



LOS MUSGOS COMO FÁBRICAS BIOLÓGICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS PARA HUMANOS

Josefat Gregorio-Jorge¹, Analilia Arroyo-Becerra², Miguel Ángel-Villalobos López²

¹ CONACYT - Instituto Politécnico Nacional-Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (IPN-CIBA) - Tlaxcala, México

Correo electrónico: jgregorioj@conacyt.mx

² Instituto Politécnico Nacional - Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (IPN-CIBA) - Tlaxcala, Ex-Hacienda San Juan Molino, Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, México

Correos electrónicos: mvillalobosl@ipn.mx, alarroyo@ipn.mx

Resumen

El desarrollo de la ingeniería genética a principios de los 70's revolucionó la industria biotecnológica al permitir la producción de proteínas terapéuticas en bacterias. Con el tiempo se han empleado otros sistemas de expresión como levaduras, hibridomas, células de insecto y mamífero, animales transgénicos y plantas transgénicas. Esta evolución en los sistemas de expresión se ha reflejado en la cantidad de productos farmacéuticos (650), aprobados y comercializados hasta el 2015, para el tratamiento de diversas enfermedades humanas. Sin embargo, cada sistema de expresión presenta sus ventajas y desventajas en términos de cantidad y calidad del producto, así como en la especificidad, la bioseguridad y el costo. Aunque aún no existen en el mercado productos derivados de las plantas para su aplicación en humanos, varios

productos están siendo evaluados en pruebas clínicas para su posterior aprobación y liberación. Dentro de las plantas, los musgos presentan varias ventajas como sistemas de expresión para la producción de proteínas de interés terapéutico. En particular, *Physcomitrella patens* es un excelente sistema para la producción de glicoproteínas, principalmente porque se han adecuado sus vías de glicosilación asemejándolas a las humanas para producir proteínas de uso humano. Esta característica es de gran relevancia debido a que el 70% de los productos liberados al mercado son glicoproteínas. En conjunto, *P. patens* es un nuevo y excelente sistema para la expresión de proteínas, no solo de interés farmacéutico, sino para otras aplicaciones como la bio-remediación.

Palabras clave: biofarmacéuticos, proteína, plantas, musgos, *Physcomitrella*

Abstract

The development of genetic engineering in the early 70's revolutionized the biotech industry by allowing the production of therapeutic proteins in bacteria. Other expression systems such as yeast, hybridomas, insect and mammalian cells, transgenic animals and transgenic plants have been used over time. This evolution in expression systems has been reflected in the number of pharmaceuticals approved and marketed for the treatment of various human diseases until 2015 (650). However, each expression system presents its advantages and disadvantages in terms of quantity and quality of the product, as well as specificity, biosecurity and cost. Although there are not yet plant-based products available for use in humans,

several products are being evaluated in clinical trials for further approval and release. Among plants, mosses have several advantages as expression systems to produce proteins of therapeutic interest. Particularly, *P. patens* is an excellent system to produce glycoproteins, mainly because the moss glycosylation pathways have been modified mimicking the human ones to produce proteins for human usage. This feature is of great relevance because 70% of the products released to the market are glycoproteins. Together, *P. patens* is a new and excellent system for protein expression, not only of pharmaceutical interest, but for other applications such as bio-remediation.

Keywords: biopharmaceuticals, protein, plants, moss, *Physcomitrella*



Las enfermedades humanas resultan de la función anormal de las proteínas

El cuerpo humano está compuesto por 37 trillones de células y cada una de ellas sigue un programa de crecimiento y desarrollo coordinado en tiempo y espacio (Bianconi et al., 2013). Más importante aún, la coordinación del crecimiento y desarrollo de cada una de ellas está dictada por la información contenida en el genoma (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). El producto final de la información que se encuentra cifrado en la secuencia del genoma son las proteínas, las cuales representan la mano de obra celular y juegan un papel crucial para el buen funcionamiento de las células (Figura 1). Aunque el genoma humano posee solo 21,000 genes que codifican para proteínas, se estima que una célula humana típica contiene alrededor de 100,000 proteínas diferentes (Kim et al., 2014; Savage, 2015). Esto se debe a que las proteínas, una vez producidas, pueden ser “decoradas” con diversas modificaciones denominadas “post-traduccionales” para su correcta función y/o localización dentro de la célula (Jensen, 2004). La vasta mayoría de las proteínas experimentan modificaciones post-traduccionales, tales como fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, nitrosilación, metilación, ribosilación, acetilación, sumoilación, lipidación, y procesamiento proteolítico, así como modificaciones no enzimáticas (Figura 1).

