

УДК: 57.084.1.578.74

Инновационные вакцины против опасных вирусных заболеваний

Саляев Р. К., Рекославская Н. И., Столбиков А. С., Третьякова А. В.

В статье приводятся результаты создания растительных кандидатных мукозальных вакцин орального применения. В качестве примера приводятся данные о создании вакцин против ВИЧ-1/СПИДа, гепатита В и цервикального рака на основе трансгенных растений томата. Представлены данные об индукции иммунного ответа у мышей после вакцинации высушенными плодами трансгенного томата, содержащих антигенные белки TBI-HBS, PreS2-S и HPV16 L1.

Ключевые слова: трансгенный томат, кандидатные мукозальные вакцины, TBI-HBS, PreS2-S, HPV16 L1, иммунный антительный ответ

Innovation vaccines against dangerous viral diseases

Salyaev R. K., Rekoslavskaya N. I., Stolbikov A. S., Tretyakova A. V.

The experience of the development of candidate mucosal plant-made vaccines of oral administration. As an example the data about the development of vaccines against HIV-1/AIDS, hepatitis B and cervical cancer are considered in the paper. Results of the induction of immune responses in mice after the vaccination with dried fruits of transgenic tomato plants containing antigenic proteins TBI-HBS, PreS2-S and HPV16 L1 are reported.

Key words: transgenic tomato, candidate mucosal vaccines, TBI-HBS, PreS2-S, HPV16 L1, immune antibody response

Введение

В 1892 г. Д. И. Ивановский со своим помощником Половцевым сообщили о существовании нового патогена, вызывающего мозаичную болезнь растений табака, которая приносила огромный вред сельскому хозяйству. Этот патоген в отличие от бактерий и грибов проходил через фарфоровый фильтр и ассамблировался в кристаллы. Используя методику Ивановского, несколько

позднее, в 1898 г. Лёфлер и Фрош установили фильтрующуюся природу возбудителя тяжелой болезни животных — ящура, который к тому же передавался людям.

Таким образом, Д. И. Ивановский открыл целую эпоху и дал начало новой исключительно важной отрасли — вирусологии, которая и по сей день является одной из наиболее интересных и продуктивных отраслей науки.

Двадцатый век явился периодом открытия большого количества вирусов, являющихся возбудителями многих опасных инфекционных заболеваний человека и животных. Одновременно началась активная работа по созданию вакцин против опасных вирусных заболеваний. Были созданы вакцины против полиомиелита, оспы, свинки, краснухи, ветрянки, вируса желтой лихорадки, ротавируса, некоторых форм инфлуэнцы, бешенства, кори и ряда других опасных заболеваний.

Благодаря успехам генной инженерии в конце 80-х годов стало возможным создание генетических конструкций, способных экспрессировать ключевые субъединичные вирусные белки в рекомбинантной форме, что дало возможность использовать эти белки как вакцинные антигены из поверхностных субъединичных белков оболочки вирусов. Этот подход представлялся более безопасным и привёл к счастливому прецеденту — созданию вакцины, основанной на поверхностном антигене S субъединичного белка оболочки вируса гепатита В (HBS), позволяющей успешно бороться с этим опасным инфекционным заболеванием [8].

Около 20 лет назад было осуществлено клонирование индивидуальных генов больного раком человека, кодирующих антигены, ассоциированные с опухолевым образованием, которые распознавались Т-лимфоцитами, и это открыло путь для создания терапевтических противораковых вакцин. Смысл этих вакцин состоял в том, чтобы усилить природные противоопухолевые иммунные ответы и амплифицировать антигенспецифические Т-лимфоциты, способные распознавать и устранять остаточные или метастатические опухолевые клетки. Данная терапевтическая вакцина была создана на основе растений трансгенного табака, в которые вводили соответствующие гены, кодирующие синтез антигенных белков [3, 12]. Но стоимость такой разработки оказалась очень высокой, что сильно ограничило её применение.

В перспективе рекомбинантные вакцины будут иметь большое значение как для человека, так и для животных, но пока их применение ограничивает высокая стоимость.

Применение съедобных (оральных) вакцин на основе трансгенных растений было предложено в 1983 году для альтернативного безыгольного вакцинирования детей от вируса гепатита В. С той поры этот подход успешно развивался, и в настоящее время разработаны сотни кандидатных вакцин против различных вирусных и бактериальных инфекций. Оральные (мукозальные) вакцины на основе трансгенных растений против бешенства, гепатита В и ряда других вирусов в настоящее время проходят доклинические и клинические испытания [12].

Успешному созданию вакцин на основе трансгенных растений существенным образом способствовал мировой опыт генно-инженерных работ с конструированием экспрессивных кассет генов, успехи клеточной инженерии и разработка методов культивирования тканей и органов растений. Разрабатывались как минимум 4 платформы создания трансгенных растений для продуцирования антигенных белков вирусов.

