

# ПОЛИПРЕНИЛФОСФАТЫ КАК АДЪЮВАНТЫ, ПОЛЯРИЗУЮЩИЕ ИММУННЫЙ ОТВЕТ В СТОРОНУ Th1

А.В. Пронин<sup>1</sup>, С.В. Ожерелков<sup>2</sup>, А.В. Деева<sup>1</sup>, А.В. Санин<sup>1</sup>,  
А.Н. Наровлянский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития РФ, Москва

<sup>2</sup>НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, Московская область

**Резюме.** Попытки снизить токсическое действие полного адъюванта Фрейнда привели к созданию новых эмульсионных адъювантных композиций. Чаще всего они основаны на метаболизируемом масле (сквалене) с добавлением в качестве эмульгатора Твина 80 (полисорбата 80). Третий компонент — иммуномодулятор. Адъюванты, предназначенные для профилактики вирусных инфекций, должны включать иммуномодуляторы, поляризирующие иммунный ответ в сторону Th1. Весьма перспективным с этой точки зрения адъювантным препаратом может быть приготовленный с помощью Твина 80 коллоидный раствор полипребнилфосфата из хвои пихты (фоспренил). Последний, как и сквален, построен из изопреновых звеньев, но имеет их не 6, а 16, что существенно снижает его токсичность. Полученные данные показывают, что фоспренил существенно усиливает эффективность вакцинации при таких вирусных инфекциях, как клещевой энцефалит, птичий грипп, полиомиелит и поляризует иммунный ответ в сторону Th1.

*Ключевые слова:* адъювант, полипребнолы, вирусные инфекции.

## POLYPRENYL PHOSPHATES AS ADJUVANTS, POLARIZING THE IMMUNE RESPONSE TO Th1

Pronin A.V., Ozherelkov S.V., Deyeva A.V., Sanin A.V., Narovljansky A.N.

**Abstract.** The attempts to decrease a toxic action of Freund complete adjuvant have led to development of new emulsion adjuvant compositions. More often they are based on metabolizable oil (squalene) with addition the Tween 80 (Polisorbate 80) as an emulsifier. The third component is an immunomodulator. Adjuvants, intended for prevention of virus infections, should include the immunomodulators polarizing the immune response to Th1. From this point of view adjuvant based on a colloidal solution prepared by means of the Tween 80 from polyprenyl phosphates of fir needles (Phosprenyl) can be rather perspective. The last one, as well as squalene, is constructed by isoprene links, but has them not 6, but 16 that essentially reduces its toxicity. The obtained data shows that Phosprenyl essentially enhances efficiency of vaccination in such virus infections as tick born encephalitis, bird flu, poliomyelitis and polarizes the immune response to Th1. (*Infekc. immunitet*, 2012, vol. 2, N 3, p. 645–650)

*Key words:* adjuvant, polyprenol, virus infections.

## Введение

Классические адъюванты могут включать в себя 3 компонента: масло, поверхностно-активное вещество (ПАВ) и иммуномодулятор. Последний особенно важен, поскольку, во-первых, именно он обеспечивает поляризацию иммунного ответа, а во-вторых, иммуномодуляторы могут применяться самостоятельно как

молекулярные адъюванты. Золотым стандартом адъюванта до сих пор считается полный адъювант Фрейнда (ПАФ), который вместе с тем приобрел славу наиболее реактогенного и поэтому не используется в вакцинах, предназначенных для человека. ПАФ рекомендуют применять только в исследовательских целях и, даже здесь, на его использование наложены определенные ограничения. Так ССАС (Canadian Council on

поступила в редакцию 23.05.2011  
отправлена на доработку 01.06.2011  
принята к печати 21.11.2011

© Пронин А.В. и соавт., 2012

### Адрес для переписки:

Пронин Александр Васильевич,  
д.м.н. профессор, зав. лабораторией  
естественного иммунитета  
ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи  
Минздравсоцразвития РФ

123098, Москва, ул. Гамалеи, 18.  
Тел.: (499) 190-58-51.  
Факс: (3812) 36-17-90.  
E-mail: proninalexander@yandex.ru

Animal Care — Канадский совет по уходу за животными) рекомендует избегать ПАФ, а если это невозможно, то использовать его только для первичной иммунизации. При этом он должен содержать не более 0,05–0,1 мг/мл микобактерий. В качестве замены ПАФ предложено уже более 100 различных композиций, которые еще не вошли в широкую практику из-за подчас высокой стоимости, сложности приготовления и/или токсических эффектов [12–15, 18].