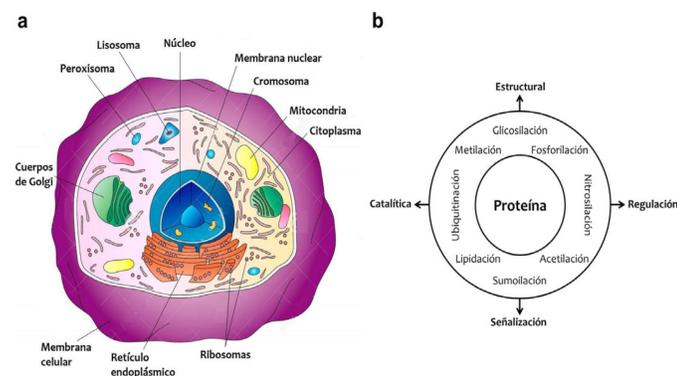


Figura 1. Representación esquemática de una célula y la importancia de las proteínas para su correcto funcionamiento. a) Una célula humana típica se compone de varios compartimentos. Toda la información genética (genoma) se almacena en el núcleo en forma de cromosomas (imagen tomada y modificada de es.dreamstime.com). b) La información del genoma se traduce a proteínas, las cuales pueden ser decoradas con varias modificaciones. Tales modificaciones son importantes para las diversas funciones que las proteínas llevan a cabo dentro de las células como, estructural, regulación, catalítica o de señalización.

La glicosilación, por ejemplo, es importante para una correcta bio-actividad, estabilidad y solubilidad

de la proteína. En resumen, cualquier alteración de las proteínas, ya sea la ausencia, el exceso o una decoración errónea, conduce a una disfunción que a menudo resulta en una enfermedad (Hingorani, 1998).

Proteínas recombinantes: ¿Qué son? ¿Cómo se producen? y ¿Para qué sirven?

Debido a que la terapia génica aún está en desarrollo y no es posible por el momento reemplazar los genes defectuosos que producen proteínas no funcionales, la solución que se ha implementado es el suministro de la “proteína funcional” al paciente de manera exógena y periódica. Tradicionalmente, la solución implicaba extraer la proteína de interés a partir de una especie animal relacionada al humano y posteriormente suministrarle al paciente para contrarrestar la enfermedad en cuestión (Deckert et al., 1974; Scott, 1912).

Afortunadamente, el desarrollo de la ingeniería genética permitió producir proteínas humanas funcionales en microorganismos, al convertirlas en fábricas biológicas mediante la manipulación genética (Berg et al., 2002). El término proteína recombinante significa que la proteína ha sido modificada y, por lo tanto, desempeña una función superior a la proteína humana nativa. Es el caso de la insulina para las personas que padecen diabetes, la cual es producida en bacterias (Vajo et al., 2001). Una de las ventajas de los microorganismos es que requieren de nutrientes simples para crecer y se multiplican en grandes cantidades en un tiempo muy corto. La bacteria *Escherichia coli* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fueron los que dominaron el mercado de la producción de proteínas recombinantes en las primeras décadas de la biotecnología (Demain y Vaishnav, 2009; Ferrer-Miralles y Villaverde, 2013).

Las ventajas de producir una proteína como proteína recombinante son varias; principalmente:

- Obtener grandes cantidades de proteínas humanas o de cualquier origen en organismos fácilmente cultivables.
- Se obtienen productos libres de patógenos y otros riesgos potenciales.
- La ingeniería genética permite modificar al azar o de manera dirigida los genes, creando así variantes de proteínas con nuevas propiedades que no existen en la naturaleza.

La producción de proteínas recombinantes empezó a desarrollarse hace más de 35 años. Durante este tiempo se han utilizado diversos organismos como sistemas de expresión para producir proteínas recombinantes tales como, bacterias, levaduras, hibridomas, células de insecto y mamífero, animales transgénicos y plantas transgénicas (Tabla I). A pesar de la diversidad de los sistemas de expresión, las bacterias, las levaduras, los hibridomas y las células de mamífero, han dominado el mercado al producir el 98% de las proteínas recombinantes (Figura 2) (Ferrer-Mirallés et al., 2009). Hasta el 2015, 650 productos farmacéuticos habían sido aprobados y comercializados en todo el mundo para el tratamiento de diversas enfermedades humanas, y otras 1300 proteínas se encuentran en desarrollo (Sánchez-García et al., 2016). Entre las enfermedades más importantes que se han atacado mediante proteínas recombinantes se encuentran los desórdenes metabólicos, los desórdenes hematológicos y el cáncer (Figura 2). Solo en el 2014, las proteínas recombinantes representaron ganancias por 52.75 billones de dólares (Sánchez-García et al., 2016).