1. Первая платформа, ставшая уже классической, создавалась на основе ядерной трансформации, обеспечиваемой агробактерией *Agrobacterium tumefaciens*. Трансгенные растения, получаемые этим способом, отличались стабильной экспрессией и наследованием в поколениях способности к синтезу антигенных белков. Недостатком с точки зрения коммерциализации явился невысокий выход антигенных белков примерно в пределах 0,001—0,01 % в пересчете на единицу общего растворимого белка (ОРБ).

2. Альтернативой этому способу было формирование платформы для продуцирования антигенных белков с помощью технологии создания рекомбинантных вирусных частиц растений, благодаря их эффективной трансляции и возможности накапливать целевой антигенный белок в пределах до 1—10 % от ОРБ [7]. Однако нестабильность вирусных конструкций, а также невозможность наследования способности к синтезу антигенных белков в поколениях явились ограничением развития данного способа.

3. Значительный успех был достигнут при изучении и разработке способов трансформации на основе получения гомоплазменно пластидных трансгенных растений. Эта методика позволила резко повысить эффективность продуцирования антигенных белков, поскольку была использована система белкового синтеза, содержащихся в больших количествах в клетках растений. В основе резкого повышения продуцирования оказалась высокая копияность трансгенов в пластидах, так как при гомоплазменной трансформации копияность может достигать 10000 копий на клетку [2, 3]. Количество про-

дуцируемого антигенного белка достигало в отдельных работах до 50 % в расчете на ОРБ. Наличие в пластидах двух типов РНК-полимераз, собственно пластидной и ядерной (фаговой природы), обеспечивает наследование в поколениях способности к синтезу трансгенов [10]. Однако трудоемкость данного способа и необходимость использования дорогостоящего оборудования и длительность работ при получении гомоплазменно пластидных растений снижали широкое распространение этого метода и его коммерциализацию.

4. Следующая платформа получения растений-продуцентов антигенных белков — комбинированная система, включающая способ инсерции трансгенов путем агробактериальной трансформации, а также усиление транскрипции и трансляции путем использования регуляторных элементов простых ретровирусов и вирусов растений с ДНК геномами. Ключевым компонентом данного подхода является введение в генетические конструкции последовательностей, кодирующих синтез РНК-зависимой РНК-полимеразы (репликазы), которая, работая по типу репликации вирусных частиц, обеспечивает более высокий выход антигенного белка.

Существенным компонентом данной платформы является также включение нуклеотидной последовательности, кодирующей белки-антисайленсеры или суперсупрессоры РНК-интерференции, которая активируется в результате инфекции растений вирусами. Данный способ трансформации позволяет получать антигенный белок в количествах 1—10 мг на кг сырой массы листьев [7].

Для вакцин будущего трансгенные растения представляют весьма перспективную экспрессивную систему благодаря тому, что сами трансгенные растения можно использовать как пероральную рекомбинантную вакцину мукозального действия.

В последние 10—15 лет было создано довольно много эффективных экспрессивных систем на основе трансгенных растений, которые сейчас рассматривают как фундамент для крупномасштабного производства не только вакцин, но и других рекомбинантных белков [11].

Предпосылками к этому стали следующие преимущества растительных экспрессивных систем:

1) растения способны выполнять посттрансляционные модификации подобно другим высшим эукариотам, например, фолдинг (правильную укладку первичных полипептидных цепей), ассамблирование мономерных субъединиц в комплексные структуры, котрансляционное гликозилирование и другие

более естественные для человека процессы по сравнению с иными экспрессивными системами (микроорганизмами, культурами клеток насекомых и животных);

2) растения можно перевести на крупномасштабное производство без затраты больших капитальных вложений и перейти к производству промышленных количеств вакцин перорального действия;

3) растения обеспечивают пониженную стоимость первичного материала для получения мукозальных вакцин;

4) растения представляют более безопасную для человека экспрессивную систему, так как не несут патогенных для человека вирусов и других микроорганизмов;

5) растения могут обеспечить экспрессию нескольких антигенов, что дает возможность создания поливалентных мукозальных вакцин с экспрессируемыми антигенами, индуцирующими синтез нейтрализующих антител широкого спектра к ряду опасных инфекционных заболеваний;

6) что касается непосредственно мукозальных вакцин перорального применения на основе трансгенных растений, такие вакцины не нуждаются в «холодовой цепи» при транспортировке к местам вспышки заболеваний и очагам эпидемий, нет необходимости в организации специальных инфраструктур и центров вакцинации с квалифицированным персоналом, нет нужды в одноразовых шприцах и иглах;

7) мукозальные вакцины на основе трансгенных растений способны индуцировать как мукозальный иммунный ответ, так и общий гуморальный иммунный ответ у вакцинируемых организмов. Более того, в растениях часто присутствуют природные адъюванты — вещества, значительно усиливающие иммунный ответ при вакцинации;

8) клеточные стенки растительных вакцин частично предохраняют антигенные белки от действия ферментов желудочного сока. Поэтому вакцинный материал с малыми потерями продвигается в кишечник и взаимодействует с Пейеровыми бляшками — специальными структурами, взаимодействующими с антигенами, иницирующими мукозальный, а затем и общий иммунный ответ.