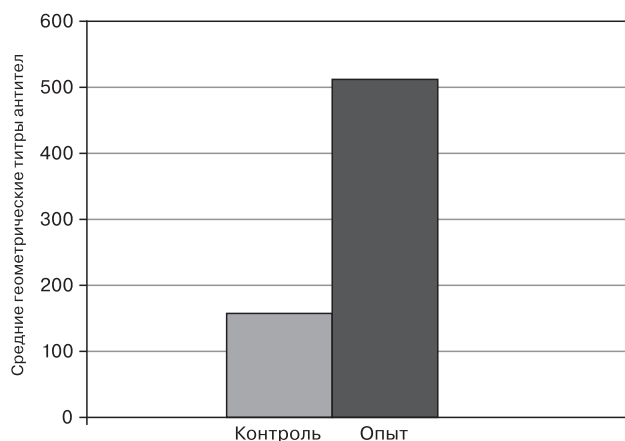
Как уже было отмечено выше, одним из основных компонентов адьюванта служит масло. В качестве метаболизируемого минерального масла довольно часто используют сквален — тритерпен, состоящий из 6 изопреновых звеньев или его насыщенный аналог сквалан. Они входят, например, в состав таких композиций как Montanide ISA, TiterMax, Ribi RAS, Syntex SAF. Сквален содержится в секрете сальных желез, а также в жире акульей печени и образуется путем димеризации фарнезилпирофосфата — промежуточного продукта метаболизма стероидов и тритерпеноидов [8, 10, 18].

В качестве ПАВ, второго основного компонента адьюванта, в состав перечисленных выше и многих других композиций часто включают твин-80 (полисорбат-80) [15, 18].

Цель настоящей работы — изучение адьювантных свойств полученных из хвои пихты фосфатов полипrenoлов (ППФ), которые, так же как и сквален, построены из изопреновых звеньев, но имеют более длинную цепь (16–18 изопреновых звеньев).

## Материалы и методы

**Животные.** Исследование проводили на мышах Balb/c обоего пола массой 14–16 г, кроликах породы «Шиншилла» массой 3 кг, полученных из питомника «Столбовая» РАМН, а также на цыплятах-бройлерах 40-дневного возраста и на кавказских овчарках одного помета в возрасте 3 лет массой 40–50 кг.



**Рисунок 1. Усиление ППФ иммунного ответа на антирабическую вакцину у собак**

**Полипренолфосфат натрия.** В работе использовали коммерческий препарат фоспренил производства ЗАО «Микро-плюс», представляющий собой 0,4%-й раствор фосфатов полипrenoлов пихты в комплексном растворителе, содержащем твин-80. Препарат вводили в дозе 0,05 мл (0,2 мг) на 1 кг массы.

**Вакцины.** Использовали коммерческую инактивированную вакцину против клещевого энцефалита и очищенную культуральную концентрированную антирабическую вакцину производства ФГУП «Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН», а также вакцину против гриппа птиц инактивированную эмульгированную (ФГУП «Покровский завод биопрепаратов») в дозе 0,5 мл/голову.

**Вирусы.** В работе использовали полученные из ФГУП Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) (вакцинный штамм Софьин, которым животных инфицировали внутрибрюшинно однократно в дозе  $10^3$  БОЕ, и штамм Абсеттаров, который использовали для разрешения после вакцинации и вводили внутрибрюшинно через 8 дней после третьей иммунизации в дозе 389 РЛД<sub>50</sub>), а также энтеровирусы ЕСНО 7 (штамм Wallase), ЕСНО 25 (штамм JV-4), ЕСНО 5 (штамм Noyse) и полиовирус типа 2 (штамм MEF-1).

**Цитокины.** Уровни IL-12, IL-4 и IFN $\gamma$  определяли в сыворотке крови мышей методом ИФА с помощью специальных наборов производства фирмы «R&D systems» (США).

Титры антител определяли с помощью РТГА и в реакции микронеutralизации. Оценку достоверности полученных данных осуществляли по критерию Стьюдента.

## Результаты

Опыты по исследованию ППФ как адьюванта вакцины против бешенства проведены на 6 кавказских овчарках одного помета, разделенных на 2 группы (опытную и контрольную). Животных контрольной группы иммунизировали в/м очищенной культуральной концентрированной антирабической вакциной (АРБ) в дозе 1 мл (контрольная группа). Собакам опытной группы одновременно с вакциной в/м вводили ППФ в дозе 2 мл (8 мг).

