Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal 31(4): 284-290 (2016)
http://dx.doi.org/10.7841/ksbbj.2016.31.4.284 ISSN 1225-7117 / eISSN 2288-8268

연구논문

형질전환 벼 현탁세포 배양에서 hCTLA4Ig의 *in situ* 회수

최홍열[1†], 전수환[2†], 권준영[1], 윤보름[1], 홍석미[1], 김선달[1], 김동일[1]*

In situ Recovery of hCTLA4Ig from Suspension Cell Cultures of *Oryza sativa*

Hong-Yeol Choi[1†], Su-Hwan Cheon[2†], Jun-Young Kwon[1], Boreum Yun[1], Seok-Mi Hong[1], Sun-Dal Kim[1], and Dong-Il Kim[1]*

Received: 31 August 2016 / Revised: 17 December 2016 / Accepted: 23 December 2016
© 2016 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this research, recombinant human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-immunoglobulin (hCTLA4Ig) was produced by transgenic rice cells. RAmy3D promoter was used for overcome the limitation of low expression level in transgenic plant cells, and the secretion of target protein was accomplished by signal peptide. However, the RAmy3D promoter system which can be induced only by sugar starvation causes the decrease of cell viability. As a result, cell death promotes the release of protease which degrades the target proteins. The protein stability and productivity can be significantly influenced by proteolysis activity. Therefore, development of new strategies are necessary for the *in situ* recovery of target proteins from cell culture media. In this study, *in situ* recovery was performed by various strategies. Direct addition of Protein A resin with nylon bag leads to cell death by increased shear stress and decrease in production of hCTLA4Ig by protease. Medium exchange through modified flask could recover hCTLA4Ig with high cell viability and low protease activity, on the other hand, the productivity was lower than that of control. When *in situ* recovery was conducted at day 7 after induction in air-lift bioreactor, 1.94-fold of hCTLA4Ig could be recovered compared to control culture without *in situ* recovery. Consequently, *in situ* recovery of hCTLA4Ig from transgenic rice cell culture could enhance productivity significantly and prevent degradation of target proteins effectively.

Keywords: Plant cell culture, *In situ* recovery, hCTLA4Ig, Air-lift bioreactor, Protease

1. INTRODUCTION

hCTLA4Ig (human cytotoxic T lymphocyte antigen4-immunoglobulin)는 자가면역 질환의 일종인 류마티스성 관절염 치료제로써 사용되며 Orencia® (abatacept)라는 제품으로 판매되고 있다. 수용성인 hCTLA4Ig는 N말단에 CTLA4의 세포외 도메인 부분을 위치시키고 C말단에 hinge 부분과 면역글로불린의 CH2, CH3 부분을 융합하여 만든 단백질이다 [1]. 면역글로불린 일부를 융합시킴으로써 Protein A를 이용한 친화성 크로마토그래피를 통해 효과적인 정제가 가능하다 [2].

형질전환 식물세포를 이용한 공정에서 가장 널리 사용되는 프로모터는 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S 프로모터로 항시 발현 시스템이다. 반면 당 고갈에 의해서만 발현되는 RAmy3D 프로모터는 식물세포 발현 시스템에서 가장 높은 발현량이 보고되었고, 벼의 종자 발아 시 녹말을 분해하기 위해 발현되는 알파-아밀레아제 유전자 계열의 하나다 [3]. 하

†These authors contributed equally to this work as the first author.

[1]인하대학교 생명공학과,
[1]Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 22212, Korea
Tel: +82-32-860-7515, Fax: +82-32-872-4046
e-mail: kimdi@inha.ac.kr

[2]가천대학교 생명과학과
[2]Department of Life Science, Gachon University, Seongnam 13120, Korea

지만 당 고갈은 세포에 부정적인 영향을 미쳐 급격한 세포 생존도 저하 및 세포사멸을 초래한다 [4,5].

생물학적 물질합성 공정은 화학적 물질합성 공정과 달리 세포 자체를 이용한 목적물질의 생산방법이다. 생산 공정이 화학적 합성이 아닌 살아있는 세포를 이용한 공정이기 때문에 목적생산물 이외에도 다른 물질들이 생성된다. 이렇게 생성된 부산물들은 세포의 생장 및 목적물질의 생산 환경에 영향을 미치게 된다. 2차 대사산물 생산의 경우 목적물질의 활성저해가 일어날 수 있고, 부산물 자체의 독성 때문에 세포의 생장에 부정적 영향을 미쳐 생산이 저해될 수도 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 사용한 방법이 *in situ* 회수이다 [6]. *In situ* 회수는 배지 내의 목적 생산물을 적절한 시기에 회수하여 품질의 저하를 막고 독성이 있는 부산물을 제거하여 세포의 생장 및 생산 환경을 개선한다 [7]. 또한, 안정성이 떨어지는 생산물 자체를 먼저 회수함으로써 생산물의 활성이 유지될 수 있으며, 생산물이 단백질인 경우 배지로 분비된 프로테아제에 의한 분해를 막을 수도 있다 [8]. 결과적으로 목적생산물의 *in situ* 회수를 통해 하류 공정의 단계도 줄이면서 부피당 생산성까지 증가시키는 효과를 얻을 수 있다.