Механизм иммунизации съедобными (мукозальными) вакцинами на основе трансгенных растений основан на антигенпредставляющей способности перитонеальных макрофагов тонкого кишечника. В кишечнике антигенный белок, обладающий иммуногенными свойствами, распознается компонентами специальных М-клеток, которые широко представлены в слое тканей, называемых *lamina propria*, под слизистой эпителия. М-клетки лимфоидных образований тонкого кишечника (Пейеровых бляшек), а также дендритные клетки транспортируют захваченный антиген к перитонеальным макрофагам

и В-лимфоцитам, находящимся в этих слоях. В результате презентации антигена на поверхности антиген-представляющих клеток происходит активация Т-лимфоцитов-хелперов, которые в сочетании с антигеном активируют В-лимфоциты. Активированные В-клетки выходят из лимфоидных тканей слизистой оболочки и поступают через общую циркуляцию лимфы в мезентеральные лимфатические узлы, где происходит их созревание, которое выражается в способности к синтезу специфических к антигену антител. Эти клетки способны снова мигрировать к слизистым оболочкам желудочно-кишечного тракта, дыхательных путей, мочеполового, слезного трактов, а также конъюнктивы век. Секреторные иммуноглобулины IgA транспортируются на поверхность слизистых оболочек, где они связываются с вирусными частицами и препятствуют их проникновению в организм [6, 13].

Опыт разработки кандидатных мукозальных вакцин против ВИЧ/СПИДа, гепатита В и папилломавируса при использовании антигенных белков TBI-HBS, PreS2-S и HPV16 L1

Разработку кандидатных вакцин против ВИЧ-1/СПИДа и гепатита В проводили совместно с ГНЦ ВБ «Вектор» (Роспотребнадзор), Института химической биологии и экспериментальной медицины СО РАН и Лабораторией патологии растений ARS (Maryland, США).

Для получения кандидатной мукозальной вакцины против ВИЧ/СПИДа создавалась генетическая конструкция гибридного гена *TBI-HBS*. *TBI* является нуклеотидной последовательностью, кодирующей синтетический полипептид, составленный из 9 иммуногенных эпитопов белков оболочки ВИЧ-1 Env (gp120) и нуклеокапсида Gag (gp24), то есть 6 эпитопов гена *env* и 3 эпитопов гена *gag* являлись индукторами иммуногенности Т и В лимфоцитов, которые могли обеспечить синтез нейтрализующих антител против ВИЧ-1/СПИДа. Вторая часть синтетического гена — *HBS*, представляла собой фрагмент из 226 п. н. гена *S* вируса гепатита В, который кодировал основной поверхностный антигенный белок HBS оболочки вируса гепатита В (HBV) с кодонами, адаптированными к человеку [15].

Генетическая конструкция, содержащая химерный ген *TBI-HBS* под контролем промотора *p35S* и селективный ген *nptII* под промотором *pUbi3* кукурузы в агробактериальном векторе *pBINPLUS/ARS*, была помещена в *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, в которой она клонировалась и использовалась для трансформации растений томата. Примерно 2000 эксплантов томата сорта Вентура было трансформировано в асептических условиях. Экспланты подвергали селекции на среде Мурасиге и Скуга с добавлением 50—100 мг/л

канамицина. Отобранные экспланты проверяли на наличие целевого гена *TBI-HBS* с помощью ПЦР, нозерн и саузерн гибридизаций и использовали для выращивания трансгенных растений до плодов. В плодах определяли наличие антигенных белков TBI и HBS с помощью мультиплексной ПЦР, нозерн и саузерн дот блоттингов.

Количество антигенных белков TBI и HBS в плодах 7 семенных поколений определяли иммуноферментными методами, используя для этого соответствующие наборы для тестирования фирм «Вектор Бест» (Россия) и BIO-RAD (США).

Содержание антигенного белка TBI-HBS составляло в плодах первичных трансформантов примерно 4—5 нг/мг общего растворимого белка (ОРБ). После селекции и отбора линий трансгенных растений в последующих 6 поколениях количество антигенного белка TBI-HBS не уменьшалось, а возрастало и было в пределах 12—26 нг/мг ОРБ [13, 14, 15].

Трансгенные плоды лиофильно высушивали и использовали для анализа иммунного ответа у мышей при их пероральной вакцинации, при этом каждую мышь вакцинировали дозой по 500 мг (как минимум 10 мкг TBI-HBS на мг ОРБ) три раза с интервалом 10 суток, 20 суток и 30 суток. Для анализа мукозального иммунного ответа собирали фекалии от каждой мыши индивидуально, гомогенизировали в буфере HEPES, pH 7,4, центрифугировали и использовали для ИФА (рисунок 1).

