

## ПОТЕНЦИАЛ НЕКЛАССИЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

М. А. Добронос<sup>1,2</sup>, З. М. Осипова<sup>1,3</sup> ✉, Н. М. Мышкина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

<sup>3</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Производство биотерапевтических препаратов, в частности, рекомбинантных белков в клетках млекопитающих может быть затруднено из-за ограничений используемых культур в связи с метаболической нагрузкой. Альтернативным подходом для решения таких задач является наработка белков в клетках других животных (например, культуры клеток насекомых Sf9, S2 и High Five, культуры клеток червей видов *Caenorhabditis elegans* и *Schistosoma mansoni*) или ортогональных клеточных системах, в том числе растительных. С нашей точки зрения, применение неклассических клеточных культур может стать перспективным направлением для получения более доступных и эффективных биотерапевтических препаратов.

**Ключевые слова:** биотерапевтические препараты, растительные клеточные культуры, метаболическая нагрузка, клеточная линия High Five, клеточная линия Sf9

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 21-74-10152, <https://rscf.ru/project/21-74-10152/>.

**Благодарности:** авторы благодарят А. Д. Барыкина из отдела биоорганической химии ИБХ РАН за плодотворное обсуждение идеи публикации.

**Вклад авторов:** М. А. Добронос — поиск и анализ литературы, написание рукописи; З. М. Осипова — руководство проектом, редактирование рукописи; Н. М. Маркина — идея рукописи, поиск и анализ литературы, написание рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Зинаида Михайловна Осипова  
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997; [zkaskova@ibch.ru](mailto:zkaskova@ibch.ru)

**Статья получена:** 20.04.2024 **Статья принята к печати:** 12.05.2024 **Опубликована онлайн:** 13.06.2024

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2024.022

## POTENTIAL OF NON-TRADITIONAL CELL CULTURES FOR PRODUCTION OF BIOTHERAPEUTIC PROTEINS

Dobronos MA<sup>1,2</sup>, Osipova ZM<sup>1,3</sup> ✉, Myshkina NM<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (MIPT), Dolgoprudny, Russia

<sup>3</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Production of biotherapeutic drugs in mammalian cells, recombinant proteins in particular, may be handicapped by the limitations imposed on the cultures by metabolic burden. An alternative solution is to produce proteins in cells of other animals (e.g., Sf9, S2 and High Five insect cell lines, *Caenorhabditis elegans* and *Schistosoma mansoni* cell line) or orthogonal cell systems, including plant-based. In our opinion, non-traditional cell cultures may become promising tool for production of affordable and effective biotherapeutic drugs.

**Keywords:** biotherapeutic drugs, plant cell cultures, metabolic burden, High Five cell line, Sf9 cell line

**Funding:** the work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 21-74-10152, <https://rscf.ru/project/21-74-10152/>

**Acknowledgements:** the authors thank A.D. Barykin from the Department of Bioorganic Chemistry of the Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences for the fruitful discussion of the idea of this publication.

**Author contribution:** Dobronos MA — literature search and analysis, manuscript authoring; Osipova ZM — project management, manuscript editing; Markina NM — manuscript idea, literature search and analysis, manuscript authoring.

✉ **Correspondence should be addressed:** Zinaida Mikhailovna Osipova  
Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997; [zkaskova@ibch.ru](mailto:zkaskova@ibch.ru)

**Received:** 20.04.2024 **Accepted:** 12.05.2024 **Published online:** 13.06.2024

**DOI:** 10.24075/brsmu.2024.022

Повышение эффективности производства биотерапевтических препаратов — одна из ключевых задач современной фармацевтики. В зависимости от желаемого состава препарата лимитирующей стадией может быть поиск природного источника или разработка его искусственного аналога, увеличение эффективности производства источником или решение задачи по оптимизации очистки от примесей и неэффективных форм [1, 2]. Наш коллектив авторов хочет осветить потенциал использования неклассических клеточных культур для решения вышеперечисленных проблем.

