

УДК 618.19-006.6:616-097:615.322.012

В.С. Косоруков¹, Е.Н. Кособокова¹, М.В. Пинюгина¹, М.А. Севостьянова¹, А.И. Щербakov¹,
Н.В. Андоронова¹, Э.Ш. Соломко¹, Е.В. Шешукова², Е.М. Трещалина¹, Ю.Л. Дорохов²

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ РЕЦЕПТОРА HER2, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО ИСТОЧНИКА

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина», Москва

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

Контактная информация

Косоруков Вячеслав Станиславович, к.б.н., заведующий лабораторией трансгенных препаратов НИИ ЭДuТО

адрес: 115478 Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(499)324-14-59

e-mail: atgtga@mail.ru

Статья поступила 29.04.2015, принята к печати 12.05.2015.

Резюме

Лекарственные препараты, полученные из растений, становятся одним из лидирующих коммерческих направлений в современной биотехнологии. Преимущества, которые дают подобные технологии, не сравнятся ни с каким другим современным методом получения лекарственных препаратов на основе рекомбинантных белков. Среди основных положительных моментов технологии получения рекомбинантных белков из растительного источника назовем легкую масштабируемость, экономичность, биобезопасность, простоту культивирования и сбора биоматериала. Этот подход обещает быть наиболее перспективным для получения широкого спектра лекарственных субстанций и вакцин. В своей работе мы провели исследования *in vitro* и *in vivo* биологической активности рекомбинантных антител против онкоантигена HER2 из растений – фитотрастузумаба. Фитотрастузумаб и трастузумаб имеют схожие антипролиферативные свойства в отношении клеток РМЖ с гиперэкспрессией HER2 *in vitro*. *In vivo* на подкожных ксенографтах SK-BR-3 Her2+ РМЖ человека у иммунодефицитных мышей Balb/c nude показано, что фитотрастузумаб достоверно ингибирует рост опухоли SK-BR-3.

Ключевые слова: HER2, рак молочной железы, рекомбинантные антитела, экспрессия в растениях.

V.S. Kosorukov¹, E.N. Kosobokova¹, M.V. Pinyugina¹, M.A. Sevostyanova, A.I. Scherbakov¹,
N.V. Andronova¹, E.Sh. Solomko¹, E.V. Sheshukova², E.M. Treschalina¹, Yu.L. Dorokhov²

THE BIOLOGICAL ACTIVITY

OF PLANT-DERIVED ANTI-HER2 RECOMBINANT ANTIBODIES

¹FSBSI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow

²Moscow State University. M.V. Lomonosov, Moscow

Abstract

Pharmaceuticals derived from plants, have become one of the leading commercial directions in modern biotechnology. The benefits that offer these technologies, cannot be matched with any other modern technology for producing drugs from recombinant proteins. Main advantages of plant technologies for production of proteins are easy scalability, efficiency, bio-safety, ease of cultivation and collection of biological material. This approach promises to be the most perspective for production of a wide range of drug substances and vaccines. In current investigation we have analyzed *in vitro* and *in vivo* biological activity of plant-derived anti-HER2 recombinant antibodies – phytotrastuzumab. Phytotrastuzumab and trastuzumab have similar activity in growth suppression of breast cancer cells overexpressing HER2 *in vitro* and were active in suppression of xenografted tumors SK-BR-3 *in-vivo*.

Key words: HER2, breast cancer, recombinant antibodies, plant-derived proteins.

Введение

Люди веками использовали растения и экстракты из них для профилактики и лечения различных заболеваний. Даже сейчас, в век химического производства, более четверти лекарственных средств содержат компоненты, полученные из растений [23]. Только недавно разработаны технологии, позволяющие синтезировать в растениях рекомбинантные лекарственные

белки, которые ранее получали только экспрессией в трансформированных культурах клеток бактерий и эукариотов [17]. Первые такие препараты уже близки к коммерческому использованию [19].

В настоящее время применение биотехнологических методов позволяет получать из растений широкий спектр рекомбинантных белков, таких как цитокины, антитела, вакцины, ферменты и т.д. [3; 6; 13; 16; 22].