형질전환 식물세포를 이용한 재조합 단백질 생산은 세포의 내부에 단백질을 축적해 생산하거나, 세포 외부로 단백질을 분비하여 생산한다 [9,10]. 세포 외부로의 재조합 단백질의 분비는 세포를 파쇄하지 않고 배지 내 단백질의 분석과 정제를 할 수 있기 때문에 생물공정에 있어 유리하다 [11]. *In situ* 회수는 주로 미생물을 이용한 이차대사산물 생산 공정에서 생산량을 증진시키는데 이용되어 왔다. 하지만 식물과 동물세포를 이용한 생산 공정에도 *in situ* 회수를 이용하여 생산성을 증진시키는 연구도 시도되었다 [12]. 식물세포를 이용한 공정에서는 목적생산물의 끌어내기, 고정화, 투과화, 2상계의 방법을 통하여 *in situ* 회수를 공정에 적용하였다 [13,14].

본 연구에서는 hCTLA4Ig를 생산하는 벼 세포배양에서 목적단백질의 생산과 동시에 *in situ* 회수를 함으로써 생산량을 증진시키기 위한 연구를 진행하였다. RAmy3D 프로모터는 당 고갈 환경에서 작동하기 때문에 당이 없는 배지로 교환을 해주어야 한다. 당 고갈 환경은 벼 세포의 사멸과 생존도 감소를 유발하고, 다량의 프로테아제 분비를 촉진하여 목적단백질의 분해를 야기하며 생산성 감소로 이어진다. 따라서 목적단백질이 프로테아제에 의해 분해되지 않도록 생산과 동시에 배지에서 회수하는 것이 이상적이다. hCTLA4Ig를 *in situ* 회수하기 위하여 Protein A 레진을 배지 내로 직접 첨가하여 목적단백질을 회수하였고, 개조된 플라스크를 고안하여 효율적인 배지 회수를 통한 목적단백질의 회수를 진행하고자 하였다. 또한, 배지와 세포를 구획할 수 있는 공기부양식 생물반응기를 고안하여 Protein A 컬럼을 연결해 hCTLA-4Ig의 *in situ* 회수를 진행하였다 (Fig. 1).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. 세포주 및 배양조건

본 연구에 사용된 식물 세포주는 전북대로부터 분양받은 형질전환 벼 현탁세포이다. 이 세포주는 *Oryza sativa* L. cv Dongjin 유래의 현탁세포이며 RAmy3D 프로모터가 삽입되어있어 당 고갈 환경에서만 hCTLA4Ig를 발현한다. C말단에 분비 서열이 융합되어 있기 때문에 hCTLA4Ig 생산 후 배지로 분비된다. 형질전환 벼 세포의 생장배지는 자체 제조한 아

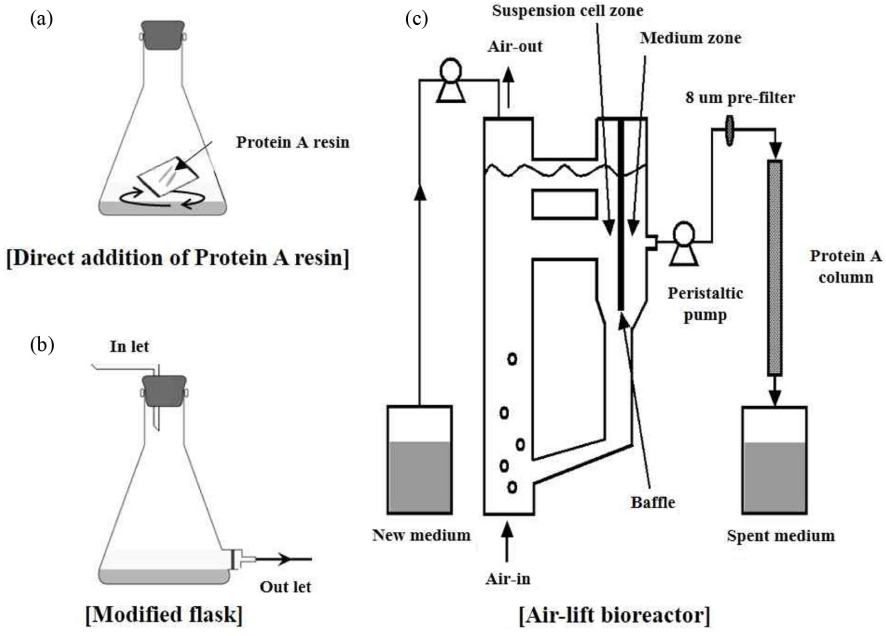

Fig. 1. *In situ* recovery concepts of (a) Protein A resin with nylon bag, (b) modified flask for medium exchange and (c) air-lift bioreactor.

미노산 (AA)배지에 3% 수크로오스, 2.0 mg/L 2,4-디클로로페녹시아세트산, 0.2 mg/L 카이네틴, 0.1 mg/L 지베렐린 산이 첨가되었고 50 mg/L의 하이그로마이신 항생제를 사용하였다. 500-mL 플라스크에서 9일 간격으로 계대배양을 진행하였고, 28°C, 120 rpm, 암 조건에서 현탁배양하였다. hCTLA4-Ig의 생산 유도는 당이 없는 아미노산 배지로 교환하여 진행하였다.