Самое широкое применение клеточные культуры нашли в производстве биотерапевтических белковых препаратов, среди которых наиболее значимы моноклональные

антитела. Флагманом считают культуру клеток яичника китайского хомячка (chinese hamster ovary, CHO), которая сочетает в себе простоту культивации и быстрый рост, гарантирует корректную трансляцию, сворачивание и посттрансляционную модификацию рекомбинантного белка, а также способна к выделению в культуральную среду больших количеств продукта, что позволяет достичь наибольших выходов целевого препарата среди всех клеточных культур млекопитающих [3]. Недостатки всех культур клеток млекопитающих, включая CHO, — высокая стоимость и необходимость особых условий работы и оборудования, а также подверженность метаболической нагрузке (metabolic burden). Внешние проявления метаболической нагрузки выражены в том, что, начиная

с определенных значений выхода рекомбинантного белка перестают работать стандартные технологии по его увеличению, такие как повышение числа копий рекомбинантного гена, использование более сильных регуляторных последовательностей и т. д. [4]. Причина заключается в том, что на данном этапе рекомбинантные процессы начинают конкурировать за ресурсы клеточной машинерии со внутренними процессами клетки-хозяина, необходимыми для поддержания ее жизнеспособности: всего насчитывается порядка 8–10 точек напряженности, включающих в себя процессы транскрипции, трансляции, посттрансляционных модификаций и экспорта белков [5]. Для преодоления негативных последствий метаболической нагрузки используют различные механизмы балансировки метаболизма, однако этот процесс очень трудоемкий, поскольку необходимо определить все лимитирующие стадии [6] и подобрать такой метод их преодоления, который не скажется на общей жизнеспособности клетки-продуцента [7, 8]. Однако даже успешная балансировка метаболизма может не привести к значительному повышению выхода рекомбинантного белка, поскольку производство некоторых биотерапевтических белков может быть настолько трудозатратным для клетки млекопитающего, что все попытки его оптимизации будут упираться в физиологические пределы клетки-хозяина. Так, например, рекомбинантное производство фактора свертывания крови VIII (F8) в культуре CHO может быть оценено в «энергетическую стоимость» около 10 000 молекул АТФ в расчете на одну функциональную молекулу F8 [5].

Альтернативным подходом может стать применение для наработки белковых препаратов такого организма-продуцента, физиологические ресурсы которого исходно выше, чем у клеток млекопитающих: клетки других видов животных или ортогональные клеточные системы, например культура клеток растений (см. таблицу). Одно из основных преимуществ биотерапевтических соединений растительного происхождения заключается в их высокой безопасности. Это обусловлено невозможностью заражения человеческими патогенами, отсутствием продукции эндотоксинов и сниженной иммуногенностью, в результате чего улучшается переносимость препаратов, а побочные эффекты минимизируются. Например, талиглукераза альфа ( $\beta$ -D-глюкозил-N-ацилсфингозинглюкогидролаза), вырабатываемая в клетках трансгенной моркови для лечения болезни Гоше 1-го типа, в ходе клинических испытаний не продемонстрировала явных побочных эффектов, связанных с N-гликановыми остатками. Также не было обнаружено антител к данному препарату [9]. Кроме того, культуры растительных клеток подходят для пероральной доставки биологических препаратов без очистки или с минимальной очисткой. Стенки растительных клеток могут защищать биопрепараты от ферментативной дегградации в желудочно-кишечном тракте, а также способствовать доставке этих препаратов в лимфоидную ткань кишечника в активной форме. Производство пероральных биофармацевтических препаратов из съедобных растительных тканей показало свою эффективность и в клинических испытаниях вакцин [10].

Другим важным аспектом применения культур растительных клеток является достижение высокого уровня экспрессии мультибелковых комплексов, требующих сложных процессов сворачивания и сборки. Для увеличения выхода таких белков могут быть

использованы стратегии конструирования одного вектора с набором рекомбинантных генов и совместный биосинтез рекомбинантных белков вместе с шаперонами того же происхождения [11]. Кроме того, введение экзогенной сигнальной последовательности, направляющей белок по определенному секреторному пути, может способствовать увеличению выхода малых белков массой менее 30 кДа. Оптимизация процесса ферментации, включая непрерывную или полунепрерывную ферментацию, рассматривается нами как универсальный метод для повышения выхода белка при использовании как культур растительных клеток, так и культур клеток насекомых.