Использование растений в качестве платформы для получения биологических молекул имеет экономические и производственные преимущества в сравнении с другими платформами. Показано, что стоимость фармацевтической продукции белка в растениях может быть от 10 до 50 раз ниже, чем производство того же белка из клеток млекопитающих. В растениях экспрессируются как одноцепочечные [7; 24], так и полноразмерные антитела [9; 12; 14; 15]. Также можно синтезировать специфические противоопухолевые вакцины для конкретного пациента [18]. Благодаря наличию эффективной системы посттрансляционной модификации белков, растения как фармацевтическая платформа могут быть удобным продуцентом новых противоопухолевых антител [5].

В последние десятилетия достаточно большое клиническое значение приобрело терапевтическое применение моноклональных антител. Технология получения терапевтических антител прошла путь от их очистки из крови и асцитов животных до высокотехнологичного получения рекомбинантных гуманизированных и человеческих моноклональных антител методами геной инженерии и биотехнологии. Впервые препараты на основе гуманизированных антител стали применять в конце прошлого века в борьбе с опухолями, характеризующимися специфическими антигенными маркерами. Яркий представитель таких новообразований – HER2⁺ рак молочной железы.

Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/neu) – рецептор, участвующий в росте опухолевых клеток рака молочной железы. Этот рецептор является приоритетной мишенью для рекомбинантных антител против HER2/neu, таких как трастузумаб [11]. Этот препарат был одобрен FDA (USA) для лечения метастазирующего рака молочной железы.

У 20–30 % пациенток с метастатическим раком молочной железы иммуногистологически обнаруживается гиперэкспрессия рецепторов HER2, что приводит к нарушению передачи сигналов в клетку, вызывает развитие резистентности к апоптозу и нарушению роста клетки. Трастузумаб инициирует реакцию антителзависимой цитотоксичности, ингибирует передачу сигналов через рецептор Her2, а так же препятствует расщеплению внеклеточного домена рецептора [10]. Было показано, что трастузумаб повышает выживаемость больных с метастазирующим раком молочной железы, и этот препарат входит сейчас в большинство схем лечения [21; 25].

Кроме прямой терапии моноклональными антителами развивается их применение в качестве прицеливающих агентов в различных подходах таргетной терапии. Например, возможно связывание моноклональных антител с поверхностью липосом, нагруженных лекарственными средствами. Такой подход позволяет химиопрепаратам целенаправленно попадать и накапливаться в районе опухолевого узла [1; 2].

Трастузумаб получают с помощью техноло-

гии рекомбинантной ДНК из культуры клеток млекопитающих клеток яичников китайского хомячка. Нашей группой был получен фитотрастузумаб – моноклональное рекомбинантное антитело, аффинное к эпитопу на молекуле HER2, аналогично трастузумабу, из растения с использованием транзитной системы трансформации растений [14].

Проведенные исследования показали, что трастузумаб и фитотрастузумаб имеют сходные антипролиферативные свойства к клеткам рака молочной железы с гиперэкспрессией Her2.

Для экспрессии антител в листьях *Nicotiana benthamiana* использовали гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи антитела и векторы, несущие компоненты вирусов растений. Показано, что при коинфильтрации векторные системы обеспечивают высокий выход полноразмерных антител, которые распознают и связываются с рецепторами HER2 на поверхности опухолевых клеток и проявляют биологическую активность.

Целью настоящего исследования является определение биологической эффективности субстанции рекомбинантных антител против онкоантигена HER2, полученной из растений.

Материалы и методы

Генетические последовательности, кодирующие гены тяжелой и легкой цепей рекомбинантного антитела фитотрастузумаб, клонировали в трансфекционные векторы под контроль 35S-промотора. Для снижения эффектов интерференции при коинфильтрации векторных конструкций были использованы основы на базе разных вирусов. Конструкция для тяжелой цепи была построена на основе вирусного вектора с элементами TMV, конструкция легкой цепи на основе вектора с элементами X вируса картофеля [14]. Получены векторы VTM-PT-NC и PVX-PT-LC. Для повышения уровня экспрессии использовали дополнительный вектор, несущий супрессор p19 *Tomato Bushy Stunt Virus*, блокирующий эндогенный транспорт РНК.

Для агроинфильтрации *Agrobacterium tumefaciens* штамм GV3101 трансформировали соответствующими конструкциями и получили индивидуальные штаммы-носители векторов. Далее наращивали в течение ночи при +28 °С в среде LB, содержащей соответствующие конструкции антибиотика.

