



Producción de proteínas recombinantes farmacéuticas en sistemas vegetales: Una mirada al Factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF).

Production of pharmaceutical recombinant proteins in plant systems: A glimpse into Human Epidermal Growth Factor (hEGF).

Recibido: 15/01/2024 - Aceptado: 21/06/2024 - Publicado: 11/09/2024

Autores

Carlos Julio Nova López*

Ingeniero Biológico, MsC. Instituto Colombiano de Medicina Tropical-Universidad CES.
Medellín- Colombia
cjnoval@unal.edu.co

Javier Mauricio Torres Bonilla

Biólogo, MsC, PhD. Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia.
Medellín- Colombia

Dary Luz Mendoza Mesa

Química Farmacéutica, MsC, PhD. Universidad del Atlántico.
Medellín- Colombia

Rafael Eduardo Arango Isaza

Médico, MsC, PhD. Universidad Nacional de Colombia.
Medellín- Colombia.

***Autor de correspondencia**

RESUMEN

Introducción: Las proteínas recombinantes son esenciales para el tratamiento de enfermedades complejas debido a su alta eficacia y seguridad. Su producción involucra manipulación genética y el uso de sistemas biológicos, incluyendo células bacterianas, de mamíferos e insectos. Sin embargo, los sistemas basados en plantas están emergiendo como una alternativa prometedora, con ventajas como menores costos y menor riesgo de contaminación.

Objetivo: Esta revisión tiene como objetivo examinar los aspectos clave de la producción de proteínas en plataformas de expresión vegetal, con un enfoque particular en los avances en la producción de Factor de Crecimiento Epidérmico Humano Recombinante (rhEGF).

Metodología: Se realizó una revisión de la literatura científica y técnica sobre plataformas de expresión vegetal. El análisis incluyó una evaluación de las ventajas, desafíos y aplicaciones de estos sistemas, con especial énfasis en los desarrollos recientes en la producción de rhEGF.

Resultados: La revisión revela que los sistemas vegetales han logrado avances significativos en la producción de rhEGF. Estos sistemas ofrecen beneficios como costos reducidos, mayor seguridad y capacidad para producir proteínas con modificaciones postraduccionales adecuadas, mostrando ser una alternativa viable a los métodos tradicionales.

Discusión y Conclusión: Las plataformas de expresión vegetal se presentan como una opción prometedora para la producción de proteínas recombinantes, superando a los métodos tradicionales en términos de eficiencia y seguridad. Los resultados positivos en la producción de rhEGF sugieren que esta tecnología podría ser adoptada ampliamente en la industria farmacéutica y cosmética en el futuro cercano.

Palabras Claves: Agricultura molecular, proteínas heterólogas, sistemas de expresión vegetal, biosimilares, células vegetales en suspensión.

ABSTRACT

Introduction: Recombinant proteins are crucial for the treatment of complex diseases due to their high efficacy and safety. Their production involves genetic manipulation and the use of biological systems, including bacterial, mammalian, and insect cells. However, plant-based systems are emerging as a promising alternative, offering advantages such as reduced costs and lower risk of contamination.

Objective: This review aims to examine the key aspects of protein production using plant expression platforms, with a particular focus on advancements in the production of Recombinant Human Epidermal Growth Factor (rhEGF). This approach enables a detailed assessment of the viability and potential of these systems for pharmaceutical and cosmetic applications.

Methodology: A comprehensive review of the scientific and technical literature on plant expression platforms was conducted. The analysis included an evaluation of the advantages, challenges, and applications of these systems, with particular emphasis on recent developments in the production of rhEGF.

Results: The review reveals that plant-based systems have made significant advancements in the production of rhEGF. These systems offer benefits such as reduced costs, enhanced safety, and the ability to produce proteins with appropriate post-translational modifications, demonstrating their viability as an alternative to traditional production methods.

Discussion and Conclusion: Plant expression platforms are emerging as a promising option for recombinant protein production, surpassing traditional methods in terms of efficiency and safety. The positive outcomes in rhEGF production suggest that this technology could be widely adopted in the pharmaceutical and cosmetic industries in the near future.

Keywords: Molecular farming, heterologous proteins, plant expression systems, biosimilars, plant suspension cells.



INTRODUCCIÓN

Desde sus primeros desarrollos en la década de los años 70's la tecnología del ADN recombinante ha impulsado el crecimiento de la industria biofarmacéutica. La posibilidad de sintetizar genes y de introducirlos mediante vectores de transformación en células u organismos transgénicos que se utilizan como biofábricas de proteínas facilitó el desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades complejas como el cáncer, la diabetes y la esclerosis múltiple. Tal ha sido el impacto de esta tecnología, que desde el desarrollo de la insulina recombinante (año 1984) hasta el año 2023, existían 350 proteínas heterólogas aprobadas por la FDA para uso clínico (1). Estas proteínas se sintetizaron inicialmente utilizando cultivos de *Escherichia coli*, pero la necesidad de obtener proteínas cada vez más complejas (por ejemplo, proteínas glicosiladas, multiméricas o con varios puentes disulfuro) y con costos de producción más bajos motivó la búsqueda de nuevas plataformas de producción eucariotas. Hoy en día, gracias al avance de las técnicas de cultivo celular a gran escala, es posible producir proteínas terapéuticas en una amplia variedad de hospederos eucariotas, incluyendo levaduras, células de mamíferos, de insectos y plantas, entre otras (2).

Los sistemas vegetales de expresión de proteínas recombinantes han sido estudiados desde hace más de 30 años debido a que presentan algunas ventajas sobre las demás plataformas de producción, entre ellas, la capacidad de producir proteínas de varias subunidades y con algunas de las modificaciones postraduccionales necesarias para garantizar la actividad biológica cuando se usan como fármacos en humanos, la facilidad de escalado de los procesos de manufactura y menores costos de producción (3). El conocimiento adquirido durante este tiempo derivó en la aprobación en el año 2012 de la comercialización de la taliglucerasa alfa, la primera proteína terapéutica producida en una plataforma vegetal (4). A nivel experimental se ha

conseguido la expresión en múltiples especies vegetales de un gran número de proteínas terapéuticas que sin embargo no han logrado alcanzar las fases de comercialización (5), principalmente debido a las bajas concentraciones en las que se logran producir. En la actualidad, los esfuerzos se concentran en desarrollar estrategias para incrementar los rendimientos de producción de las proteínas (6–9), las mejoras en las técnicas de purificación (10,11), el desarrollo de líneas vegetales humanizadas capaces de sintetizar proteínas con las modificaciones postraduccionales necesarias para garantizar la funcionalidad terapéutica requerida (12,13), el escalado de los procesos de producción, así como la búsqueda de especies vegetales alternativas a las que tradicionalmente han sido estudiadas.

El factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) es una proteína fundamental en la regulación del crecimiento y la proliferación celular. Su aplicación en la medicina radica en su capacidad para estimular la regeneración celular, lo que lo convierte en un candidato ideal para la producción de terapias destinadas a la cicatrización de heridas y el tratamiento de ciertas enfermedades. La producción de hEGF recombinante en plataformas vegetales ha sido ampliamente estudiada debido a varias ventajas inherentes a este sistema. El estudio de la producción recombinante del EGF puede proporcionar información valiosa sobre cómo optimizar la expresión de proteínas recombinantes en los sistemas de expresión vegetal, incluyendo estrategias para mejorar el rendimiento y la estabilidad del producto final. Por ejemplo, se han desarrollado técnicas para la expresión en tejidos específicos y se han implementado métodos para la mejora de la solubilidad y la estabilidad. Estos avances no solo han permitido la producción eficiente de EGF, sino que también han establecido una base sólida para la producción de otras proteínas terapéuticas en sistemas vegetales, ofreciendo una perspectiva prometedora para el futuro de la biotecnología farmacéutica.

En el siguiente trabajo se presenta una revisión de la

tecnología de producción de proteínas recombinantes farmacéuticas en plataformas vegetales, haciendo énfasis en los desarrollos alcanzados con la producción del hEGF.

METODOLOGÍA

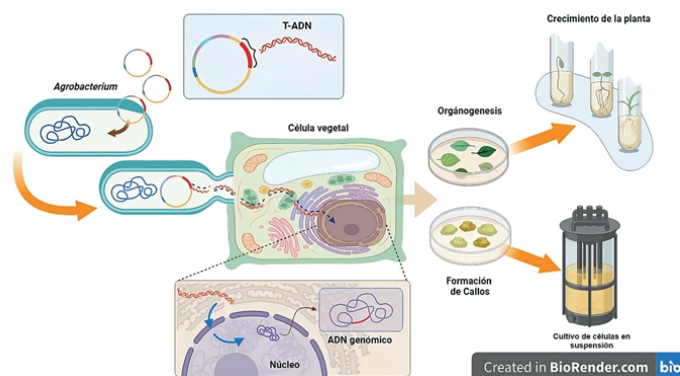
Se revisó literatura científica (artículos de investigación original, artículos de revisión, capítulos de libro y editoriales) obtenida de bases y repositorios académicos como Sciencedirect, PubMed, Elsevier, Wiley online library y SciELO. Para la selección de los artículos se emplearon las siguientes ecuaciones de búsqueda: Ecuación 1: ("recombinant proteins" OR "recombinant protein production") AND ("plant expression systems" OR "molecular farming" OR "plant-based production"); Ecuación 2: ("growth factors" OR "epidermal growth factor" OR "EGF") AND ("recombinant production" OR "plant expression systems") AND ("pharmaceuticals" OR "biopharmaceuticals"). Se seleccionaron de manera manual los trabajos que incluían información relevante para la subtemáticas abordadas en en la revisión.