Для производства биотерапевтических белков в системах бакуловирусной экспрессии также широко применяют клеточные линии насекомых *Spodoptera frugiperda* Sf21, Sf9 и *Trichoplusia ni* ВТ1 5B1-4 (High Five) — адгезивные неперемиссивные культуры, полученные из тканей яичников соответствующих насекомых [12]. Имея схожие механизмы посттрансляционной модификации белков, культуры клеток насекомых представляют собой удобный, экономически выгодный и масштабируемый инструмент для производства вакцинных антигенов и вирусоподобных частиц [13]. Кроме того, сконструированные бакуловирусы с промоторами млекопитающих обладают значительным потенциалом в качестве векторов для доставки генов в клетки млекопитающих [14]. Паттерн гликозилирования в этих экспрессионных системах немного отличается от человеческого, однако задачи гуманизированного гликозилирования можно успешно решить с помощью параллельной экспрессии гликотрансфераз млекопитающих, а также удаления специфических для насекомых альфа-1,3-фукозилированных гликанов, которые могут быть аллергенными для человека. В культурах клеток насекомых производят белки-антигены, потенциально являющиеся вакцинными кандидатами против COVID-19 [15–17] и малярии [18].

Использование технологии CRISPR может значительно ускорить получение стабильных экспрессионных гликоинженерных линий насекомых. Ранее было показано, что CRISPR можно применять для нокаута генов в клеточных линиях *Drosophila* и *Bombyx*, а также для нокаута гена N-ацетилглюкозаминидазы на клеточной линии S2, что приводит к кратному увеличению количества концевых остатков GlcNAc в рекомбинантном эритропоэине человека [19]. Перспективным направлением представляется также модификация линий Sf9 и High Five, например, множественная дупликация генов гликотрансферазы млекопитающих может обеспечить еще более высокий уровень экспрессии белков с корректным гликозилированием и фолдингом.

Альтернативным решением для ряда биомедицинских применений могут также стать клеточные линии червей. Так, эмбриональные клеточные культуры из *C. elegans* используют для изучения процессов дифференцировки клеток, морфогенеза и динамики генной экспрессии, что открывает широкий спектр недоступных ранее экспериментальных возможностей [20]. Соматические клетки из различных тканей *C. elegans* (включая нейроны, мышечные клетки, клетки гиподермы и кишечника) могут быть культивированы для целенаправленного изучения тканево-специфических взаимодействий и сигнальных путей [21]. Клеточная культура паразитического плоского червя *Schistosoma mansoni*, способная к непрерывной культивации в течение 6 месяцев [22], также

Таблица. Сравнение наиболее распространенных типов экспрессионных клеточных культур [11, 24, 25]