Аликвоту клеточной суспензии *A. tumefaciens* после наращивания в течение ночи разводили в 10мМ MES-буфера (pH 5,5) с добавлением 10 мМ MgSO₄ до конечной оптической плотности OD₆₀₀=0,3.

Агроинфильтрацию проводили на полностью сформированных листьях *N. Benthamiana* методом шприцевания. Для накопления продукта в листьях растение выращивали в тепличных условиях при температуре +23 °С в течение 5 дней.

Выделение рекомбинантных антител из растительной биомассы. Навеску листьев измельчали в гомогенизаторе с добавлением буфера

для экстракции (100мМ раствор натрия цитрата, 25мМ раствор ЭДТА), инкубировали при перемешивании 40 минут и полученный экстракт пропускали через фильтр с ϕ пор 190 мкм. Фильтрат центрифугировали при +6 °С и скорости 4000 об/мин в течение 30 мин. Супернатант последовательно пропускали через фильтры с ϕ пор 20 мкм и 0,4 мкм.

Фильтрат наносили на аффинную колонку HiTrap MabSelect SuRe (GE Healthcare) на приборе АКТА prime plus (производитель GE Healthcare). Далее проводили элюцию буфером с 100мМоль раствором глицина при рН=2,7. Элюат стабилизировали раствором 1М Tris-HCl рН=7,5.

Доочистку рекомбинантного белка проводили гель-фильтрацией на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) с заменой буфера на 0,9% раствор NaCl.

Электрофоретическое разделение белков проводили в ПААГ по методу Лемли в денатурирующих и нативных условиях с окраской Coomassie brilliant blue G-250 по стандартной методике.

Иммуноферментный анализ проводили с использованием набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации общих иммуноглобулинов класса G в сыворотке крови человека (ЗАО «Вектор-Бест»), согласно рекомендациям производителя.

Антипролиферативный эффект фитотрастузумаба *in vitro* проверяли на клетках аденокарциномы молочной железы человека линии SK-BR-3 с помощью МТТ-теста по стандартной методике. Клетки SK-BR-3 высаживали в низкой плотности (30 тыс. клеток/мл) в триплетах на 48-луночный планшет в среде, содержащей 10 % сыворотки FCS. На следующий день эту среду заменяли на среду с низким содержанием сыворотки (1 %), добавляли различные концентрации тестируемых препаратов. Среду, антибиотики и препараты меняли один раз в 3–4 дня. Рост клеток определяли модифицированным «митогенным методом по Crystal Violet».

Клетки промывали PBS и фиксировали 1 % -ным параформальдегидом на PBS и окрашивали 0,5 %-ным р-ром Crystal Violet (Sigma Chemical Co) на 96 %-ном этаноле. Краситель растворяли в этаноле и измеряли на спектрофотометре при ν 540–560 нм. Выживаемость клеток рассчитывали, как отношение оптической плотности в каждой лунке, содержащей действующий агент, к оптической плотности контрольных лунок.

Эффективность ТРО *in vivo* определяли на п/к ксенографтах SK-BR-3 Her2⁺, имплантированных иммунодефицитным мышам *Balb/c nude* (*CAnN.Cg-Foxn1^{tm1/Crl}*) 3 млн. клеток билатерально. Фитотрастузумаб в разовой дозе 20 мг/кг вводили парентерально, затем 8-кратно через 48 ч в дозе 10 мг/кг на 6–20 сутки роста при стартовом объеме опухоли $V_{ср} = 16 \pm 2,5 \text{ мм}^3$. В качестве положительного контроля использовали трастузумаб (Герцептин, Roche, Швейцария), в качестве отрицательного – 0,9 %-ный р-р NaCl. Для вычисления Т/С (treatment/control) с помощью электронного изме-

рителя многократно в процессе и после лечения измеряли опухолевые узлы и рассчитывали средние объемы опухолей в каждой группе. Минимальный критерий эффективности Т/С < 42%. Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием ДИ средних сравниваемых величин, рассчитанных по стандартному методу Стьюдента в модификации Р.Б. Стрелкова. Достоверными считали различия при $p < 0,05$. Наблюдение проводили в течение 30 дней после трансплантации опухолей, затем животных умерщвляли передозировкой эфирного наркоза в рамках правил гуманного обращения с лабораторными животными.