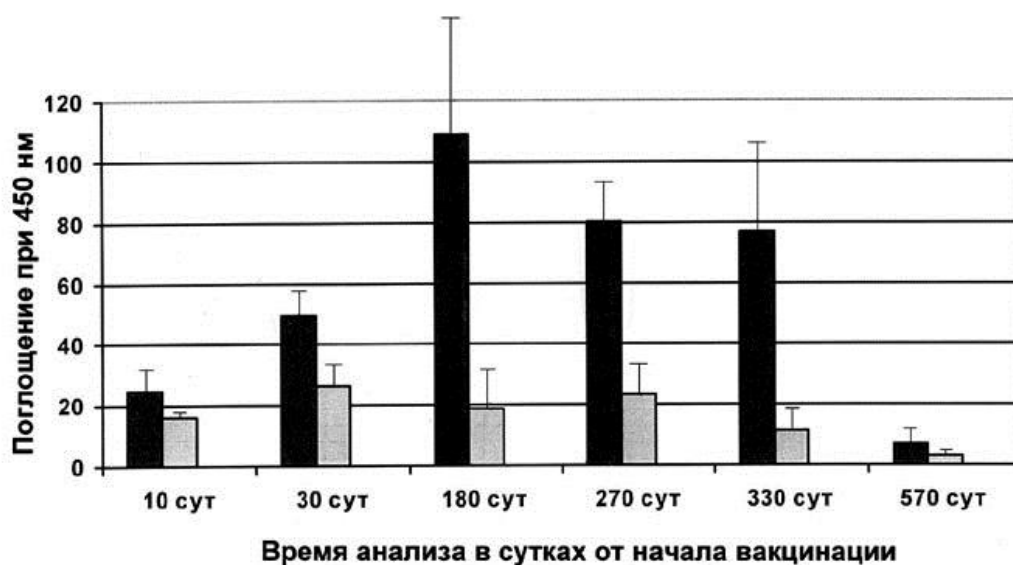


Рисунок 1 — Динамика мукозального антительного ответа в фекалиях мышей, вакцинированных геном *TBI-HBS*. Темные столбцы — экстракты фекалий вакцинированных мышей, светлые столбцы — экстракты фекалий контрольных мышей

Мукозальный иммунный ответ обнаружили в фекалиях уже через 10 суток после вакцинирования. Этот ответ продолжал увеличиваться к 30 суткам, а максимальный уровень был достигнут на 180 сутки. В период до 330 суток содержание антител поддерживалось на высоком уровне с некоторой тенденцией к понижению. Но к 570 суткам количество антител резко упало.

Антитела к антигенному белку gp24 (ВИЧ-1) обнаружили и в экстрактах фекалий с помощью вестерн блота, используя набор NEW LAV BLOT 1 (BIORAD, США).

Таким образом, можно полагать, что после трехкратной вакцинации практически в течение года у мышей поддерживался высокий иммунный ответ к TBI-HBS.