Исследование в РТГА антител против стандартного антигена вируса бешенства (штамм Внуково-32) через 14 суток после вакцинации показало (рис. 1), что ППФ в 3 раза увеличивает их средние геометрические титры.

Аналогичные данные были получены на кроликах, которых иммунизировали (2–4-кратно) энтеровирусами (табл.). В опытных группах при каждой иммунизации животным вводи-

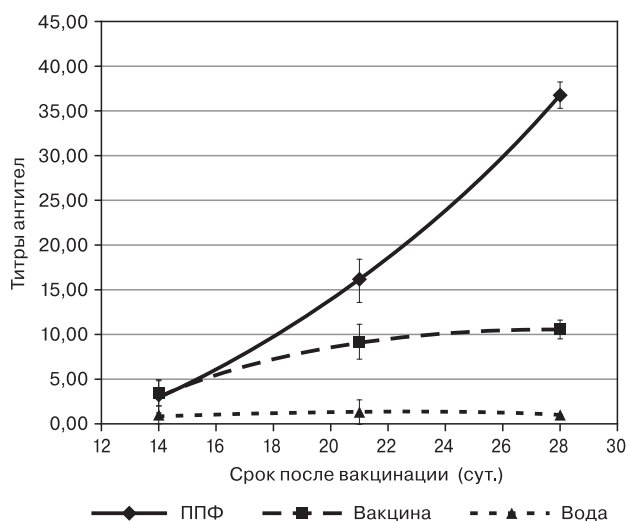
**ТАБЛИЦА. СТИМУЛЯЦИЯ ППФ СИНТЕЗА АНТИТЕЛ К ЭНТЕРОВИРУСАМ**

| Штаммы  | Титры нейтрализующих антител ( $\log_2$ ) |            |
|---------|---|------------|
|         | без ППФ                                   | с ППФ      |
| ЕСНО 7  | 10,07±0,22                                | 11,14±0,33 |
| ЕСНО 25 | 10,64±0,47                                | 11,64±0,47 |
| ЕСНО 5  | 10,75±0,21                                | 12,05±0,24 |
| Полио 2 | 11,17±0,2                                 | 12,44±0,14 |

ли ППФ. Через 5 суток после последней иммунизации сыворотки крови были исследованы на наличие специфических антител в реакции микронейтрализации по ЦПД в клетках RD против 30–300 ТЦД<sub>50</sub>/мл гомотипического вируса. Результаты показывают, что во всех случаях ППФ обеспечивал достоверное повышение титров антител.

При исследовании влияния ППФ на иммунный ответ к вирусу птичьего гриппа были сформированы три группы цыплят-бройлеров, включая одну контрольную и 2 опытных, по 5 голов в каждой. Вакцину инъецировали в соответствии с наставлением: в дозе 0,5 см<sup>3</sup>/гол., однократно, подкожно в среднюю треть шеи. Препарат ППФ в дозе 0,05 мл/кг вводили одновременно с вакциной, однократно, перорально. Напряженность поствакцинального иммунитета проверялась на 14, 21 и 28 день после вакцинации в РТГА. Через 28 суток после вакцинации вакцина должна вызывать не менее чем у 80% вакцинированных птиц накопление в крови антител к вирусу гриппа птиц в титре 1:16 (4,0  $\log_2$ ).

На рис. 2 представлена динамика накопления титров поствакцинальных гемагглютинирующих антител к вирусу H5N1, в контрольной и опытных группах после однократной вакци-

**Рисунок 2. Усиление ППФ иммунного ответа на вакцину против птичьего гриппа у бройлеров**

нации инактивированной вакциной. На 14-е сутки после введения вакцины титры антител были на одном и том же низком уровне во всех группах. На 21-е сутки после введения вакцины титры антител у кур, получавших вакцину с ППФ, достигли уровня защитных 1:16,0±1,27. При этом в группе, где куры получали только вакцину, титры на 21-е сутки после вакцинации были ниже защитных — 1:9,19±0,96. На 28-е сутки после введения вакцины средние титры антител у птиц, получавших только вакцину, были невысоки 1:10,6±1,04 и не достигли защитных. У птиц, получавших ППФ, положительная динамика нарастания титров сохранилась, титры составили 1:36,76±1,47. В результате, при применении ППФ защитные титры антител были достигнуты к 21-му дню после вакцинации, а к 28-му дню.