Результаты и обсуждение

Ранее была разработана транзистная система экспрессии белка в растении на основе вирусных векторов для получения полноразмерных противоопухолевых моноклональных антител. Это дало возможность использования растений как платформы для получения антител для терапевтического применения. В системе используются провирусные векторы и интрон оптимизации TMV-вектора, в котором скрытый участок сплайсинга удален и вставлены несколько интронов. Для сборки в растении полноразмерных антител необходима одновременная экспрессия в одной клетке генов легкой и тяжелой цепи. Для этого листья инфицируют двумя различными не конкурирующими между собой векторами, такими как TMV и PVX. В данном исследовании мы использовали 35S-векторные системы, в которых TMV и PVX векторы кодируют тяжелые и легкие цепи фитотрастузумаба.

Были синтезированы гены, кодирующие тяжелую и легкую цепи фитотрастузумаба. На основе этих последовательностей были сконструированы 35S-векторы (35S-LC и 35S-HC). Листья *N.benthamiana*, инфильтрованные векторами VTM-PT-HC, PVX-PT-LC и супрессором р19, экспрессировали значимое количество антител, что подтверждалось результатами электрофоретического разделения белка в ПААГ. Антитела были экстрагированы из листьев и очищены аффинной хроматографией (рис. 1).

Полученные антитела были проанализированы методом SDS-ПААГ в нативных и денатурирующих условиях. Полосы, соответствующие тяжелой (~55 кДа) и легкой (~25 кДа) цепи, ярко выражены на электрофореграмме и соответствуют по подвижности в геле контрольному препарату трастузумаб.

Экспрессия конструкции на основе промотора 35S была максимальной на 5 день после инфильтрации листьев.

Оценку накопления фитотрастузумаба в листьях и количество в растворах в процессе очистки проводили методом ИФА набором для определения сывороточных иммуноглобулинов класса G человека. В среднем выход очищенных антител составлял 100–150 мкг/г от сырого веса листьев, в зависимости от эксперимента (рис. 2).

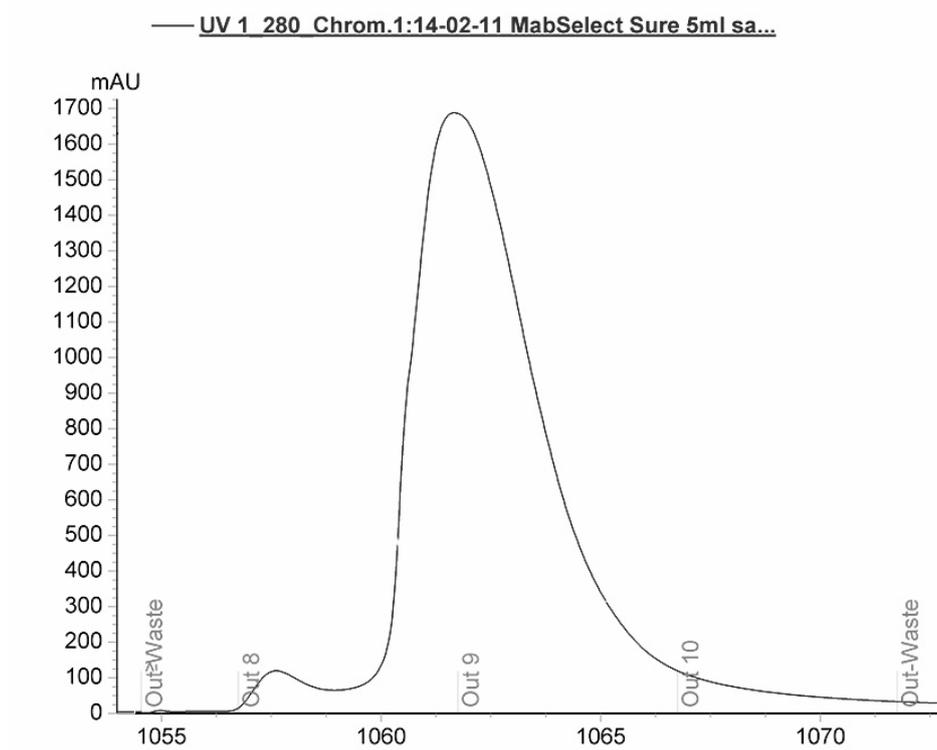


Рис. 1. Хроматограмма элюции 20 мг фитотрастузумаба с аффинной колонки с сорбентом MabSelect на основе белка А.