2.2. 세포량 측정

세포 생체량과 세포 건체량을 측정하여 세포의 생장을 확인하였다. 100-mL 플라스크에서 배양한 현탁세포를 종이 여과지를 이용하여 걸러주고 배지와 동량의 증류수로 3회 세척한 후 진공펌프로 수분을 제거하였다. 계량접시를 이용하여 세포 생체량을 측정하고 60°C 건조기에서 48시간 건조하여 세포 건체량을 측정하였다.

2.3. 프로테아제 활성 측정

세포가 분비하는 프로테아제의 활성 측정은 개량된 Anson's 법을 이용하였다 [15]. 1% 카제인 (67 mM 인산나트륨, pH 7.0) 용액 1 mL을 기질로 사용하고 0.5 mL의 배양액 시료를 혼합하여 50°C에서 20분간 반응시켰다. 반응을 종료하기 위해 30% 트리클로로초산 용액을 처리하여 50°C에서 30분간 정치하였다. 15,000 rpm에서 1분간 원심분리 후, 상등액을 취하여 파장 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 티로신용액의 농도범위를 0.05~0.4 mg/mL로 설정하여 표준물질로 사용하였고, 3차 증류수로 영점을 조정하였다. 위의 용액에서 1분당 1 mg의 티로신을 분해할 수 있는 효소의 양을 1 U (Unit)으로 정의하였다.

2.4. hCTLA4Ig 정량 분석

형질전환 벼 세포 배양액 샘플을 이용하여 hCTLA4Ig의 정량분석을 진행하였다. ImmunoPure® 인간형 IgG (Pierce)를 표준물질로 사용하여 샌드위치 효소 결합 면역 분석 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISA)을 진행하였다. 1차 항체는 Goat anti-human IgG(Fc) (KPL)을 사용하였고, 2차 항체는 Peroxidase-labeled goat anti-human IgG(γ) (KPL)을 사용하였다.

2.5. hCTLA4Ig 정성 분석

형질전환 벼 세포 배양액 샘플을 이용하여 웨스턴 브로팅을 진행하였다. 배양액 샘플을 10% 폴리아크릴아마이드 젤을 이용하여 분리한 후 PVDF 멤브레인 (Invitrogen)으로 이동시켜 분석하였다. 분자량의 마커로는 SeeBlue® (Invitrogen)을 사용하였고, 1차 항체는 Goat anti-human IgG (KPL), 2차 항체는 Peroxidase-labeled rabbit anti-goat IgG (KPL)을 사용하였다.

2.6. 플라스크에서 Protein A 레진을 이용한 hCTLA4Ig의 회수

hCTLA4Ig의 회수를 위해 입자 크기가 약 85~165 μm인 STREAMLINE rProtein A (Amersham Biosciences)를 사용하였다. 세포와 레진이 섞이는 것을 막기 위해 구멍이 50 μm 이하의 나일론 주머니를 2×2 cm 크기로 제작하여 레진을 넣고 100-mL 플라스크에 적용하는 방법을 선택하였다 (Fig. 1(a)). 나일론 주머니는 0.1 노르말농도 수산화나트륨 용액에 10분간 침지한 후 멸균수에 세척하여 사용하였다. Protein A 레진은 배양 4일 차에 4시간 동안 첨가하여 회수하였다.

2.7. 개조된 플라스크를 통한 배지 회수

배양 중 배지를 교환하여 hCTLA4를 회수하기 위해 개조된 250-mL 플라스크를 고안하였다. 이 플라스크 밑단에는 배양액 회수를 위한 유출구가 있고 그 사이에는 세포와 배양액을 분리하기 위한 유리 여과막이 삽입되어있다 (Fig. 1(b)). 배양 중의 배양액은 연동펌프에 의해 회수되며, 동량의 생산배지가 플라스크로 첨가되었다.

2.8. 공기부양식 생물반응기 운전 및 hCTLA4Ig의 회수

형질전환 벼 세포와 배지가 분리되도록 관류 배양용 1.2-L 공기부양식 생물반응기를 고안하였다. 테프론으로 제작한 격벽을 설치하여 세포의 배양 공간과 배양액의 회수 공간을 구획하였다. 작업량은 1-L로 배양하였고 공기는 멸균 필터를 통해 0.11 vvm으로 주입하였다 (Fig. 1(c)). 공기부양식 생물반응기에 Protein A 컬럼을 연결하여 배지로 분비된 hCTLA-4Ig를 *in situ* 회수하였다. 내경 1 cm의 유리로 된 컬럼 (Bio-Rad)을 멸균하여 STREAMLINE rProtein A (Amersham Biosciences) 레진을 10 mL 충진하였으며, 레진의 멸균을 위해 24시간 동안 20% 에탄올에 침지하였다. 그 후 멸균된 20 mM 인산나트륨 용액 (pH 7.0)으로 평형화시킨 후 사용하였다. 구획된 배지는 1 mL/min의 속도로 Protein A 컬럼을 통과시켰고, 8시간 동안 배지를 순환시킨 후 레진에 흡착된 hCTLA4Ig를 회수하였다. 컬럼 부피의 10배에 해당하는 20 mM 인산나트륨 용액 (pH 7.0)으로 컬럼을 세척하여 비특이적으로 부착된 단백질을 제거하였고, 0.1 M 글리신-염산 용출 용액 (pH 3.0)을 사용하여 hCTLA4Ig를 용출시켰다. 용출된 hCTLA4Ig의 중화를 위해 용출액의 5%만큼의 1 M 트리스-염산 용액 (pH 9.0)을 첨가하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Protein A 레진 첨가를 통한 *in situ* 회수