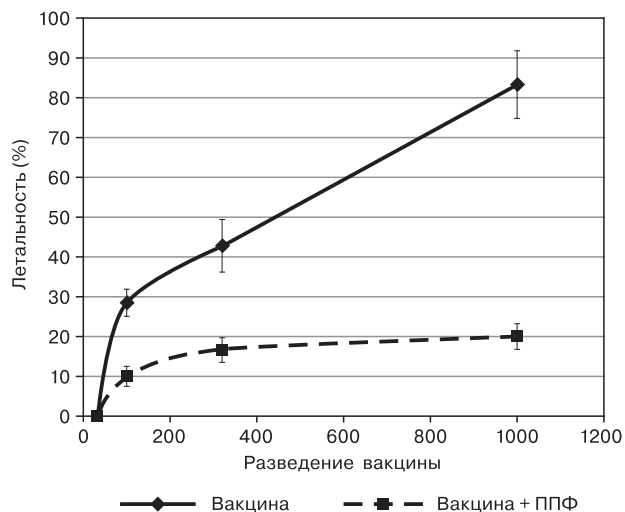
Оценку влияния ППФ на протективные свойства вакцин проводили на модели клещевого энцефалита у мышей. Адъювантное действие ППФ выявляли при непосредственном добавлении препарата в разведения вакцины против клещевого энцефалита (КЭ): 1:32, 1:100, 1:320 и 1:1000.

Опыты проводили по следующей схеме: контрольным животным вакцину вводили дважды под кожу в объеме 0,5 мл с интервалом в 1 неделю. Экспериментальным животным в те же сроки вводили вакцину, каждое из разведений которой содержало 100 мкг ППФ. Через 7 дней после вторичной вакцинации животных заражали вирусом КЭ (штамм Абсеттаров) внутрибрюшинно 100 LD<sub>50</sub>.

После заражения за мышами контрольной и опытной групп проводили ежедневное визуальное наблюдение в течение 3-х недель, регистрируя больных и павших животных. Затем по каждой группе животных рассчитывали показатель летальности — отношение павших мышей к общему количеству животных в группе (в %).

Полученные результаты представлены на рис. 3. Вакцина, разведенная в 32 раза, обеспечивала защиту 100% животных от инфекции независимо от дополнительного использования ППФ. Однако, уже с разведения 1:100 отмечена достоверная разница между контрольными и опытными животными, которая достигала максимальных значений при разведении вакцины 1:1000. В этом разведении вакцинация обеспечивала защиту менее 17% мышей, тогда как вакцина с ППФ защищала 80% животных.

С целью изучения влияния ППФ в норме и при экспериментальном КЭ у мышей на продукцию некоторых ключевых для этой вирусной инфекции цитокинов, методом ИФА были исследованы уровни IFN $\gamma$ , IL-4 и IL-12 в сыворотках крови мышей.



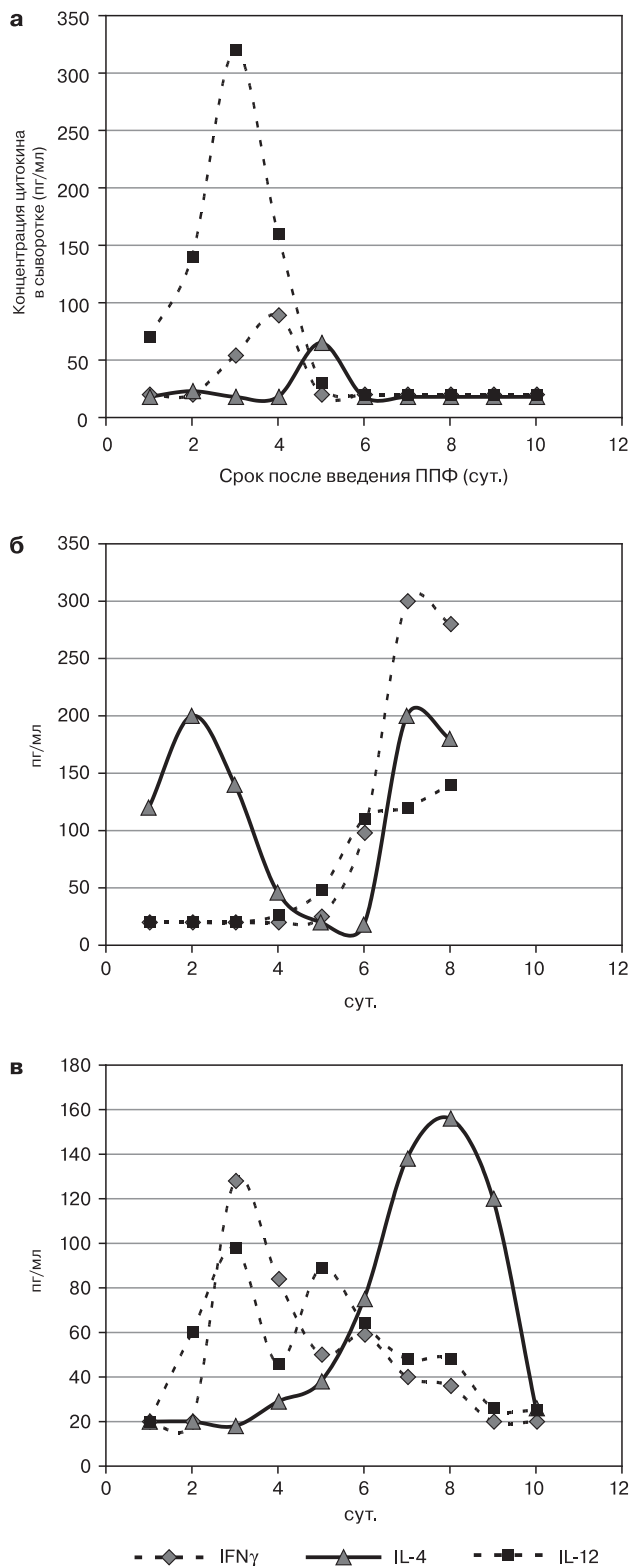
**Рисунок 3. Усиление ППФ защитного действия вакцины против клещевого энцефалита у мышей**