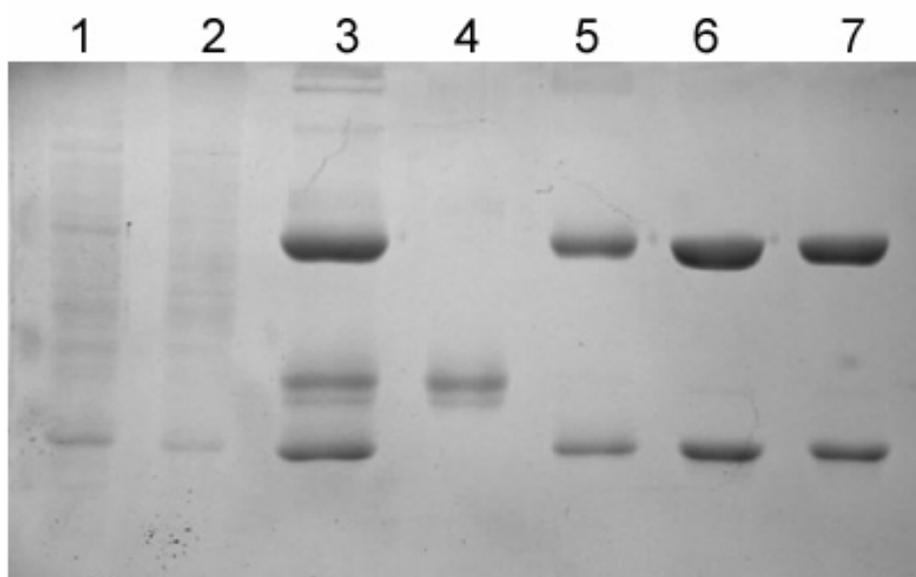


Рис. 2. Электрофореграмма результатов очистки фитотрастузумаба (денатурирующие условия).

Дорожки:

- 1 – экстракт перед хроматографией;
- 2 – несвязавшиеся белки;
- 3 – элюция с колонки MabSelect;
- 4 – элюция фитоантител с колонки MabSelect начало;
- 5 – элюция фитоантител с колонки MabSelect окончание;
- 6 – очищенный фитотрастузумаб после гель-фильтрационной хроматографии;
- 7 – контрольный образец трастузумаб.

Полученные данные показывают, что чистота получаемой субстанции была более 97 % и размер легкой и тяжелой цепей фитотрастузумаба полностью соответствуют нормальным IgG человека.

Исследование биологической активности фитотрастузумаба при связывании с клеточным рецептором HER2 проводили *in vitro* на культуре клеток SK-BR-3, имеющих гиперэкспрессию рецептора HER2 в количестве 106–107 молекул на клетку.

Известно, что анти-HER2 антитела значительно подавляют рост опухолей молочной железы, что даже может привести к исчезновению уже развившейся опухоли [20]. Анализ жизненного цикла HER2-положительных раковых клеток молочной железы SK-BR-3 показывает, что антиHER2 антитела дозо-зависимым образом уменьшают количество клеток SK-BR-3, находящихся в S-фазе, и увеличивают процент клеток в фазе G₀/G₁.

Результаты представлены на рис. 3. Не обнаружено статистически значимых различий в количестве клеток при добавлении контрольного препарата трастузумаб и растительных антител к онкобелку HER2.

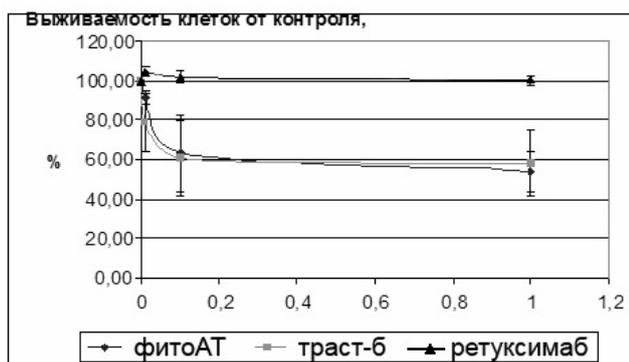


Рис. 3. Сравнение антипролиферативного действия фитотрастузумаба и трастузумаба в концентрациях 1–0,01 мкг/мл. Митогенный метод по Crystal Violet.