Экспрессионная платформа	Достоинства	Недостатки	Посттрансляционные модификации	Стоимость, сложность очистки	Возможность масштабирования	Безопасность
Бактерии ( <i>E. coli</i> )	Низкая стоимость Простота генной инженерии Быстрый рост культуры и высокий выход целевого продукта Отработанные стратегии оптимизации экспрессии	Некорректный фолдинг некоторых белков и образование телец включений. Наличие эндотоксинов	Ненативные Отсутствие гликозилирования Трудности с образованием дисульфидных связей	Низкая	+++	Средняя
Дрожжи ( <i>P. pastoris</i> , <i>S. cerevisiae</i> )	Низкая стоимость Простота генной инженерии Быстрый рост культуры и высокий выход целевого продукта Отработанные стратегии оптимизации Корректный фолдинг больших (> 30 кДа) белков	Клеточная стенка может затруднить процесс очистки	Ненативные Существуют штаммы с возможностями ограниченного гликозилирования	Низкая	+++	Средняя
Растительные системы (BY-2, NT-1)	Быстрый рост культуры и высокий выход целевого продукта Возможность экспрессии мультибелковых комплексов	Генетическая нестабильность линий при длительных культивациях Повышенный риск контаминации культуры	Ненативные (требуется оптимизация генетических векторов)	Средняя / Отсутствует для съедобных растений	+++	Очень высокая
Клетки насекомых (Sf21, Sf9, Hi5)	Экспрессия эукариотических мультибелковых комплексов с корректным фолдингом Более высокие выходы продукта	Экспрессия с использованием сильных промоторов может нарушать фолдинг Нецелевое гликозилирование	Упрощенное N-гликозилирование	Средняя	+++	Низкая
Клетки млекопитающих (CHO, HEK293)	Нативное липидное окружение и условия фолдинга Возможность индуцибельной экспрессии с помощью транзientной трансфекции Возможность использования FACS (сортировка клеток, основанная на флуоресценции) на стабильных линиях	Низкий уровень экспрессии Сверхэкспрессия некоторых белков невозможна из-за токсичности Длительная оптимизация условий экспрессии	Нативные	Средняя	++	Низкая
Системы бесклеточной экспрессии	Быстрый метод экспрессии Возможность получения токсичных белков Детальный контроль параметров среды во время экспрессии	Высокая стоимость Недостаток <i>in vivo</i> факторов, обеспечивающих фолдинг	Необходимы дополнительные компоненты (например, микросомы ЭПР)	Низкая	+	Очень высокая

может стать интересным инструментом для изучения взаимодействий паразит–хозяин, а также тестирования антигельминтных препаратов. Многие виды морских червей являются источниками биологически активных соединений, в том числе пептидов с антимикробным, противовоспалительным, иммуномодулирующим, антиоксидантным и антигипоксическим действием [23]. Разработка и оптимизация технологий выделения и длительной культивации клеток червей могла бы дать толчок для скрининга и последующей эффективной наработки таких биологически активных веществ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, использование неклассических клеточных культур является перспективным направлением повышения эффективности производства биотерапевтических препаратов. Ряд особенностей механизмов экспрессии в альтернативных культурах позволяет минимизировать побочные эффекты и улучшить переносимость получаемых белковых препаратов. Также альтернативные организмы-продуценты помогают обойти ограничения, связанные с повышенной метаболической нагрузкой в культурах клеток

млекопитающих. Это открывает двери для разработки и производства более эффективных и доступных

биотерапевтических препаратов, способствуя прогрессу в области фармацевтики и медицины.