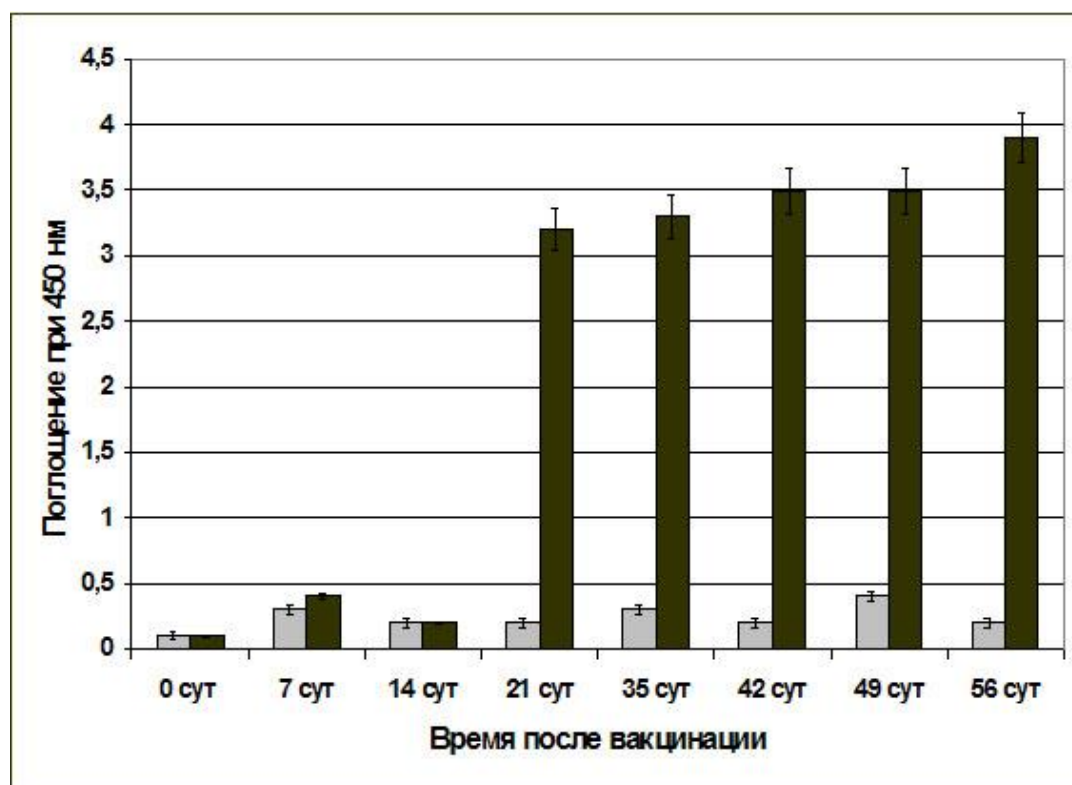


Рисунок 2 — Динамика антительного ответа в сыворотке крови мышей, вакцинированных геном TBI-HBS (темные столбцы) и в контроле (светлые столбцы)

На рисунке 2 представлена динамика антительного ответа в сыворотке крови у мышей, вакцинированных TBI-HBS. Можно видеть, что уже после 14 суток после вакцинирования начинается увеличение содержания антител. В последующие 21—56 суток содержание антител поддерживается на высоком уровне, продолжая тенденцию к повышению.

Таким образом, созданная нашим коллективом бинарная кандидатная вакцина одновременно против ВИЧ/СПИДа и гепатита В на основе химерного синтетического гена *TBI-HBS* при оральной вакцинации мышей была способна индуцировать как мукозальный (в фекалиях), так и общий гуморальный иммунные ответы.

Вторая кандидатная вакцина была нами создана против гепатита В на основе антигенного белка оболочки вируса гепатита В. Ген *preS2-S* был помещен под р35S промотор и введен в агробактериальный вектор рBINPLUS/ARS. Плазмиду поместили в штамм *A.tumefaciens* LBA4404 и клонировали на среде YPD с 50—100 мг/л канамицина.

Получены трансгенные по гену *preS2-S* растения, в листьях и плодах которых обнаружен поверхностный антиген белка оболочки HBS ВГВ с помощью методов ПЦР и RT-ПЦР.

Плоды трансгенных по гену *preS2-S* растений поколения T₃ лиофильно высушивали и определяли иммуноферментным анализом количество антигенного белка HBS в плодах томата.

Таким образом, был изготовлен сухой образец кандидатной вакцины на основе плодов трансгенного по гену *preS2-S* томата, с количеством антигенного белка 236 нг/мг ОРБ, то есть около 0,01 % ОРБ, что делало возможным проведение испытания индукции иммунного ответа на мышах.

Леофильно высушенный вакцинный материал скармливали мышам в расчёте 500 мг массы плода на 1 мышь. Всего в анализе использовали 80 мышей, которые трехкратно вакцинировали.

Через 1, 7, 30, 45, 69, 80 и 110 суток анализировали присутствие антител к HBS в сыворотке крови вакцинированных и контрольных мышей (рисунок 3), а через 30, 69 и 110 суток проводили анализ антител к HBS в фекалиях (рисунок 4).