SISTEMAS VEGETALES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

La producción de proteínas recombinantes en plataformas vegetales inicia con la inserción de la secuencia del gen que codifica para la proteína de interés dentro de la célula o la planta hospedera. Este proceso de transformación genética puede llevarse a cabo por métodos físicos, como balística, microinyección o electroporación, pero el método más común es la infección o la agroinfiltración con *Agrobacterium tumefaciens*; esta bacteria *Gram-negativa* tiene la capacidad natural de infectar las plantas y de transferir la región ADN-T de un plásmido (denominado Ti) que contiene una serie de genes onc y op que codifican para la síntesis de proteínas inductoras de la formación de tumores en las plantas y de productos que sirven de fuente de carbono y nitrógeno para la bacteria (14). Por técnicas de

ingeniería genética se han construido vectores basados en versiones desarmadas del plásmido Ti a los que se le eliminan los genes oncogénicos y en los que la región ADN-T es reemplazada por el gen de la proteína heteróloga que se desea expresar, usualmente bajo el control de secuencias promotoras que regulan su expresión (15). En la práctica se infectan tejidos vegetales con cepas de *Agrobacterium* que contienen estos vectores y, una vez dentro del núcleo de las células, la secuencia foránea puede o no integrarse al cromosoma, determinando de esta forma si la expresión de la proteína se realizará de manera estable o transitoria (16) (**Figura 1**).

Figura 1. Proceso de transformación de cultivos vegetales mediante infección mediada por *A. tumefaciens* para la producción de proteínas.



Fuente: Elaboración propia, usando el programa Biorender.

Luego de la obtención de las células transformadas existen diferentes estrategias para la producción de las proteínas recombinantes. Una alternativa consiste en el uso de plantas completas que se cultivan en invernaderos y que expresan las proteínas de manera estable o transitoria (17). En este caso, las proteínas pueden producirse a lo largo de todos los tejidos o en zonas específicas de las plantas, como las hojas, las semillas o los frutos (17–23). También es posible utilizar técnicas de cultivos de tejidos vegetales *in vitro* para establecer cultivos de células indiferenciadas en suspensión, en cuyo caso las proteínas pueden acumularse a nivel intracelular dentro de algún compartimiento de la célula (retículo endoplasmático por ejemplo) o excretarse al medio de cultivo (24–27).



Dentro de esta categoría también se incluyen los sistemas de producción basados en el cultivo de raíces peludas, o hairy roots (28–30), así como las plataformas de producción que emplean cultivos de algas y de musgos (31–33).

Independientemente del sistema de producción utilizado, las plataformas vegetales presentan costos de producción más bajos que las plataformas de expresión en células de animales; además, al no tener riesgo de contaminación con patógenos humanos, las proteínas

heterólogas de origen vegetal tienen un mayor grado de bioseguridad. A lo anterior se le suma la capacidad que tienen las células vegetales de realizar modificaciones postraduccionales, lo que permite la síntesis de proteínas complejas que no pueden ser producidas en las plataformas bacterianas. Estas características han supuesto el uso de los sistemas vegetales para la producción de proteínas terapéuticas que se encuentran en diferentes fases de desarrollo clínico (**Tabla 1**).

Tabla 1. Proteínas terapéuticas de origen vegetal en fases avanzadas de desarrollo.

Proteína	Clase	Sistema de expresión	Estado de desarrollo	Empresa o laboratorio	Referencia/Enlace
β-Glucocerebrosidasa (ELELYSO®)	Enzima	<i>Daucus carota</i> (Células)	Comercial	Protalix Biotherapeutics Inc. Pfizer (bajo licencia)	(34)
Colágeno (Vergenix®)	Otras	<i>Nicotiana tabacum</i>	Comercial	ColiPlant Inc.	(35)
Factor de crecimiento de Fibroblastos	Factor de Crecimiento	<i>Oriza sativa</i>	Comercial (Cosmético)	Genecell BioNTech	http://www.nbms.co.kr/?page_id=871
Antígeno de la superficie de la hepatitis B	Anticuerpo	<i>N. tabacum</i>	Comercial	Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba	(5)
Anticuerpos contra el ébola (ZMAPP®)	Anticuerpo	<i>N. tabacum</i>	Fase III*	Mapp Biopharmaceutical	(36)
Uricasa	Citocina	<i>Daucus carota</i> (Células)	Fase I	Protalix Biotherapeutics Inc.	https://protalix.com/pipeline/
Anticuerpo de cadena sencilla (scFv) para linfoma no Hodking	Anticuerpo	<i>N. tabacum</i>	Fase I	Large Scale Biology Corp	(37)
Influenza Hemaglutinina	Vacuna	<i>N. benthamiana</i>	Fase I	Fraunhofer (CMB)	(38)
Anticuerpos contra HSV/HIV	Anticuerpos	<i>N. Benthamiana</i>	Fase I	Bayer/ICON genetics	(39)
Insulina humana	Hormona	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Fase II	SemBioSys Genetics	(23)
Factor intrínseco humano	Otras	<i>A. thaliana</i>	Fase II	Universidad Aarhus Dinamarca	(40)
Ibio-101	Otras	<i>N.tabacum</i>	Preclínica	iBio	https://ibioinc.com/pipeline/ibio-101/
Ranbizamab	Anticuerpo	<i>N.Benthamiana</i>	Preclínica	Plant Form	http://www.plantformcorp.com/products.aspx

Nota: A pesar de estar en fase experimental, el cocktail de anticuerpos ZMAPP fue utilizado por la Organización mundial de la Salud (OMS) en tres pacientes durante la epidemia del ébola de 2014 en África. En la actualidad, la vacuna está descontinuada.

Fuente: Elaboración propia.

EXPRESIÓN ESTABLE

Los sistemas de expresión estables fueron los primeros en ser implementados y con ellos se establecieron los organismos modelo que, como el tabaco (*N. tabacum/N. benthamiana*), la zanahoria (*D. carota*) y el arroz (*O. sativa*), dominarían la tecnología de producción de proteínas heterólogas vegetales. En esta estrategia de producción el gen de interés se inserta dentro del ADN cromosomal o plasmídico de las células hospedadoras. Debido a que la secuencia está constitutivamente unida al material genómico del huésped, esta puede transmitirse a la plantas o células hijas a lo largo de las etapas de propagación (41). Esto permite que las líneas vegetales utilizadas puedan ser caracterizadas, estandarizando de esta forma los lotes de producción de las proteínas.

Cuando la transformación genética se realiza por medio *Agrobacterium* o por biobalística, la secuencia de interés se inserta de manera aleatoria en el ADN y el nivel de expresión de la proteína estará determinado por efectos de posición (42,43). Así mismo, el transgén puede estar presente en copias únicas o múltiples, lo que puede favorecer la expresión del gen o afectar los rendimientos de producción debido al silenciamiento por homología (44). Estos fenómenos hacen que el proceso de desarrollo, *screening* y caracterización de las líneas transgénicas estables sea largo, pero una vez superadas estas etapas es posible producir las proteínas heterólogas en concentraciones que, en el caso de expresión en sistemas de plantas, alcanzan los 100 µg por Kg de peso fresco (5).

Con el fin de aumentar los rendimientos de la expresión de las proteínas se ha explorado el uso de líneas transplastómicas, en las que el gen de interés se integra dentro del ADN de los cloroplastos. Con esta estrategia es posible insertar por recombinación homóloga el gen deseado en regiones definidas del ADN, eliminando así los efectos de posición. Adicionalmente, el alto número de cloroplastos por célula y el elevado nivel de ploidía asegura altos niveles de expresión y de acumulación de las proteínas heterólogas (45).

En plantas transgénicas estables es posible acumular las proteínas heterólogas en órganos específicos; para

conseguir esto se utilizan secuencias de señalización que envían las proteínas a órganos determinados o promotores de transcripción que son funcionales únicamente en tejidos particulares. Las semillas y los frutos son los órganos en los que usualmente se suelen acumular las proteínas heterólogas, debido a que ofrecen ventajas en términos de purificación, almacenamiento, escalado y transporte (46).