플라스크 상에서 배지로 분비된 hCTLA4Ig를 직접 회수하기 위해 Protein A 레진이 들어있는 나일론 주머니를 첨가하였다. Protein A 레진의 첨가 시점을 결정하기 위해 당 고갈 배지에서 형질전환 벼 세포의 hCTLA4Ig의 생산을 확인하였다 (Fig. 2(a)). hCTLA4Ig는 단백질 생산유도 후 4일 차에 가장 급격히 증가하였고 최대 생산량의 62%가 생산되었다. 생산유도 5일 차 이후에는 hCTLA4Ig의 생산 곡선 기울기가 감소하는 것을 확인할 수 있고 급격한 세포사멸과 배지 내로 분비

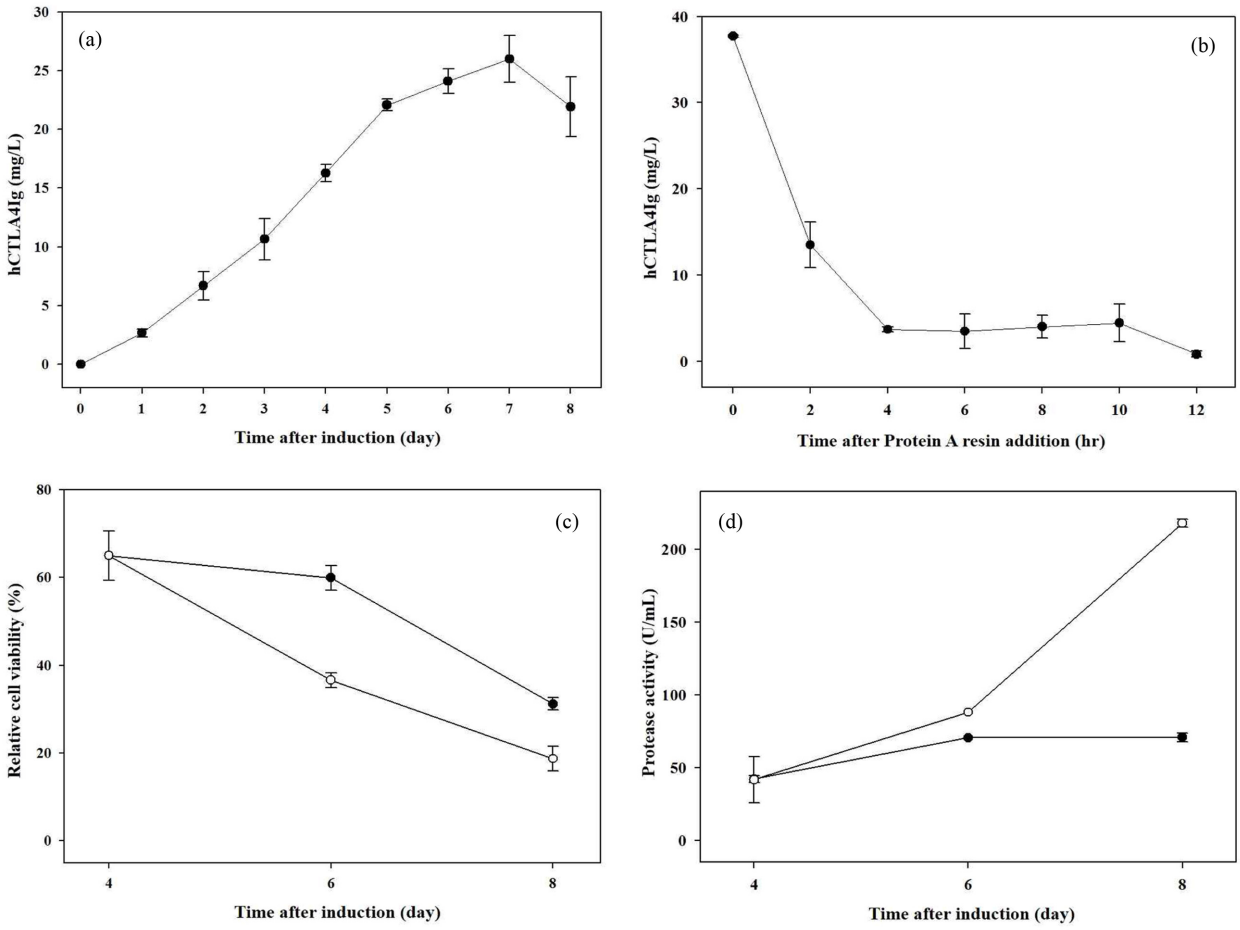

Fig. 2. Time course changes of (a) hCTLA4Ig production level for 8 days after induction. The cells were cultured in sugar-free medium. (b) Changes of hCTLA4Ig level in the cultured medium for 12 hr after Protein A resin addition. The resin was added into the spent medium containing hCTLA4Ig. Time course changes of (c) relative cell viability and (d) protease activity during production phase. The cells were cultured in sugar-free medium with Protein A resin for 4 hr at day 4. ●, control; ○, treatment of Protein A resin for 4 hr.