При концентрации препаратов 1 мкг/мл ингибирование пролиферации составляет 45,97%±10,09 для фитотрастузумаба и 41,93%±17,25 для трастузумаба, для концентраций 100 нг/мл ингибирование пролиферации составляет 36,6%±19,63 для фитотрастузумаба и 39,27%±18,96 для трастузумаба; для концентрации 10 нг/мл – 8,45%±3,29 для фитотрастузумаба и 21,35%±14,81 для трастузумаба.

В качестве контроля на неспецифическое действие антител мы использовали ритуксимаб (антитела против CD20 нормальных и раковых В-лимфоцитов; препарат Мабтега, Хоффман-Ла Рош), и показали отсутствие заметного эффекта (рис. 3).

Таким образом, рекомбинантные антитела фитотрастузумаб блокируют пролиферацию клеточной линии рака молочной железы с гиперэкспрессией HER2 в концентрациях, сравнимых с таковой трастузумаба. Это говорит об эквивалентности активности обоих антител в данном тесте.

Дальнейшие исследования проводили *in vivo* с целью определения влияния лечения фитотрасту-

зумаба на рост ксенографтов Her2⁺ опухолей человека SK-BR-3 в сравнении с трастузумабом.

Культура клеток SK-BR-3 из Коллекции штаммов опухолей человека РОНЦ была имплантирована мышам п/к в ранее отработанной прививочной дозе 3 млн. клеток на мышь в 0,1 мл питательной среды 199. Гиперэкспрессия рецептора HER2 на клетках культуры SK-BR-3 была подтверждена в серии предварительных исследований методом проточной цитофлуорометрии.

На +6 сутки после трансплантации, когда опухолевые узлы появились у всех мышей (100% прививаемость), были измерены размеры опухолей, после чего животные ранжированы на 3 группы:

- контроль роста опухоли,
- контроль ответа на трастузумаб
- опытная с лечением фитотрастузумабом.

Средний начальный объем опухолей в каждой из групп составил 16±2,5 мм³.

1 группа (контроля роста опухоли) – животные не получали специфического лечения, им проводили внутривентральные инъекции 0,9% р-ра NaCl в режиме, аналогичном таковому опытной группы.

2 группа (контроля эффективности трастузумаба) – животные получали лечение трастузумабом, который начинали вводить на +6 сутки после трансплантации внутривентрально 9-дневным курсом: 1 инъекция в дозе 20 мг/кг, вторая – через 24 ч, а остальные 7 – через 48 ч в РД 10 мг/кг. Курсовая доза составила 100 мг/кг, длительность курса – 15 дней, с +6 по +21 сутки.

3 группа (фитотрастузумаба) – мыши получали лечение по аналогичной по дозировке, кратности, длительности и пути введения схеме.

Противоопухолевый эффект лечения оценивали по общепринятому показателю ТРО [4].

Эффективность фитотрастузумаба при применении вышеописанной схемы показана в таблице. В группе контроля рост опухоли в течение 4 нед после трансплантации характеризуется достаточно высокой скоростью, объем опухоли с 6 по 22 сутки увеличился более чем в 20 раз, что свидетельствует о стандартности модели.

Результаты показали, что в опытной группе введение фитотрастузумаба было осуществлено в запланированном режиме при удовлетворительной переносимости лечения. Ухудшения состояния или гибели мышей в результате введения фитотрастузумаба не отмечали. В 3 группе (фитотрастузумаба) на протяжении всего периода лечения и в течение 1 суток после лечения опухоли были достоверно в 11 раз меньше, чем в контроле, ТРО=31–9% (p<0,05).

В группе мышей, получавших трастузумаб (2), на все сроки наблюдения размеры опухоли были достоверно, в 6 раз, меньше, чем в группе контроля. В течение этого периода и спустя день после окончания лечения Т/С=32–15% (p<0,05). Статистически достоверных различий с данными группы фитотрастузумаба не выявлено.