Producción de proteínas recombinantes en plantas

Mientras que los sistemas de expresión microbianos son de fácil manejo y tienen altos rendimientos, las proteínas recombinantes producidas en estos sistemas no sufren las modificaciones correctas para una función apropiada. Por lo tanto, las células de mamífero son las predilectas cuando se trata de producir proteínas recombinantes que dependen de las modificaciones post-traduccionales para su correcta función (Tabla I).

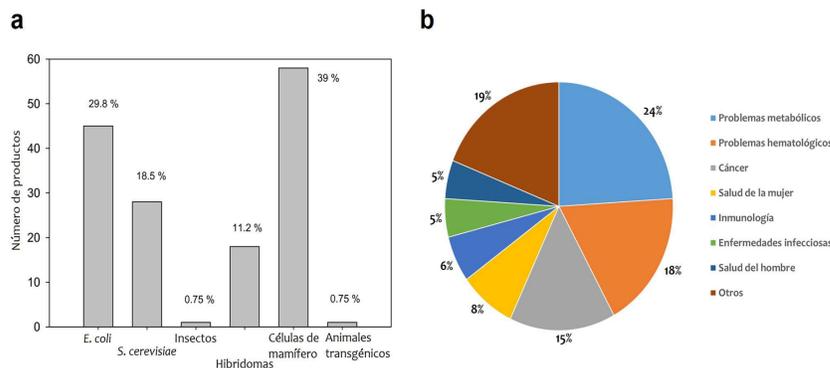


Figura 2. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes y áreas en las que se aplican. a) Los sistemas de expresión predominantemente usados para la expresión de proteínas terapéuticas son: la bacteria *Escherichia coli*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, los hibridomas y las células de mamífero. b) Áreas en las que se aplican las proteínas recombinantes. Los problemas metabólicos, los problemas hematológicos y el cáncer, son las áreas donde más se aplican. Figuras modificadas de Ferrer-Mirallés et al., 2009 y Sánchez-García et al., 2016.

Las plantas por su parte, combinan las ventajas de ambos sistemas; es decir, de microorganismos y células de mamífero. Las plantas sintetizan proteínas complejas, ya que poseen la misma maquinaria que los seres humanos para el correcto plegamiento y modificación de las proteínas (Zhao, 2007). Otro punto importante es que las plantas no representan un riesgo de contaminación por agentes infecciosos, ya que las enfermedades de plantas no afectan a los seres humanos. Finalmente, el cultivo de plantas permite la producción a gran escala de proteínas farmacéuticas con un bajo costo de producción. A pesar de las ventajas descritas, las variaciones e inconsistencias en el crecimiento dependiendo del suelo y las condiciones climáticas son las principales desventajas que limitan el auge de las plantas como sistemas alternativos de expresión de proteínas recombinantes (Moshelion y Altman, 2015; Thomas et al., 2011).

Tabla I. Comparación de los sistemas de expresión de proteínas recombinantes.

Sistema	Costo	Tiempo de producción	Capacidad de producción a gran escala	Manipulación genética	Modificación post-traduccionales: glicosilación	Calidad del producto	Riesgo de contaminación
Bacterias	Bajo	Corto	Alta	Muy alta	Ausente	Intermedia	Endotoxinas
Levaduras	Medio	Medio	Alta	Alta	Incorrecta	Intermedia	Muy bajo
Células de mamífero	Alto	Largo	Muy baja	Baja	Correcta	Muy buena	Virus y priones
Animales	Alto	Muy largo	Baja	Muy baja	Correcta	Muy buena	Virus y priones
Plantas superiores	Muy bajo	Largo	Muy alta	Muy baja	Correcta*	Buena	Muy bajo
Plantas inferiores (musgos)	Muy bajo	Medio	Muy alta	Alta	Correcta*	Muy buena	Muy bajo

*Glicosilación correcta después de una manipulación genética del sistema.

Sin embargo, estas limitantes podrían eliminarse con el crecimiento controlado en invernaderos, o con el cultivo de células o tejidos vegetales en el laboratorio.