EXPRESIÓN TRANSITORIA

Actualmente la mayoría de las proteínas terapéuticas que se encuentran en evaluación clínica y preclínica se producen en sistemas vegetales de expresión transitoria (3). Con esta modalidad de expresión se reducen los tiempos de desarrollo de las líneas transgénicas y se alcanzan mayores concentraciones de proteínas en periodos de tiempo más cortos. A diferencia de la expresión estable, en este caso el gen que codifica para la proteína terapéutica no se integra al genoma nuclear o plasmídico, sino que se transcribe directamente en el citoplasma del hospedero.

En esta modalidad de expresión se aprovecha la capacidad que tienen algunos virus de infectar a las plantas y de secuestrar la maquinaria enzimática vegetal para la replicación de su material genético y la síntesis de las partículas virales. En el genoma de estos virus de ADN o ARN está codificada además la información que dirige la supresión de los mecanismos de defensa del huésped y la capacidad de expansión de la infección hacia las células no afectadas. Los vectores de expresión transitoria más recientes están basados en versiones reducidas de estos virus, en los cuales se conservan las secuencias esenciales para garantizar la síntesis de la proteína heteróloga y la propagación sistémica del virus en los tejidos de las plantas. Estas secuencias virales normalmente se introducen junto con la secuencia del gen de interés, los promotores y demás elementos regulatorios, en la región ADN-T de vectores de *Agrobacterium*; por lo que los eventos de la infección inicial están controlados en este caso por la bacteria y no por secuencias virales (3,16). Sin embargo, otros mecanismos de entrega incluyen el uso directo de vectores desnudos de ADN o de transcritos infecciosos previamente sintetizados (47). Luego de la



entrada a las células, la secuencia foránea es transcrita y traducida por las enzimas vegetales, lo que provoca la síntesis conjunta de la proteína terapéutica y de las demás proteínas encargadas de la multiplicación y transporte del virus a nuevas células, en donde el proceso se repite de manera cíclica. Algunos vectores contienen secuencias que codifican para enzimas ARN polimerasas dependiente de ARN que promueven la sobreproducción de ARNm y, por tanto, la síntesis de las proteínas terapéuticas de interés (3).

Las concentraciones de proteína obtenida por este método alcanzan el 80% de proteínas soluble total (PST) (3), con cantidades de proteína en el orden de los 4 g por Kg de peso (5), dependiendo de la naturaleza del vector. Entre estos, los más utilizados contienen secuencias de los Virus del Mosaico del Tabaco (TMV), el Virus del Mosaico del Frijol (CPMV) y el Virus X de la Papa (PVX). Los vectores MagnICON®, comercializados por la empresa ICON genetics, destacan por ser los más populares (48–50).

A diferencia de la expresión estable, la expresión transitoria es menos versátil en cuanto a las posibilidades de escalado industrial, ya que el sistema es aplicable únicamente a plantas completas cultivadas en campo o en condiciones de invernadero, y no a sistemas de cultivos de tejidos o de células en suspensión. Dado que la regulación farmacéutica está mejor definida en los sistemas de producción basados en fermentaciones líquidas, muchos de los esfuerzos de la tecnología de producción de proteínas vegetales en plantas están concentrados en adoptar Buenas Prácticas de Manufactura que permitan obtener la autorización para la comercialización de los productos por parte de los organismos regulatorios (50,51). Este punto ha sido identificado como uno de los cuellos de botella en el proceso de transferencia de las proteínas farmacéuticas al mercado.

EXPRESIÓN EN CULTIVOS DE TEJIDOS *IN VITRO*

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* comprende el crecimiento de células vegetales indiferenciadas o de tejidos particulares en ambientes controlados y

estériles. Cuando las células o los tejidos están transformados con secuencias foráneas que codifican para las proteínas de interés es posible establecer métodos de producción escalables que permiten purificar las proteínas siguiendo procedimientos equiparables a los utilizados por los sistemas de producción bacterianos y de mamíferos.

EXPRESIÓN EN CULTIVOS DE CÉLULAS VEGETALES EN SUSPENSIÓN

El cultivo de células vegetales en suspensión consiste en la propagación *in vitro* de células derivadas de cualquier tejido vegetal que se mantienen agitadas y en condiciones asépticas en un medio de cultivo líquido (52). El cultivo se compone de un conjunto de células aisladas y de agregados celulares compuestos por 2 a 100 células (53) y que pueden o no tener algún grado de diferenciación y/o especialización.

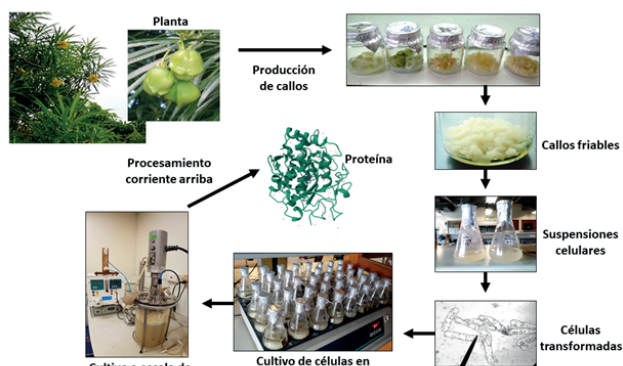
Para el establecimiento de las suspensiones se toman porciones de tejidos diferenciados de la planta, denominados explantes, que luego de un proceso de desinfección se transfieren a un medio de cultivo sólido para promover la proliferación masiva de células indiferenciadas (callos). Una vez se obtienen callos friables, es decir, callos compuestos por células que tienen la capacidad de separarse con relativa facilidad unas de otras después de una división celular, estos se transfieren a un medio de cultivo líquido en donde las células pueden crecer en suspensión y ser mantenidas y multiplicadas a lo largo del tiempo con la renovación oportuna del medio de cultivo.

Dependiendo de la concentración hormonal, y en especial de la relación de concentración de auxinas/citoquininas, un callo puede derivar en la regeneración de una nueva planta o en la proliferación de un tejido particular (raíces, hojas, etc), por lo que esta variable, al igual que el tipo, tamaño y edad del explante, es importante al momento de iniciar los cultivos.

Existen dos vías para obtener cultivos de células

vegetales transformadas. Una de ellas consiste en tomar los explantes de una planta previamente transformada y a partir de ellas inducir la callogénesis para el posterior establecimiento de las suspensiones. El otro enfoque implica obtener los callos a partir de explantes silvestres para luego transformarlos con cualquiera de los métodos de transformación genética disponibles (54) (**Figura 2**).

Figura 2. Esquema general del proceso de producción de proteínas recombinantes mediante el cultivo de células vegetales en suspensión.



Fuente: Elaboración propia.

Los cultivos de células en suspensión ofrecen la posibilidad de cultivar grandes volúmenes de células gracias al uso de biorreactores. Adicionalmente, las células transformadas mantienen las mismas ventajas que ofrecen las plataformas basadas en el cultivo de plantas completas, con el beneficio adicional de que la tecnología de fermentación es análoga a la de los sistemas bacterianos y de mamíferos; razón por la cual, los conocimientos adquiridos por años en estas plataformas son fácilmente adaptables a las células vegetales. Actualmente, dos proteínas recombinantes de origen vegetal cuentan con aprobación vigente de organismos internacionales para uso terapéutico comercial en humanos: la Glucocerebrosidasa, una enzima utilizada para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher y que es producida en cultivos de células en suspensión de zanahoria, empleando biorreactores desechables con capacidad de 400 L; y la proteína spike del virus SARS-CoV-2, sintetizada como una Partícula Similar a Virus (VLPs) en plantas de *Nicotiana benthamiana*, y que fue autorizada en Canadá como vacuna contra el COVID-19 (4,27,34).

Las células de tabaco, arroz, zanahoria y alfalfa (*Medicago sativa*) son las especies hospederas más utilizadas para la producción de proteínas terapéuticas (55). En estos sistemas se han logrado expresar hormonas, anticuerpos, factores de crecimiento, enzimas y citocinas (56). Con el objetivo de incrementar los rendimientos de producción se han aplicado estrategias dirigidas a la optimización de los medios de cultivo (modulación fuentes de carbono, nitrógeno, etc) (57–59); las condiciones físicas de cultivo (velocidad de agitación del reactor, pH, temperatura, oferta de oxígeno) (24); el tipo de biorreactor (tanque agitado, airlift, etc), los modos de fermentación (suministro continuo de nutrientes, suministro por lotes o por lotes alimentados, etc) (24,60,61). De igual forma, se han empleado estrategias para, de acuerdo a las necesidades particulares, exportar las proteínas al medio intracelular o acumularlas en organelos o compartimientos celulares específicos (62,63). La búsqueda de promotores constitutivos o inducibles para aumentar la expresión de la secuencia exógena también es una estrategia efectiva para optimizar la producción de las proteínas en las suspensiones (64,65).