## Литература

- Daboussi F, Lindley ND. Challenges to Ensure a Better Translation of Metabolic Engineering for Industrial Applications. In: Selvarajoo K, editor. *Comput Biol Mach Learn Metab Eng Synth Biol.*, New York, NY: Springer US; 2023: 1–20. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2617-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2617-7_1).
- Rudge SR, Ladisch MR. Industrial Challenges of Recombinant Proteins. In: Silva AC, Moreira JN, Lobo JMS, Almeida H, editors. *Curr Appl Pharm Biotechnol*, Cham: Springer International Publishing; 2020: p. 1–22. Available from: [https://doi.org/10.1007/10\\_2019\\_120](https://doi.org/10.1007/10_2019_120).
- Meleady P, Doolan P, Henry M, Barron N, Keenan J, O'Sullivan F, et al. Sustained productivity in recombinant Chinese Hamster Ovary (CHO) cell lines: proteome analysis of the molecular basis for a process-related phenotype. *BMC Biotechnol.* 2011; 11: 78. Available from: <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-78>.
- Frei T, Cella F, Tedeschi F, Gutiérrez J, Stan G-B, Khammash M, et al. Characterization and mitigation of gene expression burden in mammalian cells. *Nat Commun.* 2020; 11: 4641. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18392-x>.
- Gutierrez JM, Feizi A, Li S, Kallehauge TB, Hefzi H, Grav LM, et al. Genome-scale reconstructions of the mammalian secretory pathway predict metabolic costs and limitations of protein secretion. *Nat Commun.* 2020; 11: 68. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13867-y>.
- Kaste JAM, Shachar-Hill Y. Model validation and selection in metabolic flux analysis and flux balance analysis. *Biotechnol Prog.* 2024; 40: e3413. Available from: <https://doi.org/10.1002/btpr.3413>.
- Eisenhut P, Marx N, Borsi G, Papež M, Ruggeri C, Baumann M, et al. Manipulating gene expression levels in mammalian cell factories: An outline of synthetic molecular toolboxes to achieve multiplexed control. *New Biotechnol.* 2024; 79: 1–19. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2023.11.003>.
- Kol S, Ley D, Wulff T, Decker M, Arnsdorf J, Schoffelen S, et al. Multiplex secretome engineering enhances recombinant protein production and purity. *Nat Commun.* 2020; 11: 1908. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15866-w>.
- Aviezer D, Brill-Almon E, Shaaltiel Y, Hashmueli S, Bartfeld D, Mizrahi S, et al. A Plant-Derived Recombinant Human Glucocerebrosidase Enzyme — A Preclinical and Phase I Investigation. *PLOS ONE.* 2009; 4: e4792. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004792>.
- Fausther-Bovendo H, Kobinger G. Plant-made vaccines and therapeutics. *Science* 2021; 373: 740–1. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.abf5375>.
- Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, Fischer R. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat Biotechnol.* 2004; 22: 1415–22. Available from: <https://doi.org/10.1038/nbt1027>.
- Woo S-D, Roh JY, Choi JY, Jin BR. Propagation of Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus in nonpermissive insect cell lines. *J Microbiol Seoul Korea.* 2007; 45: 133–8.
- Hong M, Li T, Xue W, Zhang S, Cui L, Wang H, et al. Genetic engineering of baculovirus-insect cell system to improve protein production. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022; 10. Available from: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.994743>.
- Hu Y-C, Yao K, Wu T-Y. Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens. *Expert Rev Vaccines.* 2008; 7: 363–71. Available from: <https://doi.org/10.1586/14760584.7.3.363>.
- Fernandes B, Castro R, Bhoelan F, Bemelman D, Gomes RA, Costa J, et al. Insect Cells for High-Yield Production of SARS-CoV-2 Spike Protein: Building a Virosome-Based COVID-19 Vaccine Candidate. *Pharmaceutics.* 2022; 14: 854. Available from: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040854>.
- Struble LR, Smith AL, Lutz WE, Grubbs G, Sagar S, Bayles KW, et al. Insect cell expression and purification of recombinant SARS-CoV-2 spike proteins that demonstrate ACE2 binding. *Protein Sci.* 2022; 31: e4300. Available from: <https://doi.org/10.1002/pro.4300>.
- Li T, Zheng Q, Yu H, Wu D, Xue W, Xiong H, et al. SARS-CoV-2 spike produced in insect cells elicits high neutralization titres in non-human primates. *Emerg Microbes Infect.* 2020; 9: 2076–90. Available from: <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1821583>.
- Fernandes B, Sousa M, Castro R, Schäfer A, Hauser J, Schulze K, et al. Scalable Process for High-Yield Production of PfCyRPA Using Insect Cells for Inclusion in a Malaria Virosome-Based Vaccine Candidate. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022; 10. Available from: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.879078>.
- Mabashi-Asazuma H, Kuo C-W, Khoo K-H, Jarvis DL. Modifying an Insect Cell N-Glycan Processing Pathway Using CRISPR-Cas Technology. *ACS Chem Biol.* 2015; 10: 2199–208. Available from: <https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00340>.
- Strange K, Christensen M, Morrison R. Primary culture of *Caenorhabditis elegans* developing embryo cells for electrophysiological, cell biological and molecular studies. *Nat Protoc.* 2007; 2: 1003–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.143>.
- Espejo L, Hull B, Chang LM, DeNicola D, Freitas S, Silbar V, et al. Long-Term Culture of Individual *Caenorhabditis elegans* on Solid Media for Longitudinal Fluorescence Monitoring and Aversive Interventions. *JoVE J Vis Exp.* 2022: e64682. Available from: <https://doi.org/10.3791/64682>.
- Hobbs DJ, Fryer SE, Duimstra JR, Hedstrom OR, Brodie AE, Collodi PA, et al. Culture of Cells from Juvenile Worms of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol.* 1993; 79: 913–21. Available from: <https://doi.org/10.2307/3283730>.
- Lazcano-Perez F, Roman-Gonzalez SA, Sanchez-Puig N, Espinosa RA-. Bioactive Peptides from Marine Organisms: A Short Overview. *Protein Pept Lett.* 2002; 19: 700–7. Available from: <https://doi.org/10.2174/092986612800793208>.
- Jayakrishnan A, Wan Rosli WR, Tahir ARM, Razak FSA, Kee PE, Ng HS, et al. Evolving Paradigms of Recombinant Protein Production in Pharmaceutical Industry: A Rigorous Review. *Sci.* 2024; 6: 9. Available from: <https://doi.org/10.3390/sci6010009>.
- Cid R, Bolívar J. Platforms for Production of Protein-Based Vaccines: From Classical to Next-Generation Strategies. *Biomolecules.* 2021; 11: 1072. Available from: <https://doi.org/10.3390/biom11081072>.