Actualmente, la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*) es el modelo más usado para la producción de proteínas recombinantes (Tabla 2). La preferencia por la planta de tabaco como sistema de expresión se debe a que es posible insertar genes foráneos usando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Además, la producción a gran escala de plantas de tabaco puede generar 170 toneladas métricas de biomasa por hectárea. Asumiendo que los niveles de producción en laboratorio sean constantes, por cada 170 toneladas de material vegetal, 100 toneladas corresponderán a hojas. Por lo tanto, una hectárea puede producir hasta 50 Kg de inmunoglobulina IgA o 100 Kg de Glucocerebrosidasa recombinante (Cramer et al., 1996).

A pesar de que no se han liberado al mercado proteínas recombinantes producidas en plantas para su uso en seres humanos, existen actualmente muchos productos que están en desarrollo o en fase de pruebas clínicas para su posterior aprobación y liberación al mercado (Tabla 2) (Ghag et al., 2016). Es importante resaltar que, en el área de plantas, las que dominan hasta ahora son las plantas denominadas como superiores (Tabla 2). Aunque se han adoptado una serie de estrategias para producir proteínas recombinantes en altas cantidades en los sistemas vegetales, una de las principales limitaciones es la difícil tarea de modificar a las plantas superiores para que

produzcan proteínas recombinantes con las apropiadas modificaciones post-traduccionales. Esto se debe a que la eliminación o el reemplazo de genes de manera dirigida aun no es posible en plantas superiores, pero ya están emergiendo nuevas tecnologías moleculares que eliminarán esta limitante en un futuro cercano (Voytas, 2013). Por ahora, la inserción del gen que está destinado a producir la proteína recombinante (transgén) no es dirigida y, por lo tanto, el sitio de inserción dentro del genoma de la planta causa una variación en los niveles de producción de la proteína de interés. Finalmente, la generación de plantas transgénicas para producir una proteína recombinante toma de meses a años.

Los musgos como una plataforma emergente en la producción de proteínas recombinantes

Uno de los sistemas vegetales que está emergiendo como una excelente plataforma para la producción de proteínas recombinantes es *P. patens*, un musgo que se clasifica dentro de las plantas inferiores (Rensing et al., 2008). *P. patens* presenta varias ventajas como sistema de expresión, tales como, ciclo de vida corto, nutrientes simples para crecer, inserción dirigida del transgén, glicosilación de proteínas igual que las proteínas humanas, condiciones establecidas en reactor para volúmenes mayores a 100 litros, y lo más importante, secreta la proteína recombinante al medio, lo que facilita mucho su purificación (Decker et al., 2014; Decker y Reski, 2008; Decker y Reski, 2012; Hohe et al., 2004; Reski et al., 2015; Reski, 1998).



Tabla 2. Proteínas recombinantes producidas en sistemas vegetales que se encuentran en fase de prueba.