된 프로테아제에 의해 hCTLA4Ig의 분해가 진행되었다. 그러므로 Protein A 레진의 첨가는 hCTLA4Ig 생산유도 후 4일 차에 진행하기로 하였다. 레진의 첨가 시간을 결정하기 위해 hCTLA4Ig가 생산된 배지를 이용하여 레진을 첨가한 뒤 2시간마다 배양액을 회수하여 hCTLAIg를 확인하였다 (Fig. 2(b)). 레진 첨가 4시간 이후에 90% 이상의 hCTLA4Ig가 회수된 것을 확인하였다. 본 실험에서 Protein A 레진의 첨가는 hCTLA4Ig 생산유도 4일 차에 4시간 동안 진행하기로 하였다.

배양 8일 후의 최종 생산량을 비교하면, 레진을 첨가한 실험군 (0.36 mg)의 생산량이 레진을 첨가하지 않은 대조군 (0.62 mg) 생산량의 58%에 불과했다. Protein A 레진을 직접 첨가하여 0.28 mg의 hCTLA4Ig를 직접 회수하였음에도 불구하고 목적단백질 생산에 부정적인 영향을 주는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 배양 4일 차에 Protein A 레진을 4시간 동안 첨가한 이후, 세포의 생존도가 감소하고 (Fig. 2(c)) 배지 내로 분비된 프로테아제의 활성이 급격히 증가했기 때문이다 (Fig. 2(d)). 결과적으로 Protein A 레진이 들어있는 나일론 주머니의 첨가는 세포에 스트레스를 주어 세포사멸을 야기하고 프로테아제의 활성을 증가시켜 hCTLA4Ig 생산에 부정적인 영향을 주었다.

3.2. 개조된 플라스크에서의 *in situ* 회수

Protein A 레진의 직접적인 첨가는 형질전환 벼 세포 배양에서 hCTLA4Ig 생산에 부적합하였기 때문에 배양액만 회수하여 hCTLA4Ig의 *in situ* 회수를 진행하고자 하였다. 배지교환 방식을 통해 hCTLA4Ig가 생산된 배양액을 회수하고 새로운 생산배지를 첨가해줌으로써 프로테아제에 의한 목적단백질의 분해를 막고 생산성을 증진시키는 것을 목적으로 실험을 진행하였다. 개조된 플라스크는 세포를 침전시켰을 때 배지만 회수할 수 있도록 유리 여과막이 삽입된 유출구를 추가하여 고안하였다.

배양액의 회수 시점은 hCTLA4Ig 생산 유도 후 4일 차에 진행하였다. 개조된 플라스크에서의 세포 생존도는 일반 플라스크에서 배양한 대조군과 비교하여 큰 차이가 없었지만 (Fig.