## References

- Daboussi F, Lindley ND. Challenges to Ensure a Better Translation of Metabolic Engineering for Industrial Applications. In: Selvarajoo K, editor. *Comput Biol Mach Learn Metab Eng Synth Biol.*, New York, NY: Springer US; 2023: 1–20. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2617-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2617-7_1).
- Rudge SR, Ladisch MR. Industrial Challenges of Recombinant Proteins. In: Silva AC, Moreira JN, Lobo JMS, Almeida H, editors. *Curr Appl Pharm Biotechnol*, Cham: Springer International Publishing; 2020: p. 1–22. Available from: [https://doi.org/10.1007/10\\_2019\\_120](https://doi.org/10.1007/10_2019_120).
- Meleady P, Doolan P, Henry M, Barron N, Keenan J, O'Sullivan F, et al. Sustained productivity in recombinant Chinese Hamster Ovary (CHO) cell lines: proteome analysis of the molecular basis for a process-related phenotype. *BMC Biotechnol.* 2011; 11: 78. Available from: <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-78>.
- Frei T, Cella F, Tedeschi F, Gutiérrez J, Stan G-B, Khammash M, et al. Characterization and mitigation of gene expression burden in mammalian cells. *Nat Commun.* 2020; 11: 4641. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18392-x>.