Proteína	Enfermedades	Sistema vegetal	Estatus	Compañía	Referencias*
ZMapp	Ebola	Tabaco	Comercializado como fármaco intravenoso	Mapp Biopharmaceutical, Inc.	PREVAIL II Writing Group, Multi-National PREVAIL II Study Team 2016
Anticuerpo CaroRx (IgG-IgA)	Caries dental	Tabaco	Comercializado como fármaco de uso tópico	Planet Biotechnology, Inc.	Ma et al., 1998
Cocktail de anticuerpos MAPP66	Herpes y SIDA	Tabaco	Ensayos clínicos de fase I	Mapp Biopharmaceutical, Inc.	Ghag et al., 2016
Anticuerpo 2G12	SIDA	Tabaco	Ensayos clínicos de fase I	Pharma-Planta	Ma et al., 2015
Hemaglutinina y Neuraminidasa aviar	Enfermedad de Newcastle aviar	Tabaco	Ensayos clínicos	Dow AgroSciences	Yusibov et al., 2011
Hemaglutinina (HA)	Influenza viral cepa H5N1 y H1N1	Tabaco	Ensayos clínicos de fase II para HA de H5N1 y de fase I para HA de H1N1	Medicago Inc.	Landry et al., 2010 Landry et al., 2014
HAI-05	Influenza viral H5N1	Tabaco	Ensayos clínicos de fase I	Fraunhofer USA, Center for Molecular Biotechnology	Chichester et al., 2012
HAC1	Influenza viral H1N1	Tabaco	Ensayos clínicos de fase I	Fraunhofer USA Center for Molecular Biotechnology; Walter Reed Army Institute of Research	Shoji et al., 2015; Cummings et al., 2014
Antígeno protector recombinante (rPA)	Ántrax	Tabaco	Ensayos clínicos de fase I	Fraunhofer USA Center for Molecular Biotechnology	Mamedov et al., 2016
Pfs25-VLP	Malaria	Tabaco	Ensayos clínicos de fase I	Fraunhofer USA Center for Molecular Biotechnology	Jones et al., 2013
Subunidad B de la enterotoxina sensible al calor	Diarrea por <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	Papa y maíz	Ensayos clínicos de fase I	University of Maryland School of Medicine	Tacket et al., 1998 Tacket et al., 2004
Proteína mayor de la cápside (NoroVAXX)	Enfermedad de Norwalk (gastroenteritis por el virus Norwalk)	Papa	Ensayos clínicos de fase I	VAXX Inc.	Tacket et al., 2004 Fischer et al., 2012
HBsAg	Hepatitis B	Papa y lechuga	Ensayos clínicos de fase I	Department of Immunology, Roswell Park Cancer Institute	Thanavala et al., 2005
Glicoproteína (GP) y Nucleoproteína (NP)	Rabia	Espinaca	Ensayos pre-clínicos con humanos	Biotechnology Foundation Laboratories at Thomas Jefferson University	Yusibov et al., 2002
Interferón α (IFNα) canino	Enfermedad periodontal canina	Fresas	Comercializado como fármaco oral	AIST	Tabayashi. y Matsumura, 2014
Taliglucerasa α (ELELYSO)	Enfermedad de Gaucher tipo 1	Zanahoria	Comercializado como fármaco intravenoso	Protalix Biotherapeutics y Pfizer	Shaaltiel et al., 2007
Anticuerpo BLX-301	Linfoma de células B no Hodgkin y Artritis reumatoide	Lenteja de agua	Ensayos clínicos de fase I	Biolex Inc.	Cox et al., 2006

Las referencias citadas se encuentran en Ghag et al., 2016.

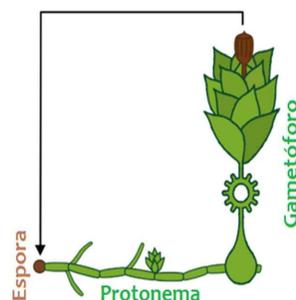
Una de las principales preocupaciones al usar plantas transgénicas superiores es la dispersión del transgén al ecosistema por medio del polen. Aunque *P. patens* produce esporas, la posibilidad de que estas se dispersen se elimina al cultivarlo en instalaciones contenidas (reactores), lo que al mismo tiempo permite controlar las condiciones para optimizar la producción de la proteína recombinante (Decker y Reski, 2007).

Aunque hasta el momento solo se han producido pocas proteínas recombinantes en *P. patens*, las proteínas que se han producido en las plantas superiores (Tabla 2) podrían producirse fácilmente en *Physcomitrella*. Dentro de las proteínas recombinantes que se han producido en *Physcomitrella* se encuentra el factor de crecimiento endotelial (VEGF), la Eritropoyetina (EPO), los epítopes de las glicoproteínas gp120 y gp41 del HIV, la inmunoglobulina IgG, así como el primer producto comercializado para su uso en investigación, el factor de crecimiento queratinocítico (KGF) (Baur et al., 2005; Kircheis et al., 2012; Niederkrüger et al., 2014; Orellana-Escobedo et al., 2015; Parsons et al., 2012).

Es importante resaltar que además de las proteínas recombinantes descritas anteriormente, tres proteínas recombinantes producidas en *Physcomitrella* se encuentran en fase pre-clínica o la fase I de pruebas clínicas. Se trata del Factor H, la Glucocerebrosidasa y la Alfa-Galactosidasa (Figura 3). El Factor H es una proteína recombinante que se planea usar para el tratamiento del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), una enfermedad genética que afecta a órganos vitales como el riñón, el corazón y el cerebro (Siegler y Oakes, 2005). El Factor H producido en *Physcomitrella* compensará la ausencia de función de esta proteína en las personas que padezcan esta enfermedad y ayudará a mejorar la calidad de vida de los pacientes (Büettner-Mainik et al., 2011). Por otro lado, la Glucocerebrosidasa tiene el propósito de curar la enfermedad de Gaucher, una afección genética que es causada por la acumulación de sustancias grasosas en el bazo, hígado, pulmones, huesos y, a veces, en el cerebro, debido a la falta de la enzima Glucocerebrosidasa (Grabowski, 2008). A diferencia del Factor H, para una función apropiada de la Glucocerebrosidasa es necesaria la glicosilación de la proteína; es decir, una modificación post-traduccional