EXPRESIÓN EN CULTIVOS DE RAÍCES PELUDAS

La infección de explantes vegetales con cepas virulentas de *Agrobacterium rhizogenes* induce la formación masiva de raíces con vellosidades laterales que emanan desde el punto de la infección. Este fenómeno tiene lugar debido a la presencia de unos genes, denominados genes rol, en el T-DNA del plásmido Ri de la bacteria (66,67). Al igual que ocurre con *A. Tumefaciens*, la región T-DNA del plásmido Ri es aprovechada para servir de elemento portador de genes que codifican para proteínas de interés farmacéutico (68).

Los cultivos *in vitro* de raíces peludas se han propuesto como plataforma de expresión de proteínas recombinantes principalmente por su capacidad de excretar de manera continua las proteínas al medio extracelular, lo que facilita los procesos de purificación. Las raíces pueden crecer en medios de cultivo líquidos



sin la necesidad de la adición de reguladores hormonales; y esto, sumado al hecho de que son tejidos organizados, hace que la expresión de las proteínas sea más estable que en los cultivos de células en suspensión. (55,68).

A pesar de que se ha logrado expresar diversas proteínas en este sistema (29,69–71), los niveles de producción son bajos. Además, debido al patrón de crecimiento de las raíces, el escalado es especialmente complejo.

EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO HUMANO (hEGF)

El Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (Human Epidermal Growth Factor, hEGF), es un polipéptido de 6.200 dalton, compuesto por 53 aminoácidos. Su estructura tridimensional está estabilizada por la presencia de tres puentes disulfuro proporcionados por seis residuos de cisteína que son claves para su actividad biológica.

Este polipéptido, perteneciente a la familia de las citocinas, fue descubierto en la década de 1960 y hace parte de una familia de péptidos relacionados que se caracterizan por tener una secuencia homóloga, unirse al mismo receptor (EGF-r) y llevar a cabo funciones biológicas similares.

En su forma natural, el péptido está integrado a las células mediante tres dominios: un dominio citoplasmático, uno transmembránico y uno extracelular. Este último se escinde por proteólisis y constituye la forma madura y activa de la molécula.

La función biológica del hEGF está estrechamente relacionada con la existencia de un receptor específico denominado EGF-r. Para que un tejido responda a la acción del EGF, las células dianas deben poseer en sus membranas los receptores EGF-r. Una vez el hEGF se fija al receptor en la superficie de la membrana, éste se fosforila en residuos de tirosinas ubicados la región citoplasmática. Posteriormente, el receptor actúa como sitio de unión a proteínas de señalización que se activan o inactivan por fosforilación y que desencadenan

posteriormente una serie de eventos bioquímicos definidos. Entre estas proteínas se encuentran las proteínas Ras, que interactúan con el ADN provocando aumentos en los niveles de proliferación celular. De esta manera, el hEGF actúa como efector de la mitosis y la división celular, por lo que su uso como droga se da principalmente en aquellos casos en los que se pretende la regeneración o el mantenimiento de la integridad de ciertos tejidos celulares, en especial los tejidos epidérmicos y epiteliales (72).

Las propiedades biológicas del hEGF se han demostrado extensamente en ensayos *in vivo* e *in vitro*. A nivel sistémico, el hEGF es un mitógeno para una gran diversidad de células integradas en tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico. El dímero hEGF/EGF-r, estimula la migración de células productoras hacia áreas de tejidos lesionados, con el posterior aumento en la secreción de componentes de la matriz extracelular (colágeno, entre otros) y la inducción de angiogénesis; lo que finalmente desencadena la proliferación epitelial y de miofibroblastos en las zonas perjudicadas. Debido a estas propiedades, el hEGF se ha usado para el tratamiento de lesiones ulcerosas en pacientes con diabetes (73), la aplicación tópica para el tratamiento de quemaduras (74), los procedimientos pos-operatorios que requieren asistencia en la cicatrización, el tratamiento de pacientes con necrosis tubular aguda crónica (75) y úlceras gástricas (76). Además, como el factor está relacionado con la cicatrización, la curación de heridas y el mantenimiento de la integridad y la regeneración de la piel, también ha encontrado una importante aplicación en el campo cosmético (77–79).

SISTEMAS DE EXPRESIÓN DEL hEGF

En la actualidad, las principales plataformas de expresión del hEGF son las bacterias y las levaduras. Microorganismos como *E. coli*, *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*, se han empleado para establecer procesos industriales en los que se cultivan en reactores de grandes volúmenes células capaces de expresar el factor (80–84). Uno de los casos más representativos es el del Centro de Ingeniería Genética

y Biotecnología de Cuba, que cuenta con una planta pionera en la producción del hEGF, y desde la cual se exporta y se licencia el principio activo a la mayoría de países de América Latina, a España, China y otros países de Europa (80,83). Como parte de un plan de salud nacional, en este país se redujo hasta en un 80% el riesgo de amputación en personas con diabetes gracias al empleo del hEGF como fármaco para el tratamiento del pie diabético.

Se ha reportado la expresión del hEGF en plantas y

células vegetales (85–87). Algunos de estos desarrollos han alcanzado fases de comercialización que contemplan el empleo del Factor como fármaco, como biomolécula para investigación a nivel de laboratorio y como cosmético. Las empresas Plantaderma, ORF Genetics y Natural Bio-Materials, producen la molécula utilizando plantas de tabaco, cebada y arroz como hospederos; empleando además estas plataformas para la expresión de otras proteínas de interés farmacéutico. En la **Tabla 2** se presentan la información de los casos de comercialización del hEGF.

Tabla 2. Formas comerciales del Factor de crecimiento epidérmico hEGF.

EGF-h recombinante	Plataforma de Expresión	Aplicación	Empresa	Referencia
Heberprot	<i>S. cerevisiae</i>	Tratamiento del pie diabético	CIGB	https://www.cigb.edu.cu/product/heberprot-p/
rhEGF	Tabaco (plantas)	Cosmético	Agrenvec	https://www.agrenvec.es/producto/recombinant-human-egf/
Bioeffect EGF serum	Cebada (semillas)	Cosmético	ORF Genetics	https://www.thebioeffect.ca/our-egf
Epitensive	<i>N. benthamiana</i>	Cosmético	Lipotrue	https://lipotrue.com/es/productos/epitensive/
hEGF	<i>E. coli</i>	Reactivo de laboratorio	Cell Signaling Technology	https://www.cellsignal.com/products/cytokines/human-epidermal-grwth-factor-hegf/8916
Recombinant Human EGF	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	Reactivo de laboratorio	Higeta Shoyu Co	https://en.tokyofuturestyle.com/higetashoyu

Fuente: Elaboración propia.

PRODUCCIÓN DEL HEGF EN PLATAFORMAS VEGETALES: ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LOS RENDIMIENTOS DE PRODUCCIÓN

Como se indicó anteriormente, el hEGF ha logrado expresarse en distintas plataformas vegetales, con incluso algunos casos exitosos de industrialización y comercialización. Sin embargo, la concentración en la que se obtiene la proteína es considerablemente inferior a la obtenida en las plataformas bacterianas y de levaduras. Mientras que la máxima producción reportada para un sistema de cultivo vegetal de células

en suspensión es de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de hEGF, para el cultivo de células de *E. coli* se reportan concentraciones de hasta 2 x 105 $\mu\text{g L}^{-1}$ (**Tabla 3**). Este inconveniente no ha impedido que el hEGF de origen vegetal pueda alcanzar fases de mercado, pero esto ocurre porque la molécula se ha comercializado principalmente como un producto cosmético, con estrategias de mercado en las que además de los beneficios de la proteína se anuncian también propiedades adicionales de los extractos vegetales de las plataformas en donde se produce. En general, los extractos vegetales son bien recibidos por el público, ya que en el imaginario común está instalada la idea de que son buenos para la salud de la piel. Este es el caso de la empresa ORF Genetics (**Tabla 2**), que comercializa un suero tópico en el que el hEGF se encuentra combinado en muy baja concentración con extractos de las plantas de cebada en el que es



sintetizado, lo que hace que el producto cuente con un nicho definido de mercado.

Tabla 3. Comparación entre los rendimientos de producción del hEGF reportados en plataformas vegetales, bacterianas y de levaduras.