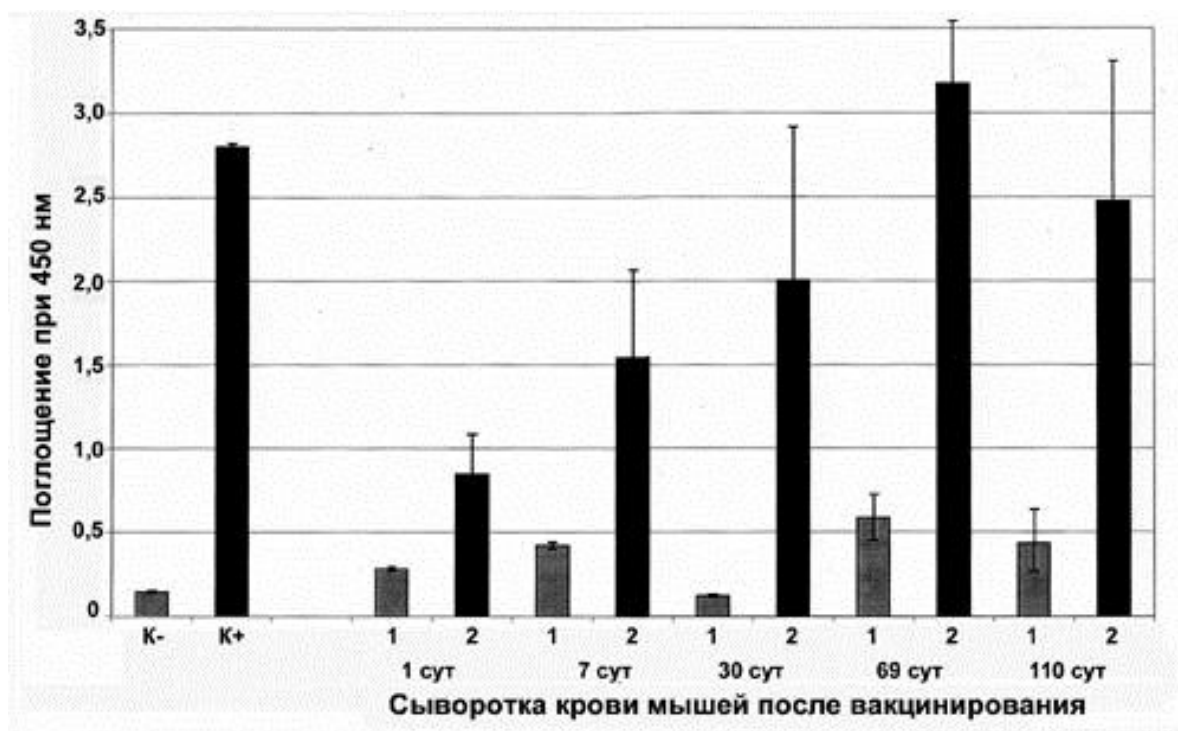


Рисунок 3 — ИФА присутствия антител к HBS в сыворотке крови у опытных мышей и в контроле. K- — отрицательный контроль, K+ — положительный контроль (2 пг HBS в 100 мкл образца антитела), 1 — сыворотка крови контрольных мышей, 2 — сыворотка крови опытных мышей

При изучении динамики содержания антител к HBS (рисунок 3) уже через 1 сутки уровень антител в крови мышей увеличивался, через 7 суток и 30 суток содержание его возрастало, а максимальное значение обнаруживалось через 69 суток после вакцинации. Через 110 суток наблюдалась небольшая тенденция к снижению содержания антител.

В фекалиях вакцинированных мышей также обнаруживались антитела к HBS, содержание которых увеличивалось на 69 сутки и было максимальным к 110 суткам (рисунок 4).

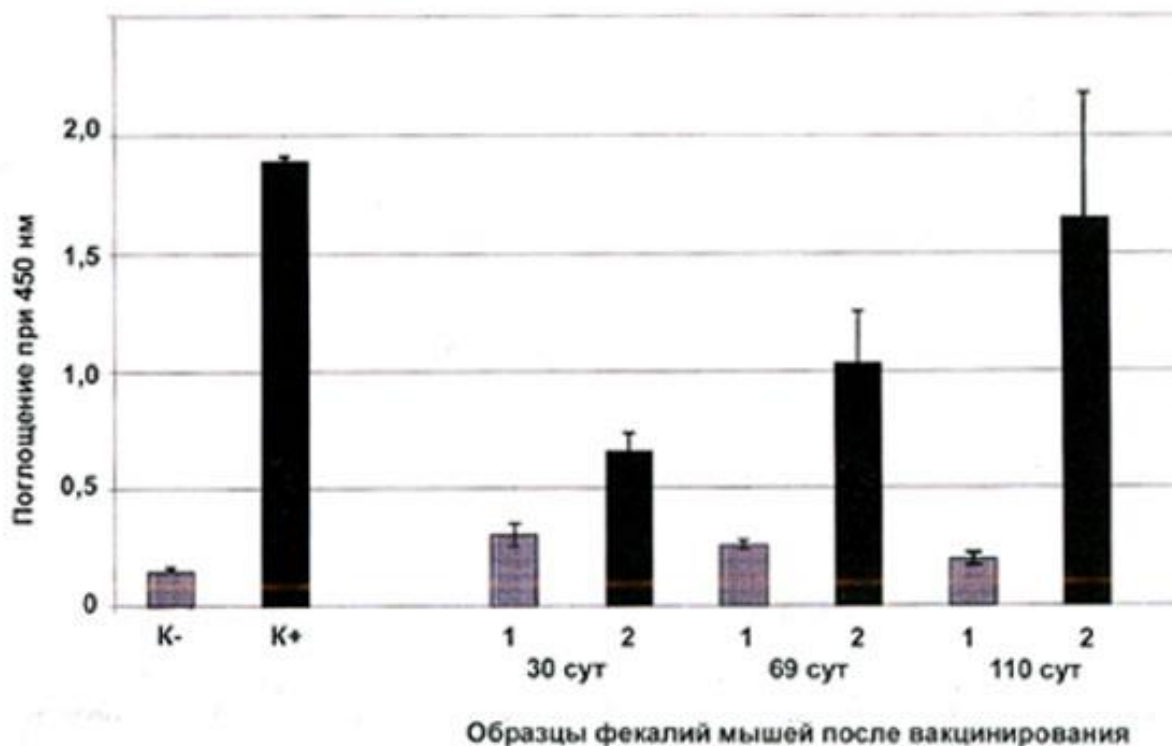


Рисунок 4 — Иммуноферментный анализ присутствия антител к HBS в фекалиях мышей после вакцинирования. K- — отрицательный контроль, K+ — положительный контроль (0,5 нг HBS в 100 мкл образца), 1 — фекалии контрольных мышей, 2 — фекалии опытных мышей на 30, 69 и 110 сутки после приёма вакцины, соответственно

Таким образом, после приёма кандидатной съедобной вакцины на основе плодов томата с геном *preS2-S* в сыворотке крови и фекалиях мышей синтезировались антитела к основному антигенному белку HBS ВГВ и обнаруживались в количествах, сопоставимых со стандартными положительными сыворотками с антителами к вирусу гепатита В.