donde se agregan azúcares a la proteína. La versión modificada de *P. patens* para el proceso de glicosilación ha permitido la producción de la Glucocerebrosidasa funcionalmente activa y se encuentra en fase de prueba pre-clínica (Niederkrüger et al., 2014). Finalmente, la Alfa-Galactosidasa, al igual que la Glucocerebrosidasa, necesita de la glicosilación apropiada para su correcta función. *P. patens* glicosila apropiadamente a la Alfa-Galactosidasa y de hecho ya se encuentra en la fase I de prueba clínica (Meng et al., 2016; Shen et al., 2015). Esta proteína recombinante está destinada a curar la enfermedad de Fabry. La enfermedad de Fabry es causada por la función disminuida o ausente de la Alfa-Galactosidasa, lo que provoca la acumulación de una sustancia llamada ceramida trihexosido (Desnick et al., 2003). La acumulación de esta sustancia se da principalmente en las células del músculo liso y causa un dolor insoportable. Por lo tanto, el suministro de la Alfa-Galactosidasa producida en *Physcomitrella* contribuirá a disminuir los niveles de la ceramida trihexosido en las personas que padecen esta enfermedad.

a



b

Proteínas recombinantes producidas en *P. patens* que se comercializan o están en fase de prueba.

Proteína	Enfermedad	Estatus	Compañía
Factor de crecimiento queratinocítico	Elfisema	Comercializado	Greenovation*
Factor H	Síndrome Urémico Hemolítico	Pre-clínica	
Glucocerebrosidasa	Enfermedad de Gaucher	Pre-clínica	
Alfa-Galactosidasa	Enfermedad de Fabry	Clínica (Fase I)	

*Compañía Alemana: <http://www.greenovation.com/>

Figura 3. *P. patens* como sistema de expresión de proteínas recombinantes.

a) *P. patens* tiene un ciclo de vida corto que inicia con la germinación de una espora. De la germinación de la espora se forma un tejido llamado protonema que está compuesto de un filamento de células que se ramifica. Finalmente, se forma el gametóforo, del cual se forman esporas y empieza de nuevo el ciclo (Figura modificada de <http://2013.igem.org/Team:TU-Munich/Project/Physcomitrella>). b) Varias proteínas recombinantes se han producido en *P. patens*. Algunas están en fase de pruebas clínicas, mientras que otras ya se comercializan.

A pesar de que *P. patens* apareció en escena hace muy poco tiempo como una alternativa para la expresión de proteínas recombinantes, todo parece indicar que, de seguir la tendencia actual, las proteínas recombinantes provenientes de este musgo serán los primeros productos derivados de plantas que serán aprobados para su uso en seres humanos.

Futuras aplicaciones de *P. patens* como sistema de expresión

Por todas las ventajas que posee *P. patens*, se anticipa que en el futuro se utilice como la plataforma predilecta para la producción de vacunas (Rybicki, 2014). En particular, vacunas específicas contra los diversos tipos de virus de la Influenza serían de gran importancia para contener epidemias como la ocasionada en México por la H1N1 en el 2009 (Fineberg, 2014). Además, se anticipa que, en los siguientes años, *P. patens* sea utilizado para procesos de bio-remediación, ya que recientemente se estableció un sistema adecuado para la expresión de proteínas destinadas a degradar contaminantes (Morath et al., 2014).

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Candy Yuriria Ramírez Zavaleta por su apoyo en la elaboración de las figuras, tablas y revisión del artículo, así como a Cátedras CONACYT I452, Instituto Politécnico Nacional y SIP IPN.

Bibliografía

1. Baur A, Reski R, Gorr G. 2005. Enhanced recovery of a secreted recombinant human growth factor using stabilizing additives and by co-expression of human serum albumin in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biotechnol. J.* 3(3):331-340.

2. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 2002. 5th edition. New York: W H Freeman; Section 6.2, Recombinant DNA Technology Has Revolutionized All Aspects of Biology. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22480/>

3. Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, Beraudi A, Casadei R, Frabetti F, Vitale L, Pelleri MC, Tassani S, Piva F, Perez-Amodio S, Strippoli P, Canaider S. 2013. An estimation of the number of cells in the human body. *Journal Annals of Human Biology.* 40(6):463-471.