Полученный эффект дает возможность охарактеризовать фитотрастузумаб как равноэффективный трастузумабу препарат в отношении аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3.

Таблица

Эффективность фитотрастузумаба при лечении мышей-самок *Balb/c nude* с гетеротрансплантатами рака молочной железы человека *SK-BR3 Her2+*

Воздействие	V ср. (мм ³); сутки после перевивки опухоли				
	V ₀	V _t на фоне и после лечения			
		6	11	15	19
КРО (физ. р-р)	16 [13÷19]	87 [56÷118]	137 [79÷195]	242 [131÷353]	429 [284÷574]
Фитотрастузумаб	16 [14÷18]	27 [19÷35]	28 [17÷39]	33 [21÷45]	38 [25÷51]
Т/С%	–	31	20	14	9
Трастузумаб	16 [14÷18]	28 [14÷42]	31 [15÷46]	51 [21÷81]	65 [16÷114]
Т/С%	–	32	22	21	15

n=10; лечение внутривенное; V₀ и V_t – средний объем с ДИ.

Таким образом, при исследовании *in vivo* биологической активности созданной субстанции рекомбинантных антител против онкоантигена HER2 показало наличие выраженной специфической активности в виде торможения роста ксенографтов HER2⁺ опухолей человека на модели линий клеток SK-BR-3.

Заключение

На данном этапе развития исследований в области терапевтического применения моноклональных антител становится ясно, что наиболее перспективным лекарственным агентом будут полноразмерные гуманизированные или человеческие антитела, производимые биотехнологическими способами. В отличие от различных вариантов «коротких» и мини-антител полноразмерные антитела обладают полным спектром активностей, включая взаимодействие с иммунной системой организма, что значительно увеличивает их терапевтическую ценность.

Наши результаты показывают, что для получения рекомбинантных антител из *N. benthamiana* с успехом применена методика транзientной экспрессии белка в ткани листа растения. Использование в транзientной системе вирусных векторов демонстрирует высокий потенциал для быстрой наработки полноразмерных антител. Растения, как биопродукты, обладают схожей с человеческими клетками структурой мембран и секреторными путями. Гликозилирование белков в растительных и

животных клетках имеет некоторые различия. Однако эти различия незначительны и, как показывают наши исследования и результаты других исследовательских групп, не влияют на биологическую активность получаемой субстанции.

Фитотрастузумаб и трастузумаб имеют схожие антипролиферативные свойства в отношении клеток РМЖ с гиперэкспрессией HER2 *in vitro*. Более того, очищенный фитотрастузумаб распознает HER2/неи на поверхности клеток SK-BR-3 так же, как и трастузумаб.

Трастузумаб представляет собой гуманизированное мышечное антитело 4D5, которое связывается с доменом IV рецепторов HER2. Точные механизмы взаимодействия трастузумаба с рецептором, а также механизмы появления устойчивости до сих пор изучены плохо. Недавние исследования показали, что трастузумаб не снижает фосфорилирование HER2. Эта способность может обуславливать лекарственную резистентность, неизбежно возникающую у пациентов, которым назначали монотерапию трастузумабом [8].

Фитотрастузумаб эффективно тормозит рост ксенотрансплантата клеток SK-BR-3 рака молочной железы с гиперэкспрессией HER2. Фитотрастузумаб оказался несколько более эффективным в подавлении опухолевого роста, чем трастузумаб. Причина данного эффекта пока остается неясной. Необходимы дополнительные исследования для доказательства того, что фитотрастузумаб и трастузумаб полностью идентичны по аминокислотному составу, гликозилированию и ADCC.

Литература

1. Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Соколова З.А., Косоруков В.С. Разработка липосомальной конструкции, содержащей лизат опухолевых клеток // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 5.
2. Зангиева М.Т., Игнатьева Е.В., Косоруков В.С. Оценка эффективности включения доксорубина в иммунолипосомы, направленные против HER2 рецептора // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 31.
3. Соколова Т.М., Кособокова Е.Н., Шувалов А.Н. и др. Активность генов системы интерферона в клетках аденокарциномы толстого кишечника НСТ-116: регуляция рекомбинантными интерферонами-альфа-2 из бактериальных и растительных продуцентов // Российский биотерапевтический журнал. –