В настоящее время ведется работа по созданию кандидатной вакцины против цервикального рака на основе позднего белка оболочки папиллома-вируса наиболее онкогенного типа HPV16 L1.

Нами разработан дизайн и создана генетическая конструкция, в которую ген оболочки HPV16 L1 помещен под р35S промотор, в конструкцию введен также омега лидер вируса табачной мозаики (ВТМ), позволяющий усилить трансляцию целевого белка [1, 4].

Первые результаты определения количества антигенного белка L1 показали, что в плодах томата присутствует антиген L1 в количестве 287 нг/мг ОРБ.

Лиофилизированный вакцинный материал плодов использовали для пероральной вакцинации мышей в количестве 500 мг на мышь.

Из рисунка 5 видно, что у мышей наблюдается четкий антительный ответ, причем у всех мышей, подвергнутых вакцинации.

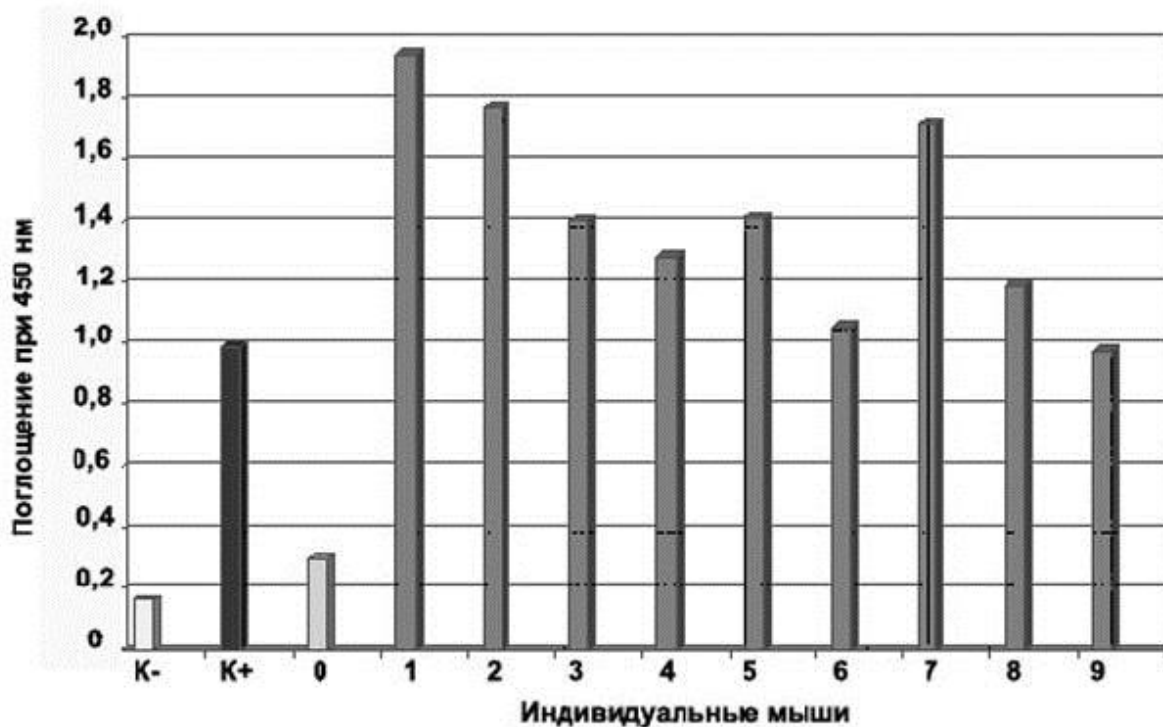


Рисунок 5 — Иммуноферментный анализ антительного ответа в сыворотке крови мышей, вакцинированных материалом плодов с антигенным белком HPV16 L1. K- — отрицательный контроль, K+ — положительный контроль. 0 — контроль без вакцинирования, 1—9 — вакцинированные мыши

Таким образом, первые результаты испытания иммуногенности полученного вакцинного материала открывают возможность дальнейшей работы над созданием кандидатной мукозальной вакцины против цервикального рака.

Выводы

Исходя из анализа литературных данных и результатов собственных исследований, можно сделать вывод о том, что вакцины на основе трансгенных растений, активно разрабатываемые в последние 15—20 лет, имеют ряд существенных преимуществ перед традиционными вакцинами. Они, в отличие от бактериальных, бакуловиральных и дрожжевых экспрессивных систем, способны к посттрансляционным модификациям по типу высших эукариот,

что значительно ближе к человеческому организму и уменьшает вероятность возникновения побочных эффектов после вакцинации.