4. Büttner-Mainik A, Parsons J, Jérôme H, Hartmann A, Lamer S, Schaaf A, Schlosser A, Zipfel PF, Reski R, Decker EL. 2011. Production of biologically active recombinant human factor H in *Physcomitrella*. *Plant Biotechnol. J.* 9(3):373-383.

5. Cramer CL, Weissenborn DL, Oishi KK, Grabau EA, Bennett S, Ponce E, Grabowski GA, Radin DN. 1996. Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. *Ann N Y Acad Sci.* 25 (792): 62-71.

6. Decker EL, Reski R. 2007. Moss bioreactors producing improved biopharmaceuticals. *Current Opinion in Biotechnology.* 18(5):393-398.

7. Decker EL, Reski R. 2008. Current achievements in the production of complex biopharmaceuticals with moss bioreactors. *Bioprocess Biosystems Engineering.* 31(1):3-9.

8. Decker EL, Reski R. 2012. Glycoprotein production in moss bioreactors. *Plant Cell Rep.* 31(3):453-460.

9. Decker EL, Parsons J, Reski R. 2014. Glyco-Engineering for biopharmaceutical production in moss bioreactors. *Front. Plant Sci.* 5:346.

10. Deckert T, Andersen OO, Poulsen JE. 1974. The clinical significance of highly purified pig-insulin preparations. *Diabetologia.* 10(6):703-708.

11. Demain AL, Vaishnav P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv.* 27(3):297-306.

12. Desnick RJ, Brady R, Barranger J, Collins AJ, Germain DP, Goldman M, Grabowski G, Packman S, Wilcox WR. 2003. Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. *Ann Intern Med.* 138(4):338-46.

13. Durocher Y, Butler M. 2009. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20(6):700-707.

14. Ferrer-Miralles N, Domingo-Espin J, Corchero JL, Vazquez E, Villaverde A. 2009. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb Cell Fact.* 8:17.

15. Ferrer-Miralles N, Villaverde A. 2013. Bacterial cell factories for recombinant protein production; expanding the catalogue. *Microb Cell Fact.* 12:113.

16. Fineberg HV. 2014. Pandemic preparedness and response—lessons from the H1N1 influenza of 2009. *N Engl J Med.* 370(14):1335-1342.

17. Ghag SB, Adki VS, Ganapathi TR, Bapat VA. 2016. Heterologous protein production in plant systems. *GM Crops Food.* Oct 27:0. doi.org/10.1080/21645698.2016.1244599

18. Grabowski GA. 2008. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet.* 372(9645):1263-71.

19. Hingorani AD. 1998. Protein dysfunction: cause and effect in human disease. *Molecular Medicine Today.* 4(12):517-517.

20. Hohe A, Egener T, Lucht JM, Holtorf H, Reinhard C, Schween G, Reski R. 2004. An improved and highly standardised transformation procedure allows efficient production of single and multiple targeted gene-knockouts in a moss *Physcomitrella patens*. *Curr. Genet.* 44(6):339-347.

21. International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 431:931-45.

22. Jensen ON. 2004. Modification-specific proteomics: Characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol.* 8(1):33-41.

23. Kim MS, Pinto SM, Getnet D, Nirujogi RS, Manda SS, Chaerkady R, Madugundu AK, Kellkar DS, Isserlin R, Jain S, Thomas JK, Muthusamy B, Leal-Rojas P, Kumar P, Sahasrabudhe NA, Balakrishnan L, Advani J, George B, Renuse S, Selvan LDN, Patil AH, Nanjappa V, Radhakrishnan A, Prasad S, Subbannayya T, Raju R, Kumar M, Sreenivasamurthy SK, Marimuthu A, Sathé GJ, Chavan S, Datta KK, Subbannayya Y, Sahu A, Yelamanchi SD, Jayaram S, Rajagopalan P, Sharma J, Murthy KR, Syed N, Goel R, Khan AA, Ahmad S, Dey G, Mudgal K, Chatterjee A, Huang TC, Zhong J, Wu X, Shaw PG, Freed D, Zahari MS, Mukherjee KK, Shankar S, Mahadevan A, Lam H, Mitchell CJ, Shankar SK, Satishchandra P, Schroeder JT, Sirdeshmukh R, Maitra A, Leach SD, Drake CG, Halushka MK, Prasad TSK, Hruban RH, Kerr CL, Bader GD, Iacobuzio-Donahue CA, Gowda H, Pandey A. 2014. A draft map of the human proteome. *Nature.* 509:575-581.