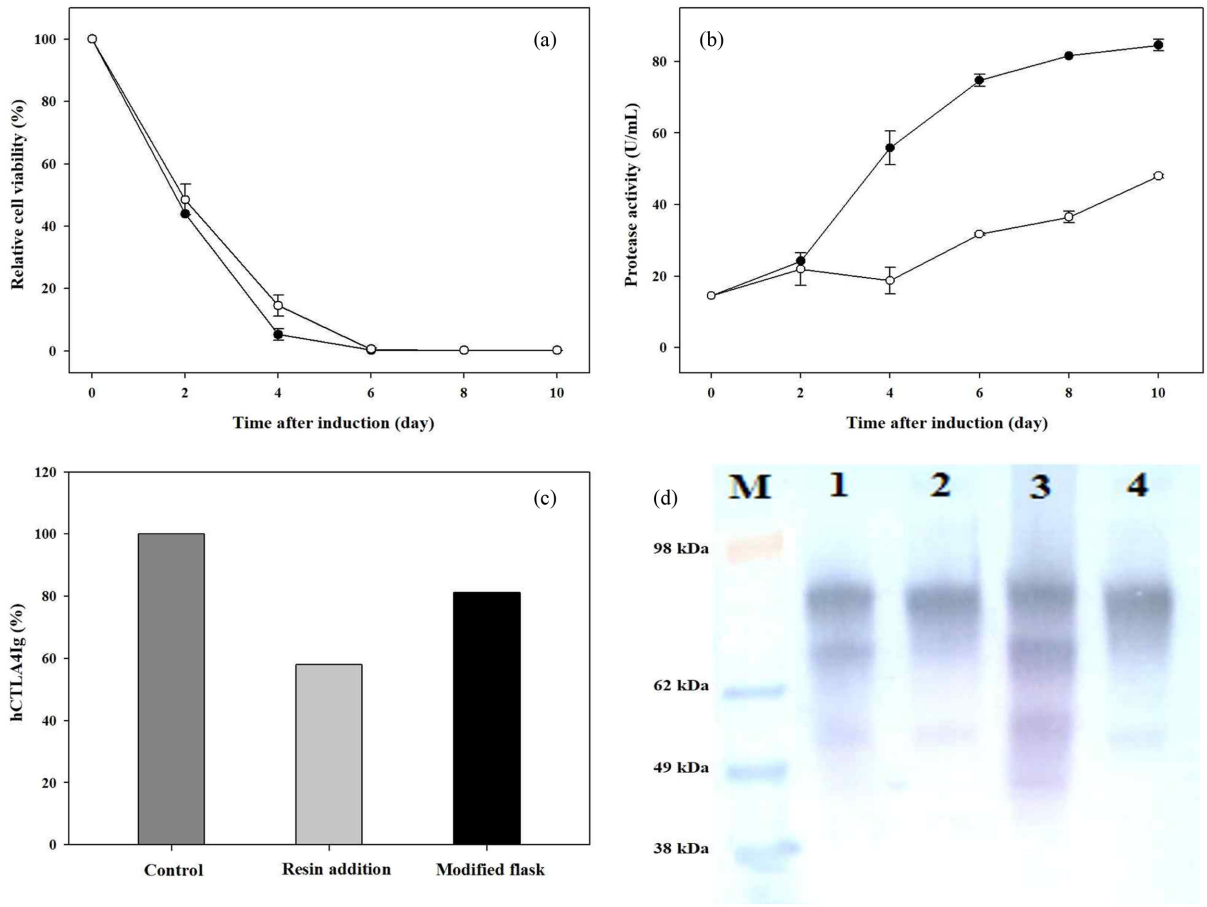

Fig. 3. Time course changes of (a) relative cell viability and (b) protease activity. The cells were cultured in sugar-free medium with modified flask. ●, control; ○, medium exchange at day 4 after induction in modified flask. (c) Comparison of hCTLA4Ig production level. ▭, control; ▭, Protein A resin addition; ▬, modified flask. (d) Western blotting of hCTLA4Ig in production media. Production media were recovered after *in situ* product recovery by Protein A resin addition and modified flask. M, marker; Lane 1, production medium after Protein A resin addition at day 4; Lane 2, elution sample after *in situ* recovery by Protein A resin addition at day 4; Land 3, production medium after medium exchange by modified flask at day 4; Lane 4, elution sample after *in situ* recovery by modified flask at day 4.

3(a)) 프로테아제의 활성은 배양기간 동안 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 3(b)). 개조된 플라스크를 통해 회수된 hCTLA4Ig (0.78 mg)는 일반 플라스크를 통해 회수된 hCTLA4Ig (0.96 mg)의 81% 임을 확인하였다 (Fig. 3(c)).

Protein A 레진의 첨가와 개조된 플라스크를 이용한 *in situ* 회수가 hCTLA4Ig의 분해에 어떠한 영향을 주었는지 알아보기 위해 웨스턴 블로팅으로 정성분석을 진행하였다. 웨스턴 블로팅의 결과를 통해 *in situ* 전과 후의 hCTLA4Ig 밴드의 차이를 확인할 수 있었다. 개조된 플라스크에서 *in situ* 회수는 hCTLA4Ig의 생산량은 증가시키지 못했지만 목적단백질의 분해를 감소시키는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3(d)).

3.3. 공기부양식 생물반응기에서의 *in situ* 회수

배양액을 회수하여 hCTLA4Ig를 *in situ* 회수하는 방식으로 공기부양식 생물반응기에 적용하였다. 1.2-L 공기부양식 생물반응기 내에 테프론으로 제작한 격벽을 설치하여 세포의 배양 공간과 배양액의 회수 공간을 구획하였고, 배양액 회수 공간은 Protein A 컬럼과 연결하여 원하는 시점에 hCTLA4Ig의 *in situ* 회수가 가능하게 고안하였다.

공기부양식 생물반응기에서 생산 유도 1일 차부터 2일 간격으로 샘플링을 진행하여 hCTLA4Ig의 생산을 확인하였다 (Fig. 4(a)). 생산 유도 7일 차에 배양액을 회수하고 11일 차에 최종 회수하였을 경우 (Fig. 4(b))와 생산 유도 3일 차, 7일 차에 배양액을 회수하고 11일 차에 최종 회수할 경우 (Fig. 4(c)) 각각의 hCTLA4Ig의 양을 비교하였다. 그 결과 생산 유도 7일 차에 *in situ* 회수한 경우 (39 mg)는 *in situ* 회수를 진행하지 않은 대조군 (20 mg)보다 1.94배 많은 hCTLA4Ig를 생산하였고, 생산 유도 3일 차, 7일 차에 두 번 *in situ* 회수한 경우 (33.6 mg)는 1.68배 많은 hCTLA4Ig를 생산하였다 (Fig 4(d)). 따라서 생산 유도 7일 차에 *in situ* 회수를 진행한 실험군이 가장 많은 hCTLA4Ig를 생산한 것을 확인 할 수 있었다. 공기부양식 생물반응기에서 *in situ* 회수를 통해 hCTLA4Ig의 생산량