2013. – Т. 12. – № 3. – С. 39–44.
4. *Трецулина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др.* Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. – В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/под общей ред. член–корр.РАМН проф. Р.У.Хабриева.–2 изд., перераб. и доп. – М.: ОАО изд. «Медицина», 2005. – С. 637–51.
 5. *Arntzen C.J.* Using tobacco to treat cancer // *Science*. – 2008. – 321. – P. 1052–3.
 6. *De Muynck B., Navarre C., Boutry M.* Production of antibodies in plants: status after twenty years // *Plant Biotechnol J*. – 2010. – P. 529–63.
 7. *Galeffi P., Lombardi A., Donato MD. et al.* Expression of single–chain antibodies in transgenic plants // *Vaccine*. – 2005. – 15. – P. 1823–7.
 8. *Gijssen M., King P., Perera T. et al.* HER2 phosphorylation is maintained by a PKB negative feedback loop in response to anti–HER2 Herceptin in breast cancer // *PLoS Biol*. – 2010. – 8(12). – e1000563.
 9. *Giritch A., Marillonnet S., Engler C. et al.* Rapid high–yield expression of full–size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2006. – 103. – P. 14701–6.
 10. *Hudis C.A.* Trastuzumab–mechanism of action and use in clinical practice // *N Engl J Med*. – 2007. – 357 – P. 39–51.
 11. *Hudziak R.M., Lewis G.D., Winget M. et al.* p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor // *Mol Cell Biol*. – 1989. – 3. – P. 1165–72.
 12. *Ko K., Steplewski Z., Glogowska M., Koprowski H.* Inhibition of tumor growth by plant–derived mAb // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2005. – 102. – P. 7026–30.
 13. *Komarova T.V., Baschieri S., Donini M. et al.* Transient expression systems for plant–derived biopharmaceuticals // *Expert Rev Vaccines*. – 2010. – 9. – P. 859–76.
 14. *Komarova T.V., Kosorukov V.S., Frolova O.Y. et al.* Plant–Made Trastuzumab (Herceptin) Inhibits HER2/Neu+ Cell Proliferation and Retards Tumor Growth // *PLoS ONE*. – 2011. – 6. – Iss. 3. – e17541.
 15. *Lai H., Engle M., Fuchs A. et al.* Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats West Nile virus infection in mice // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2010. – 107. – P. 2419–24.
 16. *Lie'nard D., Sourrouille C., Gomord V., Faye L.* Pharming and transgenic plants // *Biotechnol Annu Rev*. – 2007. – 13. – P. 115–47.
 17. *Ma J.K – C.* The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants // *Nat. Rev. Genet*. – 2003. – 4. – P. 794–805.
 18. *McCormick A.A., Reddy S., Reinl S.J., Cameron T.I., Czerwinski D.K., et al.* Plant–produced idiotype vaccines for the treatment of non–Hodgkin's lymphoma: safety and immunogenicity in a phase I clinical study // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2008. – 105. – P. 10131–6.
 19. *Mett V., Farrance C.E., Green B.J., Yusibov V.* Plants as biofactories // *Biologicals*. – 2008. – 36. – P. 354–8.
 20. *Pegram M., Hsu S., Lewis G. et al.* Inhibitory effects of combinations of HER–2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers // *Oncogene*. – 1999. – 18. – P. 2241–51.
 21. *Piccart–Gebhart M.J., Procter M., Leyland–Jones B. et al.* Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2–positive breast cancer // *N Engl J Med*. – 2005. – 353. – P. 1659–72.
 22. *Pujol M., Gavalondo J., Ayala M. et al.* Fighting cancer with plant–expressed pharmaceuticals // *Trends Biotechnol*. – 2007. – 10. –P. 455–9.

23. *Raskin I., Ribnicky D.M., Komarnytsky S. et al.* Plants and human health in the twenty-first century // Trends Biotechnol. – 2002. – 20. – P. 522–31.
24. *Semenyuk E.G., Stremovskiy O.A., Edelweiss E.F. et al.* Expression of single-chain antibody-barstar fusion in plants // Biochimie. –2007. – 89. – P. 31–8.
25. *Slamon D.J., Leyland-Jones B., Shak S. et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2 // N Engl J Med. – 2001. – 344. – P. 783–92.