Растительные мукозальные вакцины способны индуцировать как мукозальный, так и гуморальный иммунные ответы, более безопасны, так как не имеют общих с человеком патогенов. Они не нуждаются в «холодной цепи» при транспортировке и хранении, обещают быть более дешевыми в производстве и, будучи пероральными, упрощают сам процесс вакцинации.

Для активизации промышленного производства мукозальных вакцин на основе растений необходима дальнейшая работа над увеличением содержания антигенных белков в вакцинном материале. Для этого можно использовать спектр регуляторных элементов, усиливающих трансляцию, в частности, IRES (система внутренней посадки рибосом), а также трансляционные энхансеры, например, типа омега ВТМ и ряда других. При разработке вакцин желательно избегать применения селективных генов устойчивости к антибиотикам (можно, например, вместо них использовать гены устойчивости к гербицидам).

Перспективным направлением являются разрабатываемые в последние годы проекты создания так называемых терапевтических вакцин против папилломавирусов на основе генов HPV16 E6, HPV16 E7 с участием гена HPV16 E2 [5, 9, 12].

Учитывая все сказанное, можно надеяться, что использование трансгенных растений для создания новых эффективных вакцин против опасных инфекций достаточно перспективно.

Литература

1. Biemelt, S., Sonnewald, U., Galmbacher, P., Willmitzer, L., Muller, M. Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants // *J. of Virol.*, 2003. — V. 77. — N. 17. — P. 9211 — 9220.
2. Cardi, T., Lenzi, P., Maliga, P. Chloroplasts as expression platforms for plant-produced vaccines // *Expert Rev. Vaccines*, 2010. — V. 9. — N. 8. — P. 893 — 911.
3. Daniell, H., Singh, N.D., Mason, H., Streatfield, S.J. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals // *Expert Rev. Vaccines*, 2010. — V. 9. — N. 8. — P. 669 — 679.

4. Gallie, R.D. The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F // *Nucleic Acid Research*, 2002. — V. 30. — N. 15. — P. 3401 — 3411.
5. Giorgi, C., Franconi, R., Rybicki, E.P. Human papillomavirus vaccines in plants // *Expert Rev. Vaccines*, 2010. — V. 9. — N. 8. — P. 913 — 924.
6. Kataoka, K., Fujihashi, K. Dendritic cell-targeting mucosal adjuvants for the development of mucosal vaccines // *Expert Rev. Vaccines*, 2009. — V. 8. — N. 9. — P. 1183 — 1193.
7. Komarova, T.V., Baschieri, S., Donini, M., Marusic, C., Benvenuto, E., Dorochoy, Yu. L. Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals // *Expert Rev. Vaccines*, 2010. — V. 9. — N. 8. — P. 859 — 876.
8. Kumar, G.B.S., Ganapathi, T.R., Bapat, V.A. Production of hepatitis B surface antigen in recombinant plant systems: an update // *Biotechnol. Prog.*, 2007. — V.23. — N 3. — P. 532 — 529.
9. Massa, S., Franconi, R., Brandi, R., Muller, A., Mett, V., Yusibov, V., Venuti, A. Anti-cancer activity of plant-produced HPV16 E7 vaccine // *Vaccine*, 2007. — V. 25. — P. 3018 — 3021.
10. McBride, K.E., Schaaf, D.J., Daley, M., Stalker, D.M. Controlled expression of plastid transgenes in plants based on a nuclear DNA-encoded and plastid-targeted T7 RNA polymerase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1994. — V. 91. — P. 7301 — 7305.
11. Poland, G., Barrett, A. The old and the new: successful vaccines of the 20th century and approaches to making vaccines for the important diseases of the 21st century: editorial overview // *Curr. Opin. Immunol.*, 2009. — V.21. — N 3. — P. 305 — 307.
12. Rybicki, E.P. Plant-produced vaccines: promise and reality // *Drug Discovery Today*, 2009. — V.14. — N ½. — P.16 — 24.
13. Salyaev, R.K., Rigano M.M., Rekoslavskaya, N.I. Development of plant-based mucosal vaccines against widespread infectious diseases // *Expert Rev. Vaccines*, 2010. — V. 9. — N. 8. — P. 937 — 946.
14. Salyaev, R.K., Rigano, M.M., Rekoslavskaya, N.I. Plant-made mucosal vaccines // *Plant-derived Vaccines: Technologies and Applications*. Ch.1. — *Future Medicine*, 2011. — P. 111 — 126. www.futuremedicine.com
15. Shchelkunov, S.N., Salyaev, R.K., Pozdnyakov, S.G., Rekoslavskaya, N.I. et al. Immunogenicity of a novel, bivalent, plant-based oral vaccines against hepatitis B and human immunodeficiency viruses // *Biotechnol. Lett.*, 2006. — V. 28. — N. 13. — P. 959 — 967.