Plataforma de Expresión	Concentración Máxima Producida	Referencia
Plataformas Vegetales		
Semillas de maíz	129 $\mu\text{g g}^{-1}$ biomasa seca	(88)
Fruto de tomate	0.38 ng g^{-1} biomasa fresca	(89)
Plantas de tabaco (<i>N. tabacum</i>)	0.040 $\mu\text{g g}^{-1}$ biomasa fresca	Patente (US 2006/0195945 A1, 2006)
Plantas de melón (<i>Cucumis melo</i>)	0.041 $\mu\text{g g}^{-1}$ biomasa fresca	Patente (US 2006/0195945 A1, 2006)
Plantas de pepino (<i>Cucumis sativa</i>)	0.333 $\mu\text{g g}^{-1}$ biomasa fresca	Patente (US 2006/0195945 A1, 2006)
Plantas de Sandía (<i>Citrullus vulgaris</i>)	0.036 $\mu\text{g g}^{-1}$ biomasa fresca	Patente (US 2006/0195945 A1, 2006)
Plantas de nabo (<i>Brassica campestris</i>)	0.049 $\mu\text{g g}^{-1}$ biomasa fresca	Patente (US 2006/0195945 A1, 2006)
Plantas de tabaco (<i>N. tabacum</i>)	3000 $\mu\text{g g}^{-1}$ biomasa fresca	(90)
Plantas de tabaco (<i>N. tabacum</i>)	6.24% Proteína soluble total (TSP)	(91)
Semillas de arroz (<i>O. sativa</i>)	7.8% TSP	(92)
Cloroplastos de tabaco (<i>N. tabacum</i>)	10.21% TSP	
Plantas de tabaco (<i>N. tabacum</i>)	34.2 $\mu\text{g g}^{-1}$ biomasa fresca	(93)
Células y raíces de Tabaco (<i>N. tabacum</i>)	0.0015 $\mu\text{g g}^{-1}$ biomasa fresca	(87)
Raíces de maní (<i>Arachis Hypogaea</i>)	10.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ biomasa seca	(29)
Plataformas Bacterianas y de Levaduras		
<i>Pichia Pastoris</i>	2270 $\mu\text{g L}^{-1}$	(81)
<i>Saccharomises cereviseae</i>	3500 $\mu\text{g g}^{-1}$ biomasa	(83)
<i>E. coli</i>	2.9x10 ⁴ $\mu\text{g L}^{-1}$	(94)
<i>E. coli</i>	2.0x10 ⁵ $\mu\text{g L}^{-1}$	(95)

Fuente: Elaboración propia.



Un panorama distinto al anterior se encuentra en el caso de las aplicaciones farmacéuticas, en donde se requieren volúmenes del hEGF que actualmente no se pueden alcanzar con plataformas vegetales. En este caso es más viable producir la proteína en plataformas bacterianas o de levaduras; que a pesar de ser sistemas biológicos menos complejos que los sistemas vegetales, tienen la capacidad de producir la proteína con la conformación estructural correcta, introduciendo incluso los tres puentes disulfuro presentes en la misma.

Existen diversas estrategias que se pueden aplicar para aumentar las concentraciones de hEGF producido en plataforma vegetales. Estas aproximaciones han sido implementadas para otras proteínas, e incluso algunas han sido también utilizadas con éxito en otras plataformas no vegetales. A continuación, se presentan algunas de ellas.

ESTRATEGIAS BASADAS EN EL DISEÑO DEL VECTOR DE TRANSFORMACIÓN

Optimización de codones

La síntesis de proteínas es dependiente de la abundancia de los ARNt que introducen los aminoácidos a la cadena creciente durante la traducción. La abundancia de ARNt varía según especie, por lo que una buena alternativa para favorecer la síntesis de las proteínas es optimizar los codones del gen de interés de acuerdo con la frecuencia de uso de codones favorecidos por la especie que se utilizara como hospedero (88,96,97).

Promotores y terminadores de la transcripción

El grado de expresión de las proteínas está determinado en gran parte por las secuencias reguladoras que flanquean al gen de interés dentro del vector. En el caso de la producción de proteínas recombinantes, los promotores de la transcripción inducen la formación del ARNm por medio del favorecimiento de la unión de la ARN polimerasa a las

regiones del ADN ubicadas corriente abajo del gen de interés. Para la producción del hEGF en plataformas vegetales, el promotor más utilizado es el promotor CaMV 35S (29,90,98,98); mientras que el terminador predilecto es el terminador NOS (98).

Existen promotores y terminadores con mayor potencia que otros. Por ejemplo, Diamos y Mason evaluaron 20 terminadores diferentes en plantas de *N. benthamiana* y encontraron que ocho de los promotores utilizados eran mejores que el terminador NOS. En este estudio se utilizó además el promotor CaMv 35 unido a una región no transcrita 5' del virus TMV (99). El uso de alguno de estos promotores y terminadores podría ser efectivo para aumentar la producción del hEGF.

Secuencias de unión a la matriz

En el caso de la expresión estable, la unión de la RNA polimerasa al ADN está afectada por el grado de condensación del cromosoma. En general, la transcripción se ve favorecida cuando el gen de interés está ubicado en zonas relajadas, que son las zonas transcripcionalmente más activas. Las secuencias de unión a la Matriz (MARs) son secuencias de ADN que se ubican corriente arriba o corriente abajo del gen de interés y que inducen cambios topológicos en el cromosoma, favoreciendo la transcripción de las secuencias foráneas y reduciendo los fenómenos de silenciamiento asociados a los efectos de posición (42,100). Se ha observado que en plantas, la inclusión en el vector de un fragmento de 463 pb de la secuencia MARs Rb7, aumenta hasta 60 veces la expresión de la proteína heteróloga (99). Bai y colaboradores probaron una secuencia MARs de *S. cerevisiae* y observaron que su inclusión en el vector favorecía la producción del hEGF (90), aunque en este trabajo no se tuvo en cuenta el efecto del número de copias del inserto, por lo que no es posible atribuir la sobreexpresión exclusivamente al uso de la secuencia MARs.

Secuencias de señalización

Los péptidos de señalización determinan el sitio de la célula en el que se acumulará la proteína heteróloga. En algunos casos la acumulación en una zona de compartimentalización específica (plastidios, aparato



de Golgi, lumen, etc) facilita los procesos de separación y purificación de las proteínas, lo que se traduce en mayores niveles de producción. (101) En otras ocasiones, las secuencias señalizadoras se utilizan para enviar las proteínas que requieren alguna modificación postraducciona a los sitios celulares en los que dichas modificaciones tienen lugar. En tabaco se evaluó la secuencia de señalización KDL para acumular el hEGF en el retículo endoplasmático, pero el efecto de sobre la producción de la proteína no fue concluyente debido a problemas en el diseño experimental (No se reporta un control).

ESTRATEGIAS BASADAS EN LA OPTIMIZACIÓN DE LA PURIFICACIÓN

En muchos casos los bajos niveles de producción de las proteínas heterólogas en sistemas vegetales no están relacionados con la incapacidad de la plataforma de expresar la proteína, sino con la dificultad para purificarla del resto de las moléculas presentes en los tejidos del huésped o el medio de cultivo. Diferentes herramientas para mejorar las etapas de purificación pueden ser aplicables al hEGF:

Uso de etiquetas y columnas de afinidad

Las proteínas de interés pueden expresarse con secuencias repetidas de aminoácidos adicionales que tengan afinidad química por columnas cromatográficas. Una vez se tiene el extracto primario, que contiene a la proteína de interés junto con las demás moléculas vegetales, este se pasa a través de la columna sobre la cual quedará fijada únicamente la proteína de interés a través de la unión con la cola de aminoácidos. Posteriormente, las colas son eliminadas mediante el uso de enzimas. Esta estrategia ha sido utilizada efectivamente para la producción del hEGF en cultivos bacterianos y con ella se garantizan altos niveles de purificación (94,102).

Uso de inteínas

Las inteínas son proteínas que tienen la capacidad de

catalizar su propia escisión de otras proteínas a las que se encuentran fusionadas. La inducción del proceso de catálisis se da a pHs específicos. En la práctica, la proteína terapéutica de interés se fusiona a una tag y a una inteína. Cuando el complejo es separado de la columna de afinidad, se induce el cambio de pH y la inteína se autoescinde junto con el tag, liberando de esta forma a la proteína de interés. Las inteínas Ssp y danB han sido utilizadas con éxito para la producción del hEGF en bacterias, pero aún no existen reportes de su implementación en sistemas vegetales (103,104).

Uso de polímeros tipo elastina LP

Los LP son secuencias poliméricas que poseen una característica especial denominada transición de fase sensible a la temperatura: cuando se aumenta la temperatura del medio hasta alcanzar una temperatura denominada temperatura de transición (T_t), el ELP soluble se torna insoluble y forma agregados que pueden precipitarse fácilmente mediante centrifugación. Luego, cuando la temperatura se reduce por debajo de la T_t , el ELP vuelve a solubilizarse. Las proteínas terapéuticas se pueden fusionar con estos polímeros, lo que permite que la molécula híbrida pueda ser separada del extracto celular mediante un paso de centrifugación.

