B, et al. An oligosaccharyltransferase from *Leishmania donovani* increases the N-glycan occupancy on plant-produced IgG1. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1233666
- [51] Grandits M, Grünwald-Gruber C, Gastine S, et al. Improving the efficacy of plant-made anti-HIV monoclonal antibodies for clinical use. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1126470
- [52] Gautam R, Nishimura Y, Gaughan N, et al. A single injection of crystallizable fragment domain-modified antibodies elicits durable protection from SHIV infection. *Nat Med*, 2018, 24(5): 610-616
- [53] Rattanapisit K, Bulaon CJI, Strasser R, et al. *In vitro* and *in vivo* studies of plant-produced Atezolizumab as a potential immunotherapeutic antibody. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 14146
- [54] Nosaki S, Hoshikawa K, Ezura H, et al. Transient protein

- expression systems in plants and their applications. *Plant Biotechnol*, 2021, 38(3): 297-304
- [55] Pinneh EC, van Dolleweerd CJ, Göritzer K, et al. Multiple gene expression in plants using MIDAS-P, a versatile type II restriction-based modular expression vector. *Biotech Bioeng*, 2022, 119(6): 1660-1672
- [56] Diamos AG, Rosenthal SH, Mason HS. 5' and 3' untranslated regions strongly enhance performance of geminiviral replicons in *Nicotiana benthamiana* leaves. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 200
- [57] Rozov S, Deineko E. Increasing the efficiency of the accumulation of recombinant proteins in plant cells: the role of transport signal peptides. *Plants*, 2022, 11(19): 2561
- [58] Quax TEF, Claassens NJ, Söll D, et al. Codon bias as a means to fine-tune gene expression. *Mol Cell*, 2015, 59(2): 149-161
- [59] Leppek K, Byeon GW, Kladwang W, et al. Combinatorial optimization of mRNA structure, stability, and translation for RNA-based therapeutics. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1536
- [60] Parvathy ST, Udayasuriyan V, Bhadana V. Codon usage bias. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(1): 539-565
- [61] Wei CJ, Crank MC, Shiver J, et al. Next-generation influenza vaccines: opportunities and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(4): 239-252
- [62] Garabagi F, Gilbert E, Loos A, et al. Utility of the P19 suppressor of gene-silencing protein for production of therapeutic antibodies in *Nicotiana* expression hosts. *Plant Biotechnol J*, 2012, 10(9): 1118-1128
- [63] Sheva M, Hanania U, Ariel T, et al. Sequential genome editing and induced excision of the transgene in *N. tabacum* BY2 cells. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 607174
- [64] Hu WS. Cell culture bioprocess engineering: continuous cell culture processes[M]. 2th ed. United States: Boca Raton: CRC Press, 2020: 1-23
- [65] Verdú-Navarro F, Moreno-Cid JA, Weiss J, et al. The advent of plant cells in bioreactors. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1310405
- [66] Huebbers JW, Buyel JF. On the verge of the market-plant factories for the automated and standardized production of biopharmaceuticals. *Biotechnol Adv*, 2021, 46: 107681
- [67] Kashima K, Yuki Y, Mejima M, et al. Good manufacturing practices production of a purification-free oral cholera vaccine expressed in transgenic rice plants. *Plant Cell Rep*, 2016, 35(3): 667-679
- [68] Frigerio R, Marusic C, Villani ME, et al. Production of two SARS-CoV-2 neutralizing antibodies with different potencies in *Nicotiana benthamiana*. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 956741
- [69] Madeira LM, Szeto TH, Henquet M, et al. High-yield production of a human monoclonal IgG by rhizosecretion in hydroponic tobacco cultures. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(2): 615-624
- [70] Lonoce C, Marusic C, Morrocchi E, et al. Enhancing the secretion of a glyco-engineered anti-CD20 scFv-Fc antibody in hairy root cultures. *Biotechnol J*, 2019, 14(3): 1800081
- [71] Ulmer N, Vogg S, Müller-Späth T, et al. Purification of human monoclonal antibodies and their fragments. *Methods Mol Biol*, 2019, 1904: 163-188
- [72] Faye L, Grünwald-Gruber C, Vezina LP, et al. A fast and easy one-step purification strategy for plant-made antibodies using protein A magnetic beads. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1276148
- [73] Gengenbach BB, Opdensteinen P, Buyel JF. Robot cookies-plant cell packs as an automated high-throughput screening platform based on transient expression. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 393