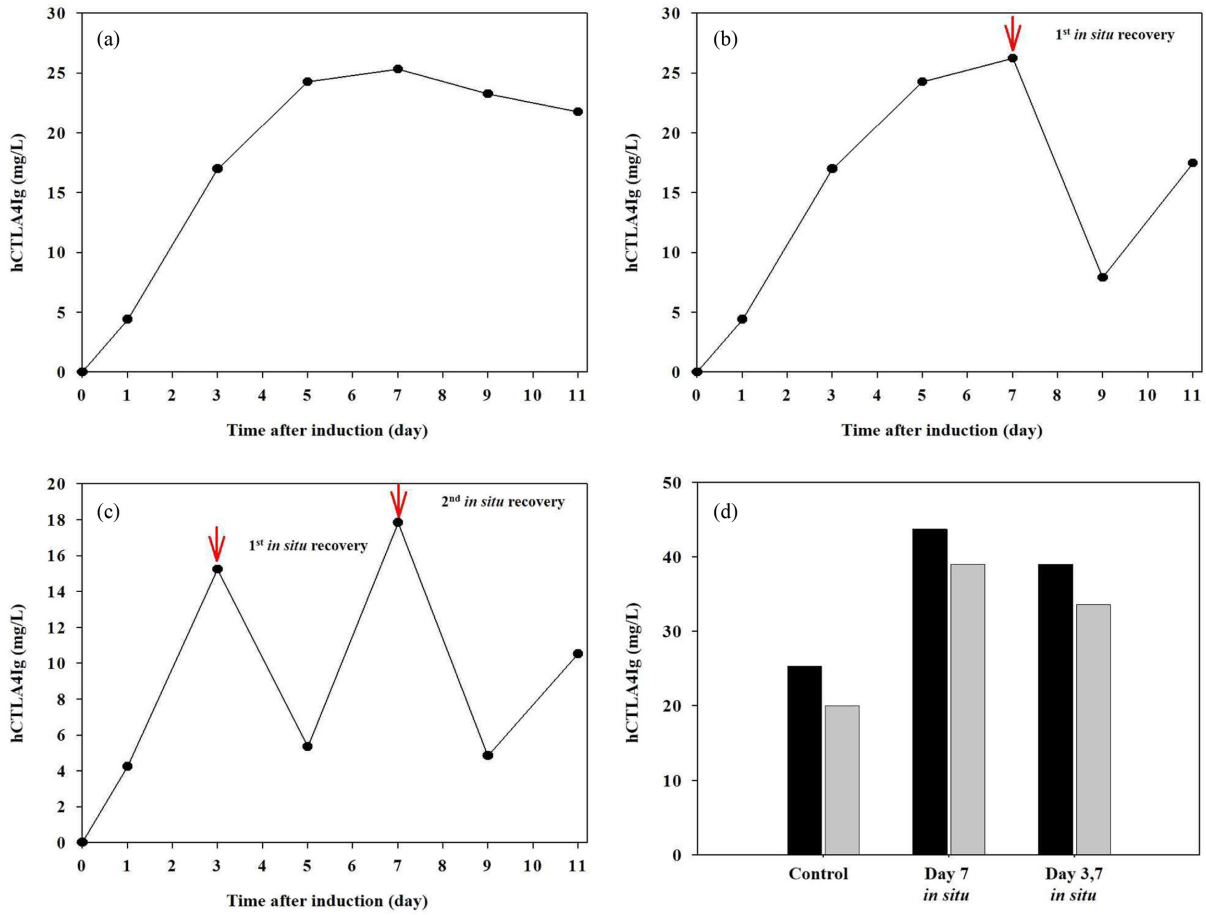

Fig. 4. Production of extracellular hCTLA4Ig after induction and recover on (a) day 7, (b) day 7 *in situ* and (c) day 3,7 *in situ*. (d) Comparison of hCTLA4Ig production level between before and after *in situ* recovery. ▭, before recovery; ■, after recovery.

이 증가한 이유는, 목적단백질 생산 과정에서 지속적인 산소 공급이 이루어졌기 때문으로 생각한다. 형질전환 벼 세포배양에서의 통기와 교반에 따른 혼합효율은 세포의 생장 및 단백질 생산에 큰 영향을 준다 [16].