El acoplamiento del EGF-h al ELP y a la inteína permite separar el complejo ELP-inteína-EGF-h del resto de proteínas y productos vegetales no deseados mediante la aplicación de un cambio de temperatura y una etapa de centrifugación. Posteriormente, mediante un aumento del pH, la inteína autoescinde el complejo ELP-Inteína, liberando el hEGF al medio. Este último puede ser recuperado como sobrenadante después de otra etapa de agregación y centrifugación en la que el complejo ELP-inteína se precipita selectivamente mediante la aplicación de la T_t . Esta estrategia fue probada con buenos resultados para la producción del hEGF en *E. coli* (105).

CONCLUSIÓN

Luego de varios años de desarrollos a nivel de laboratorio, las plataformas vegetales de expresión de

proteínas recombinantes han comenzado a superar las pruebas de concepto y han conseguido incursionar en el mercado farmacéutico como alternativa a los sistemas de producción tradicionales. Varias proteínas terapéuticas expresadas en estos sistemas se encuentran en fases de evaluación clínica, por lo que se espera que en los próximos años nuevas proteínas vegetales lleguen al mercado. Aunque existen aún algunas limitaciones relacionadas con los bajos rendimientos en la producción, la aplicación integral de las diferentes estrategias de optimización reseñadas en este artículo permitiría superar estos inconvenientes, particularmente en el caso del hEGF. A diferencia de las otras plataformas de producción, las plataformas vegetales son mucho más versátiles, ya que para una misma especie hospedera es posible implementar diferentes estrategias de producción (plantas, cultivos de células en suspensión, raíces, etc). El conocimiento de las bondades y limitaciones de cada estrategia es clave para decidir cuál es la que mejor se adapta a las necesidades específicas de una proteína particular.

REFERENCIAS

1. Ebrahimi SB, Samanta D. Engineering protein-based therapeutics through structural and chemical design. *Nat Commun.* 27 de abril de 2023;14(1):2411.
2. Lindskog EK, Fischer S, Wenger T, Schulz P. Chapter 6- Host Cells. En: Jagschies G, Lindskog E, Łacki K, Galliher P, editores. *Biopharmaceutical Processing* [Internet]. Elsevier; 2018 [citado 22 de noviembre de 2019]. p. 111-30. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081006238000062>
3. Eidenberger L, Kogelmann B, Steinkellner H. Plant-based biopharmaceutical engineering. *Nat Rev Bioeng.* 21 de marzo de 2023;1-14.
4. Fox JL. First plant-made biologic approved. *Nat Biotechnol.* 1 de junio de 2012;30(6):472-472.
5. Schillberg S, Raven N, Spiegel H, Rasche S, Buntru M. Critical Analysis of the Commercial Potential of Plants for the Production of Recombinant Proteins. *Front Plant Sci* [Internet]. 2019 [citado 23 de noviembre de 2019];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00720/full>
6. Huang TK, Falk BW, Dandekar AM, McDonald KA. Enhancement of Recombinant Protein Production in Transgenic *Nicotiana benthamiana* Plant Cell Suspension Cultures with Co-Cultivation of *Agrobacterium* Containing Silencing Suppressors. *Int J Mol Sci* [Internet]. 24 de mayo de 2018 [citado 23 de noviembre de 2019];19(6). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6032394/>
7. Takaiwa F. Increasing the production yield of recombinant protein in transgenic seeds by expanding the deposition space within the intracellular compartment. *Bioengineered.* 1 de mayo de 2013;4(3):136-9.
8. Habibi P, Prado GS, Pelegrini PB, Hefferon KL, Soccol CR, Grossi-de-Sa MF. Optimization of inside and outside factors to improve recombinant protein yield in plant. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC.* 1 de septiembre de 2017;130(3):449-67.
9. Yamamoto T, Hoshikawa K, Ezura K, Okazawa R, Fujita S, Takaoka M, et al. Improvement of the transient expression system for production of recombinant proteins in plants. *Sci Rep.* 19 de marzo de 2018;8(1):1-10.
10. Wilken LR, Nikolov ZL. Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. *Biotechnol Adv.* abril de 2012;30(2):419-33.
11. Łojewska E, Kowalczyk T, Olejniczak S, Sakowicz T. Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins. *Protein Expr Purif.* abril de 2016;120:110-7.
12. Rozov SM, Permyakova NV, Deineko EV. Main Strategies of Plant Expression System Glycoengineering for Producing Humanized Recombinant Pharmaceutical Proteins. *Biochem Mosc.* 1 de marzo de 2018;83(3):215-32.
13. Schoberer J, Strasser R. Plant glyco-biotechnology. *Semin Cell Dev Biol.* 2018;80:133-41.
14. de la Riva GA, González-Cabrera J, Vázquez-Padrón R, Ayra-Pardo C. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electron J Biotechnol.* diciembre de 1998;1(3):24-5.
15. Hwang HH, Yu M, Lai EM. *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: Biology and Applications. *Arab Book* [Internet]. octubre de 2017 [citado 23 de noviembre de 2019];2017(15). Disponible en:



- <https://bioone.org/journals/The-Arabidopsis-Book/volume-2017/issue-15/tab.0186/Agrobacterium-Mediated-Plant-Transformation-Biology-and-Applications/10.1199/tab.0186.full>
16. Naseri Z, Khezri G, Davarpanah SJ, Ofoghi H. Virus-Based Vectors: A New Approach for Production of Recombinant Proteins. *J Appl Biotechnol Rep.* 15 de marzo de 2019;6(1):6-14.
 17. Davies HM. Review article: Commercialization of whole-plant systems for biomanufacturing of protein products: evolution and prospects. *Plant Biotechnol J.* 1 de octubre de 2010;8(8):845-61.
 18. Firsov A, Shaloiko L, Kozlov O, Vinokurov L, Vainstein A, Dolgov S. Purification and characterization of recombinant supersweet protein thaumatin II from tomato fruit. *Protein Expr Purif.* 1 de julio de 2016;123:1-5.
 19. Zhang H, Liu M, Li Y, Zhao Y, He H, Yang G, et al. Oral immunogenicity and protective efficacy in mice of a carrot-derived vaccine candidate expressing UreB subunit against *Helicobacter pylori*. *Protein Expr Purif.* febrero de 2010;69(2):127-31.
 20. Hernández M, Cabrera-Ponce JL, Fragoso G, López-Casillas F, Guevara-García A, Rosas G, et al. A new highly effective anticysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. *Vaccine.* 22 de mayo de 2007;25(21):4252-60.
 21. Concha C, Cañas R, Macuer J, Torres MJ, Herrada AA, Jamett F, et al. Disease Prevention: An Opportunity to Expand Edible Plant-Based Vaccines? *Vaccines* [Internet]. 30 de mayo de 2017 [citado 24 de noviembre de 2019];5(2). Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5492011/>
 22. Lau OS, Sun SSM. Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production. *Biotechnol Adv.* noviembre de 2009;27(6):1015-22.
 23. Nykiforuk CL, Boothe JG, Murray EW, Keon RG, Goren HJ, Markley NA, et al. Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Biotechnol J.* enero de 2006;4(1):77-85.
 24. Huang TK, McDonald KA. Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochem Eng J.* 15 de agosto de 2009;45(3):168-84.
 25. Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, Fischer R. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat Biotechnol.* noviembre de 2004;22(11):1415-22.
 26. Xu J, Ge X, Dolan MC. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnol Adv.* junio de 2011;29(3):278-99.
 27. Tekoah Y, Shulman A, Kizhner T, Ruderfer I, Fux L, Nataf Y, et al. Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture-the Protalix experience. *Plant Biotechnol J.* octubre de 2015;13(8):1199-208.
 28. Medina-Bolívar F, Cramer C. Production of recombinant proteins by hairy roots cultured in plastic sleeve bioreactors. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2004;267:351-63.
 29. Yao Q, Yu Z, Liu P, Zheng H, Xu Y, Sai S, et al. High Efficient Expression and Purification of Human Epidermal Growth Factor in *Arachis Hypogaea* L. *Int J Mol Sci.* 25 de abril de 2019;20(8).
 30. Fallah A, Akhavian A, Kazemi R, Jafari M, Salmanian AH. Production of Recombinant LSC Protein in *Nicotiana tabacum* Hairy Root: Direct vs. Indirect, a Comparison. *J Appl Biotechnol Rep.* 30 de marzo de 2018;5(1):1-7.
 31. Lu Y, Oyler GA. Green algae as a platform to express therapeutic proteins. *Discov Med.* junio de 2009;8(40):28-30.
 32. Dyo YM, Purton S. The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins. *Microbiology.* 2018;164(2):113-21.
 33. Reski R, Parsons J, Decker EL. Moss-made pharmaceuticals: from bench to bedside. *Plant Biotechnol J.* octubre de 2015;13(8):1191-8.
 34. Pastores GM, Petakov M, Giraldo P, Rosenbaum H, Szer J, Deegan PB, et al. A Phase 3, multicenter, open-label, switchover trial to assess the safety and efficacy of taliglucerase alfa, a plant cell-expressed recombinant human glucocerebrosidase, in adult and pediatric patients with Gaucher disease previously treated with imiglucerase. *Blood Cells Mol Dis.* diciembre de 2014;53(4):253-60.
 35. Farkash U, Avisar E, Volk I, Slevin O, Shohat N, El Haj M, et al. First clinical experience with a new injectable recombinant human collagen scaffold