24. Kirchseis R, Halanek N, Koller I, Jost W, Schuster M, Gorr G, Hajszan K, Nechansky A. 2012. Correlation of ADCC activity with cytokine release induced by the stably expressed, glyco-engineered humanized Lewis Y-specific monoclonal antibody MB314. *MAbs* 4(4):532-541.

25. Meng XL, Day TS, McNeill N, Ashcraft P, Frischmuth T, Cheng SH, Liu ZP, Shen JS, Schiffmann R. 2016. Molecular basis for globotriaosylceramide regulation and enzyme uptake in immortalized aortic endothelial cells from Fabry mice. *J Inherit Metab Dis.* 39(3):447-455.

26. Morath V, Truong DJJ, Albrecht F, Polte I, Ciccone RA, Funke LF, Reichart L, Wolf CG, Brunner AD, Fischer K, Schneider PC, Brüggenthies JB, Fröhlich F, Wiedemann G, Reski R, Skerra A. 2014. Design and characterization of a modular membrane protein anchor to functionalize the moss *Physcomitrella patens* with extracellular catalytic and/or binding activities. *ACS Synthetic Biology* 3(12):990-994.

27. Moshelion M, Altman A. 2015. Current challenges and future perspectives of plant and agricultural biotechnology. *Trends Biotechnol.* 33(6):337-342.

28. Niederkrüger H, Dabrowska-Schlepp P, Schaaf A. 2014. Suspension culture of plant cells under phototrophic conditions. In *Industrial Scale Suspension Culture of Living Cells*. Meyer HP, Schmidhalter DR. (eds), pp. 259-292.

29. Orellana-Escobedo L, Rosales-Mendoza S, Romero-Maldonado A, Parsons J, Decker EL, Monreal-Escalante E, Moreno-Fierros L, Reski R. 2015. An Env-derived multi-epitope HIV chimeric protein produced in the moss *Physcomitrella patens* is immunogenic in mice. *Plant Cell Rep.* 34(3):425-433.

30. Parsons J, Altmann F, Arrenberg CK, Koprivova A, Beike AK, Stemmer C, Gorr G, Reski R, Decker EL. 2012. Moss-based production of asialo-erythropoietin devoid of Lewis A and other plant-typical carbohydrate determinants. *Plant Biotechnol J.* 10(7):851-861.

31. Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud PF, Lindquist EA, Kamisugi Y et al. 2008. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science.* 319(5859): 64-69.

32. Reski R. 1998. Development, Genetics and Molecular Biology of Mosses. *Bot. Acta.* 111(1):1-15.

33. Reski R, Parsons J, Decker EL. 2015. Moss-made biopharmaceuticals: From bench to bedside. *Plant Biotechnol. J.* 13(8):1191-1198.

34. Rybicki EP. 2014. Plant-based vaccines against viruses. *Virol. J.* 11:205.

35. Sanchez-Garcia L, Martín L, Mangues R, Ferrer-Miralles N, Vázquez E, Villaverde A. 2016. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microb Cell Fact* 15:33 doi 10.1186/s12934-016-0437-3

36. Savage N. 2015. High-protein research. *Nature.* 527: S6-S7.

37. Scott EL. 1912. On the influence of intravenous injections of an extract of the pancreas on experimental pancreatic diabetes. *Am J Physiol.* 29:306-310.

38. Shen JS, Busch A, Day TS, Meng XL, Yu CI, Dabrowska-Schlepp P, Schaaf A. 2015. Mannose receptor-mediated delivery of moss-made β -galactosidase A efficiently corrects enzyme deficiency in Fabry mice. *J Inherit Metab Dis.* 39(2):293-303.

39. Siegler R, Oakes R. 2005. Hemolytic uremic syndrome; pathogenesis, treatment, and outcome. *Curr Opin Pediatr.* 17(2):200-204.

40. Thomas DR, Penney CA, Majumder A, Walmsley AM. 2011. Evolution of Plant-Made Pharmaceuticals. *Int J Mol Sci.* 12(5):3220-3236.

41. Vajo Z, Fawcett J, Duckworth WC. 2001. Recombinant DNA technology in the treatment of diabetes: insulin analogs. *Endocr Rev.* 22(5):706-717.

42. Voytas DF. 2013. Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annu Rev Plant Biol.* 64: 327-350.

43. Zhao J. 2007. Nutraceuticals, Nutritional Therapy, Phytonutrients, and Phytotherapy for Improvement of Human Health: A Perspective on Plant Biotechnology Application. *Rec Pat Biotechnol.* 1(1):175-97.