5. Gutierrez JM, Feizi A, Li S, Kallehaug TB, Hefzi H, Grav LM, et al. Genome-scale reconstructions of the mammalian secretory pathway predict metabolic costs and limitations of protein secretion. *Nat Commun.* 2020; 11: 68. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13867-y>.
6. Kaste JAM, Shachar-Hill Y. Model validation and selection in metabolic flux analysis and flux balance analysis. *Biotechnol Prog.* 2024; 40: e3413. Available from: <https://doi.org/10.1002/btpr.3413>.
7. Eisenhut P, Marx N, Borsi G, Papež M, Ruggeri C, Baumann M, et al. Manipulating gene expression levels in mammalian cell factories: An outline of synthetic molecular toolboxes to achieve multiplexed control. *New Biotechnol.* 2024; 79: 1–19. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2023.11.003>.
8. Kol S, Ley D, Wulff T, Decker M, Arnsdorf J, Schoffelen S, et al. Multiplex secretome engineering enhances recombinant protein production and purity. *Nat Commun.* 2020; 11: 1908. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15866-w>.
9. Aviezer D, Brill-Almon E, Shaaltiel Y, Hashmuell S, Bartfeld D, Mizrachi S, et al. A Plant-Derived Recombinant Human Glucocerebrosidase Enzyme — A Preclinical and Phase I Investigation. *PLOS ONE.* 2009; 4: e4792. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004792>.
10. Fausther-Bovendo H, Kobinger G. Plant-made vaccines and therapeutics. *Science* 2021; 373: 740–1. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.abf5375>.
11. Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, Fischer R. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat Biotechnol.* 2004; 22: 1415–22. Available from: <https://doi.org/10.1038/nbt1027>.
12. Woo S-D, Roh JY, Choi JY, Jin BR. Propagation of Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus in nonpermissive insect cell lines. *J Microbiol Seoul Korea.* 2007; 45: 133–8.
13. Hong M, Li T, Xue W, Zhang S, Cui L, Wang H, et al. Genetic engineering of baculovirus-insect cell system to improve protein production. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022; 10. Available from: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.994743>.
14. Hu Y-C, Yao K, Wu T-Y. Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens. *Expert Rev Vaccines.* 2008; 7: 363–71. Available from: <https://doi.org/10.1586/14760584.7.3.363>.
15. Fernandes B, Castro R, Bhoelan F, Bemelman D, Gomes RA, Costa J, et al. Insect Cells for High-Yield Production of SARS-CoV-2 Spike Protein: Building a Virosome-Based COVID-19 Vaccine Candidate. *Pharmaceutics.* 2022; 14: 854. Available from: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040854>.
16. Struble LR, Smith AL, Lutz WE, Grubbs G, Sagar S, Bayles KW, et al. Insect cell expression and purification of recombinant SARS-CoV-2 spike proteins that demonstrate ACE2 binding. *Protein Sci.* 2022; 31: e4300. Available from: <https://doi.org/10.1002/pro.4300>.
17. Li T, Zheng Q, Yu H, Wu D, Xue W, Xiong H, et al. SARS-CoV-2 spike produced in insect cells elicits high neutralization titres in non-human primates. *Emerg Microbes Infect.* 2020; 9: 2076–90. Available from: <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1821583>.
18. Fernandes B, Sousa M, Castro R, Schäfer A, Hauser J, Schulze K, et al. Scalable Process for High-Yield Production of PfCyRPA Using Insect Cells for Inclusion in a Malaria Virosome-Based Vaccine Candidate. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022; 10. Available from: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.879078>.
19. Mabashi-Asazuma H, Kuo C-W, Khoo K-H, Jarvis DL. Modifying an Insect Cell N-Glycan Processing Pathway Using CRISPR-Cas Technology. *ACS Chem Biol.* 2015; 10: 2199–208. Available from: <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00340>.
20. Strange K, Christensen M, Morrison R. Primary culture of *Caenorhabditis elegans* developing embryo cells for electrophysiological, cell biological and molecular studies. *Nat Protoc.* 2007; 2: 1003–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.143>.
21. Espejo L, Hull B, Chang LM, DeNicola D, Freitas S, Silbar V, et al. Long-Term Culture of Individual *Caenorhabditis elegans* on Solid Media for Longitudinal Fluorescence Monitoring and Aversive Interventions. *JoVE J Vis Exp.* 2022: e64682. Available from: <https://doi.org/10.3791/64682>.
22. Hobbs DJ, Fryer SE, Duimstra JR, Hedstrom OR, Brodie AE, Collodi PA, et al. Culture of Cells from Juvenile Worms of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol.* 1993; 79: 913–21. Available from: <https://doi.org/10.2307/3283730>.
23. Lazcano-Perez F, Roman-Gonzalez SA, Sanchez-Puig N, Espinosa RA-. Bioactive Peptides from Marine Organisms: A Short Overview. *Protein Pept Lett.* 2002; 19: 700–7. Available from: <https://doi.org/10.2174/092986612800793208>.
24. Jayakrishnan A, Wan Rosli WR, Tahir ARM, Razak FSA, Kee PE, Ng HS, et al. Evolving Paradigms of Recombinant Protein Production in Pharmaceutical Industry: A Rigorous Review. *Sci.* 2024; 6: 9. Available from: <https://doi.org/10.3390/sci6010009>.
25. Cid R, Bolívar J. Platforms for Production of Protein-Based Vaccines: From Classical to Next-Generation Strategies. *Biomolecules.* 2021; 11: 1072. Available from: <https://doi.org/10.3390/biom11081072>.