- combined with autologous platelet-rich plasma for the treatment of lateral epicondylar tendinopathy (tennis elbow). *J Shoulder Elbow Surg.* marzo de 2019;28(3):503-9.
36. Qiu X, Wong G, Audet J, Bello A, Fernando L, Alimonti JB, et al. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* [Internet]. 29 de agosto de 2014 [citado 7 de julio de 2015];advance online publication. Disponible en: <http://www.nature.com/nature/journal/vnfv/ncurrent/full/nature13777.html>
 37. McCormick AA, Reddy S, Reinl SJ, Cameron TI, Czerwinski DK, Vojdani F, et al. Plant-produced idiotypic vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: Safety and immunogenicity in a phase I clinical study. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 21 de julio de 2008 [citado 7 de julio de 2015]; Disponible en: <http://www.pnas.org/content/early/2008/07/18/0803636105>
 38. Shoji Y, Chichester JA, Jones M, Manceva SD, Damon E, Mett V, et al. Plant-based rapid production of recombinant subunit hemagglutinin vaccines targeting H1N1 and H5N1 influenza. *Hum Vaccin.* febrero de 2011;7 Suppl:41-50.
 39. Whaley KJ, Hiatt A, Zeitlin L. Emerging antibody products and *Nicotiana* manufacturing. *Hum Vaccin.* marzo de 2011;7(3):349-56.
 40. Fedosov SN, Laursen NB, Nexø E, Moestrup SK, Petersen TE, Jensen EØ, et al. Human intrinsic factor expressed in the plant *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem.* agosto de 2003;270(16):3362-7.
 41. Thomas BR. Production of Therapeutic Proteins in Plants. 1 de diciembre de 2002 [citado 24 de noviembre de 2019]; Disponible en: <https://escholarship.org/uc/item/5gp9s5r3>
 42. Day CD, Lee E, Kobayashi J, Holappa LD, Albert H, Ow DW. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes Dev.* 15 de noviembre de 2000;14(22):2869-80.
 43. Gelvin SB. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the Plant Genome. *Annu Rev Genet.* 2017;51(1):195-217.
 44. Kooter null, Matzke null, Meyer null. Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci.* septiembre de 1999;4(9):340-7.
 45. Nugent JM, Joyce SM. Producing human therapeutic proteins in plastids. *Curr Pharm Des.* 2005;11(19):2459-70.
 46. Khan MS, Joyia FA, Mustafa G. Seeds as Economical Production Platform for Recombinant Proteins. *Protein Pept Lett.* 2020;27(2):89-104.
 47. Abrahamian P, Hammond RW, Hammond J. Plant Virus-Derived Vectors: Applications in Agricultural and Medical Biotechnology. *Annu Rev Virol.* 2020;7(1):513-35.
 48. Avesani L, Merlin M, Gecchele E, Capaldi S, Brozzetti A, Falorni A, et al. Comparative analysis of different biofactories for the production of a major diabetes autoantigen. *Transgenic Res.* 1 de abril de 2014;23(2):281-91.
 49. Gleba YY, Tusé D, Giritch A. Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2014;375:155-92.
 50. Klimyuk V, Pogue G, Herz S, Butler J, Haydon H. Production of recombinant antigens and antibodies in *Nicotiana benthamiana* using «magniffection» technology: GMP-compliant facilities for small- and large-scale manufacturing. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2014;375:127-54.
 51. Fischer R, Schillberg S, Hellwig S, Twyman RM, Drossard J. GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. *Biotechnol Adv.* abril de 2012;30(2):434-9.
 52. James E, Lee JM. The Production of Foreign Proteins from Genetically Modified Plant Cells. En: Zhong PDJJ, Byun SY, Cho GH, Choi JW, Haigh JR, Honda H, et al., editores. *Plant Cells* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2001 [citado 13 de septiembre de 2014]. p. 127-56. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology). Disponible en: http://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-45302-4_5
 53. Ponce. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Vol. 1. Cuba: Instituto de Biotecnología de las plantas; 1998. 390 p.
 54. Xu J, Ge X, Dolan MC. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnol Adv.* junio de 2011;29(3):278-99.



55. Xu J, Towler M, Weathers PJ. Platforms for Plant-Based Protein Production. En: Pavlov A, Bley T, editores. Bioprocessing of Plant In Vitro Systems [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [citado 24 de noviembre de 2019]. p. 1-40. (Reference Series in Phytochemistry). Disponible en : https://doi.org/10.1007/978-3-319-32004-5_14-1
56. Shokri Gharelo R, Oliaei E, Bandehagh A, Khodadadi E, Motie Noparvar P. Production of therapeutic proteins through plant tissue and cell culture. J Biosci Biotechnol. 22 de marzo de 2016;5:93-104.
57. Häkkinen ST, Reuter L, Nuorti N, Joensuu JJ, Rischer H, Ritala A. Tobacco BY-2 Media Component Optimization for a Cost-Efficient Recombinant Protein Production. Front Plant Sci. 26 de enero de 2018;9:45-45.
58. Holland T, Sack M, Rademacher T, Schmale K, Altmann F, Stadlmann J, et al. Optimal nitrogen supply as a key to increased and sustained production of a monoclonal full-size antibody in BY-2 suspension culture. Biotechnol Bioeng. 1 de octubre de 2010;107(2):278-89.
59. Santos RB, Abranches R, Fischer R, Sack M, Holland T. Putting the Spotlight Back on Plant Suspension Cultures. Front Plant Sci [Internet]. 11 de marzo de 2016 [citado 24 de noviembre de 2019];7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4786539/>
60. Corbin JM, Hashimoto BI, Karuppanan K, Kyser ZR, Wu L, Roberts BA, et al. Semicontinuous Bioreactor Production of Recombinant Butyrylcholinesterase in Transgenic Rice Cell Suspension Cultures. Front Plant Sci [Internet]. 31 de marzo de 2016 [citado 24 de noviembre de 2019];7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4814504/>
61. Raven N, Rasche S, Kuehn C, Anderlei T, Klöckner W, Schuster F, et al. Scaled-up manufacturing of recombinant antibodies produced by plant cells in a 200-L orbitally-shaken disposable bioreactor. Biotechnol Bioeng. febrero de 2015;112(2):308-21.
62. Huang LF, Tan CC, Yeh JF, Liu HY, Liu YK, Ho SL, et al. Efficient Secretion of Recombinant Proteins from Rice Suspension-Cultured Cells Modulated by the Choice of Signal Peptide. PLOS ONE. 16 de octubre de 2015;10(10):e0140812.
63. Li J, Hegeman CE, Hanlon RW, Lacy GH, Denbow DM, Grabau EA. Secretion of Active Recombinant Phytase from Soybean Cell-Suspension Cultures. Plant Physiol. 1 de julio de 1997;114(3):1103-11.
64. Huang TK, Plesha MA, McDonald KA. Semicontinuous bioreactor production of a recombinant human therapeutic protein using a chemically inducible viral amplicon expression system in transgenic plant cell suspension cultures. Biotechnol Bioeng. 15 de junio de 2010;106(3):408-21.
65. Bortesi L, Rademacher T, Schiermeyer A, Schuster F, Pezzotti M, Schillberg S. Development of an optimized tetracycline-inducible expression system to increase the accumulation of interleukin-10 in tobacco BY-2 suspension cells. BMC Biotechnol. 11 de julio de 2012;12:40.
66. Chilton MD, Tepfer DA, Petit A, David C, Casse-Delbart F, Tempé J. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. Nature. febrero de 1982;295(5848):432-4.
67. Schmülling T, Schell J, Spena A. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. EMBO J. septiembre de 1988;7(9):2621-9.
68. Gaume A, Komarnytsky S, Borisjuk N, Raskin I. Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots. Plant Cell Rep. agosto de 2003;21(12):1188-93.
69. Cardon F, Pallisse R, Bardor M, Caron A, Vanier J, Ele Ekouna JP, et al. Brassica rapa hairy root based expression system leads to the production of highly homogenous and reproducible profiles of recombinant human alpha-L-iduronidase. Plant Biotechnol J. 2019;17(2):505-16.
70. Rodriguez-Hernandez M, Triggiani D, Ivison F, Demurtas OC, Illiano E, Marino C, et al. Expression of a Functional Recombinant Human Glycogen Debranching Enzyme (hGDE) in *N. benthamiana* Plants and in Hairy Root Cultures. Protein Pept Lett. 14 de 2019;
71. Woods RR, Geyer BC, Mor TS. Hairy-root organ cultures for the production of human acetylcholinesterase. BMC Biotechnol. 23 de diciembre de 2008;8:95.