4. CONCLUSION

본 연구에서는 형질전환 벼 세포배양에서 당 고갈 환경에 의한 세포사멸과 프로테아제 활성 증가에 따른 hCTLA4Ig 분해를 방지하기 위해 목적단백질을 *in situ* 회수하였다. 나일론 주머니에 Protein A 레진을 넣어 배지에 직접 적용하였을 경우, 외래물질 첨가에 따른 전단응력의 증가로 세포사멸이 유도되었고 프로테아제의 활성이 급격히 증가하였다. 그 결과 hCTLA4Ig의 최종 생산량은 Protein A 레진을 첨가하지 않은 대조군의 58%로 감소하였다. 형질전환 벼 세포배양 중에 배양액을 분리하여 hCTLA4Ig의 *in situ* 회수를 진행하기 위해 개조된 플라스크와 공기부양식 생물반응기를 적용하였다. 개조된 플라스크에서 hCTLA4Ig 생산 유도 4일 차에 *in situ* 회수를 진행한 결과, 높은 세포 생존도와 낮은 프로테아제의 활성을 보였고 *in situ* 회수를 진행하지 않은 대조군에 비해 hCTLA4Ig의 분해가 감소한 것을 확인할 수 있었다. 하지만 최종 hCTLA4Ig 생산량은 대조군의 81%로 감소하였다. 반면에 공기부양식 생물반응기에서는 hCTLA4Ig의 생산유도 7일 차에 *in situ* 회수를 수행하여 *in situ* 회수를 수행하지 않은 대조군보다 1.94배 높은 최종 생산량을 확인할 수 있었다. 따라서 형질전환 벼 세포배양에서 *in situ* 회수는 세포와 배양액을 구획하여 진행하는 것이 효율적이며 산소의 공급이 원활한 공기부양식 생물반응기에서 이루어지는 것이 유리함을 알 수 있었다. 결론적으로, 형질전환 벼 세포배양에서 *in situ* 회수전략은 hCTLA4Ig의 분해를 방지하여 목적단백질의 품질 유지에 효과적임을 확인하였다.

Acknowledgements

이 논문은 미래창조과학부 재원 한국연구재단의 바이오의료기술개발사업 (과제번호 NRF-2013M3A9B6075887) 지원에

의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Lee, S.-J., Park, C.-I., Park, M.-Y., Jung, H.-S., Ryu, W.-S., Lim, S.-M., Tan, H.-K., Kwon, T.-H., Yang, M.-S. and D.-I. Kim (2007) Production and characterization of human CTLA4Ig expressed in transgenic rice cell suspension cultures. *Protein Expres. Purif.* 51: 293-302.
2. W. R. Strohl (2015) Fusion proteins for half-life extension of biologics as a strategy to make biobetters. *Biodrugs* 29: 215-239.
3. Toyofuku, K., Umemura, T.-A. and J. Yamaguchi (1998) Promoter elements required for sugar-repression of the RAmy3D gene for α-amylase in rice. *FEBS Lett.* 428: 275-280.
4. Takatsuka, C., Inoue, Y., Matsuoka, K. and Y. Moriyasu (2004) 3-Methyladenine inhibits autophagy in tobacco culture cells under sucrose starvation conditions. *Plant Cell Physiol.* 45: 265-274.
5. Kwon, J.-Y., Lee, K.-H., Cheon, S.-H. and D.-I. Kim (2012) Application of anoxia with glucose addition for the enhanced production of hCTLA4Ig in transgenic rice suspension cell cultures. *Enzyme Microb. Tech.* 50: 298-303.
6. Woodley, J. M., Bisschops, M., Straathof, A. J. J. and M. Ottens (2008) Future directions for in-situ product removal (ISPR). *J. Chem. Technol. Biot.* 83: 121-123.
7. James, E., Mills, D. R. and J. M. Lee (2002) Increased production and recovery of secreted foreign proteins from plant cell cultures using an affinity chromatography bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 12: 205-213.
8. J. F. Buyel (2015) Process development strategies in plant molecular farming. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16: 966-982.
9. He, X., Haselhorst, T., von Itzstein, M., Kolarich, D., Packer, N. H., Gloster, T. M., Vocadlo, D. J., Clarke, L. A., Qian, Y., and A. R. Kermode (2012) Production of α-L-iduronidase in maize for the potential treatment of a human lysosomal storage disease. *Nat. Commun.* 3: 1062.
10. Jung, J.-W., Kim, N.-S., Jang, S.-H., Shin, Y.-J. and M.-S. Yang (2016) Production and characterization of recombinant human acid α-glucosidase in transgenic rice cell suspension culture. *J. Biotechnol.* 226: 44-53.
11. Kuo, Y.-C., Tan, C.-C., Ku, J.-T., Hsu, W.-C., Su, S.-C., Lu, C.-A. and L.-F. Huang (2013) Improving pharmaceutical protein production in *Oryza sativa*. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 8719-8739.
12. Stark, D. and U. von Stockar (2003) In situ product removal (ISPR) in whole cell biotechnology during the last twenty years. *Adv. Biochem. Eng. Biot.* 80: 149-175.
13. Komaraiah, P., Ramakrishna, S. V., Reddanna, P. and P. B. Kavi Kishor (2003) Enhanced production of plumbagin in immobilized cells of *Plumbago rosea* by elicitation and in situ adsorption. *J. Biotechnol.* 101: 181-187.
14. Roja, G., Bhangale, A. S., Juvekar, A. R., Eapen, S. and S. F. D'Souza (2005) Enhanced production of the polysaccharide arabinogalactan using immobilized cultures of *Tinospora cordifolia* by elicitation and in situ adsorption. *Biotechnol. Progr.* 21: 1688-1691.
15. Chakrabarti, S. K., Matsumura, N. and R. S. Ranu (2000) Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease from *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2). *Curr. Microbiol.* 40: 239-244.
16. Kwon, J.-Y., Cheon, S.-H., Nam, H.-J., Choi, H.-Y. and D.-I. Kim (2013) Process characterization of hCTLA4Ig production in transgenic rice cell cultures using a 3-L bioreactor. *Appl. Biochem. Biotech.* 171: 1276-1288.