72. Carpenter G, Cohen S. Epidermal Growth Factor. *Annu Rev Biochem.* 1979;48(1):193-216.
73. Fernández-Montequín JI, Infante-Cristiá E, Valenzuela-Silva C, Franco-Pérez N, Savigne-Gutierrez W, Artaza-Sanz H, et al. Intralesional injections of Citoprot-P® (recombinant human epidermal growth factor) in advanced diabetic foot ulcers with risk of amputation. *Int Wound J.* 1 de diciembre de 2007;4(4):333-43.
74. Zheng J, Huang XY, Wei X. [The effects of epidermal growth factor on the wound healing of deep partial thickness burn in rats]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi Zhonghua Shaoshang Zazhi Chin J Burns.* octubre de 2003;19(5):289-92.
75. Liaño F, Teruel JL. Tratamiento de la necrosis tubular aguda. *Rev Clínica Esp.* 1 de marzo de 2001;201(3):145-7.
76. Martínez-carpio PA. El factor de crecimiento epidérmico cuarenta años después de su descubrimiento: de la bioquímica a la clínica. *Endocrinol Nutr.* 2003;50(8):334-44.
77. Schouest JM, Luu TK, Moy RL. Improved texture and appearance of human facial skin after daily topical application of barley produced, synthetic, human-like epidermal growth factor (EGF) serum. *J Drugs Dermatol JDD.* mayo de 2012;11(5):613-20.
78. Gold MH, Goldman MP, Biron J. Efficacy of novel skin cream containing mixture of human growth factors and cytokines for skin rejuvenation. *J Drugs Dermatol JDD.* febrero de 2007;6(2):197-201.
79. Gold MH, Goldman MP, Biron J. Efficacy of novel skin cream containing mixture of human growth factors and cytokines for skin rejuvenation. *J Drugs Dermatol JDD.* febrero de 2007;6(2):197-201.
80. Berlanga-Acosta J, Gavilondo-Cowley J, López-Saura P, González-López T, Castro-Santana MD, López-Mola E, et al. Epidermal growth factor in clinical practice – a review of its biological actions, clinical indications and safety implications. *Int Wound J.* 1 de octubre de 2009;6(5):331-46.
81. Eissazadeh S, Moeini H, Dezfouli MG, Heidary S, Nelofer R, Abdullah MP. Production of recombinant human epidermal growth factor in *Pichia pastoris*. *Braz J Microbiol.* 7 de abril de 2017;48(2):286-93.
82. Faizal A, Razis A, Ismail EN, Hambali Z, Nazrul M, Abdullah H, et al. The Periplasmic Expression of Recombinant Human Epidermal Growth Factor (hEGF) in *Escherichia coli*. 2006 [citado 21 de febrero de 2020]; Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/similar;jsessionid=1F801B3121FE5FC3AA5105FCC7C4C5DE?doi=10.1.1.549.9478&type=ab>
83. Valdés J, Mantilla E, Márquez G, Bonilla RM, Lugo VM, Pérez M, et al. Incremento de la expresión del Factor de Crecimiento Epidérmico en *Saccharomyces cerevisiae* mediante la manipulación de las condiciones de cultivo. *Biotechnol Apl.* marzo de 2009;26(1):34-8.
84. Tong WY, Yao SJ, Zhu ZQ, Yu J. An improved procedure for production of human epidermal growth factor from recombinant *E. coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* diciembre de 2001;57(5-6):674-9.
85. Hanittinan O, Oo Y, Chaotham C, Rattanapisit K, Shanmugaraj B, Phoolcharoen W. Expression optimization, purification and in vitro characterization of human epidermal growth factor produced in *Nicotiana benthamiana*. *Biotechnol Rep Amst Neth.* diciembre de 2020;28:e00524.
86. Morgenfeld MM, Vater CF, Alfano EF, Boccardo NA, Bravo-Almonacid FF. Translocation from the chloroplast stroma into the thylakoid lumen allows expression of recombinant epidermal growth factor in transplastomic tobacco plants. *Transgenic Res.* junio de 2020;29(3):295-305.
87. Wang Y, Fan J, Wei Z, Xing S. Efficient expression of fusion human epidermal growth factor in tobacco chloroplasts. *BMC Biotechnol.* 7 de enero de 2023;23(1):1.
88. He Y, Schmidt MA, Erwin C, Guo J, Sun R, Pendarvis K, et al. Transgenic Soybean Production of Bioactive Human Epidermal Growth Factor (EGF). *PLoS ONE* [Internet]. 17 de junio de 2016 [citado 21 de septiembre de 2019];11(6). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4912142/>
89. Zhi QW, Zhang FY, Chai M, Yu XH, Sun MJ. Success expression of human epidermal growth factor in transgenic tomato. *Chin Pharmacol Bull.* 1 de mayo de 2007;23:692+693-695.
90. Bai JY, Zeng L, Hu YL, Li YF, Lin ZP, Shang SC, et al. Expression and characteristic of synthetic human epidermal growth factor (hEGF) in transgenic tobacco plants. *Biotechnol Lett.* diciembre de



- 2007;29(12):2007-12.
91. Thomas D, Maree A. Improved expression of recombinant plant-made hEGF. *Plant Cell Rep.* 1 de noviembre de 2014;33(11):1801-14.
92. Wu CS, Kuo WT, Chang CY, Kuo JY, Tsai YT, Yu SM, et al. The modified rice α Amy8 promoter confers high-level foreign gene expression in a novel hypoxia-inducible expression system in transgenic rice seedlings. *Plant Mol Biol.* mayo de 2014;85(1-2):147-61.
93. Wirth S, Calamante G, Mentaberry A, Bussmann L, Lattanzi M, Baraño L, et al. Expression of active human epidermal growth factor (hEGF) in tobacco plants by integrative and non-integrative systems. *Mol Breed.* enero de 2004;13(1):23-35.
94. Su Z, Huang Y, Zhou Q, Wu Z, Wu X, Zheng Q, et al. High-level expression and purification of human epidermal growth factor with SUMO fusion in *Escherichia coli*. *Protein Pept Lett.* 2006;13(8):785-92.
95. Ishikawa T, Terai H, Kitajima T. Production of a biologically active epidermal growth factor fusion protein with high collagen affinity. *J Biochem (Tokyo).* abril de 2001;129(4):627-33.
96. Mauro VP. Codon Optimization in the Production of Recombinant Biotherapeutics: Potential Risks and Considerations. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther.* febrero de 2018;32(1):69-81.
97. Lagüa-Becher M, Martín V, Kraemer M, Corigliano M, Yacono ML, Goldman A, et al. Effect of codon optimization and subcellular targeting on *Toxoplasma gondii* antigen SAG1 expression in tobacco leaves to use in subcutaneous and oral immunization in mice. *BMC Biotechnol.* 15 de julio de 2010;10:52.
98. Parsons J, Wirth SA, Dominguez M, Bravo Almonacid FF, Giulietti AM, Rodriguez Talou J. Production of human epidermal growth factor (hEGF) by *in vitro* cultures of *Nicotiana tabacum*: effect of tissue differentiation and sodium nitroprusside addition. diciembre de 2010 [citado 4 de noviembre de 2019]; Disponible en: <http://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/15359>
99. Diamos AG, Mason HS. Chimeric 3' flanking regions strongly enhance gene expression in plants. *Plant Biotechnol J.* 2018;16(12):1971-82.
100. Allen GC, Spiker S, Thompson WF. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Mol Biol.* 1 de junio de 2000;43(2):361-76.
101. Moeller L, Gan Q, Wang K. A bacterial signal peptide is functional in plants and directs proteins to the secretory pathway. *J Exp Bot.* 1 de agosto de 2009;60(12):3337-52.
102. Ma Y, Yu J, Lin J, Wu S, Li S, Wang J. BioMed Research International. 2016 [citado 21 de septiembre de 2019]. High Efficient Expression, Purification, and Functional Characterization of Native Human Epidermal Growth Factor in *Escherichia coli*. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/3758941/>
103. Esipov RS, Stepanenko VN, Chupova LA, Boyarskikh UA, Filipenko ML, Miroshnikov AI. Production of recombinant human epidermal growth factor using Ssp dnaB mini-intein system. *Protein Expr Purif.* 1 de septiembre de 2008;61(1):1-6.
104. Zhang Y, Zhang K, Wan Y, Zi J, Wang Y, Wang J, et al. A pH-induced, intein-mediated expression and purification of recombinant human epidermal growth factor in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.* 2015;31(3):758-64.
105. Shams D, Alizadeh M, Azari S, Hosseini S, Yasami-Khiabani S, Samani S, et al. High expression level of human epidermal growth factor (hEGF) using a well-designed fusion protein-tagged construct in *E. coli*. *Bratisl Lek Listy.* 2019;120(10):757-63