В эксперимент были включены 3 группы животных, которым: (1) однократно внутримышечно вводили ППФ в дозе 1 мг/кг; (2) однократно внутримышечно вводили ППФ в дозе 1 мг/кг и инокулировали вирус КЭ (штамм Софьин) в дозе  $10^3$  БОЕ; (3) инокулировали вирус КЭ (штамм Софьин) в дозе  $10^3$  БОЕ. Сыворотки всех 3-х изучаемых групп исследовали на 1–10 сутки после заражения ВКЭ и/или введения препарата в ИФА.

Данные, приведенные на рис. 4а, показывают, что у интактных (не инфицированных ВКЭ) мышей ППФ стимулирует выработку IL-12 на 2–4 сутки после введения препарата. При этом стимуляция продукции IFN $\gamma$  в сыворотках крови таких животных регистрируется на 3 и 4 сутки после введения ППФ. Повышение уровней IL-4 с сыворотках крови мышей наблюдали лишь на 5-е сутки после введения ППФ.

Иная картина наблюдалась при заражении животных ВКЭ без введения ППФ. Представленные данные (рис. 4б) показывают, что на фоне развития острого КЭ наблюдается стимуляция продукции IL-4 на 1–3 и 7–8 сутки. На 4-е и 5-е сутки уровни IL-4 снижаются, а уровни IFN $\gamma$  и IL-12, напротив, возрастают. Значительная стимуляция продукции IFN $\gamma$  и IL-12 регистрируется на 7–8-е сутки после введения вируса (в период проявления клинических признаков КЭ).

У зараженных вирусом КЭ и обработанных ППФ мышей (рис. 4в) значительная стимуляция IFN $\gamma$  и IL-12 наблюдается уже на 2–4-е сутки после инокуляции ВКЭ и введения ППФ. В этот период не регистрируется стимуляции продукции IL-4. Во второй половине инкубационного периода и в период проявления клинических признаков КЭ, напротив, регистрируется повышение уровней IL-4 и снижение уровней IFN $\gamma$  и IL-12.



**Рисунок 4. Поляризация иммунного ответа на вирус клещевого энцефалита в сторону Th1 под воздействием ППФ:**  
**а) динамика IL-2, IL-12 и IFN $\gamma$  в сыворотке крови мышей BALB/c, обработанных ППФ;**  
**б) динамика IL-2, IL-12 и IFN $\gamma$  в сыворотке крови мышей BALB/c, зараженных ВКЭ;**  
**в) динамика IL-2, IL-12 и IFN $\gamma$  в сыворотке крови мышей BALB/c, зараженных ВКЭ и леченных ППФ**

## Обсуждение

Эндогенные полипиренолы, их жирнокислотные эфиры и фосфорилированные производные — интегральные компоненты биологических мембран всех живых организмов. Они обладают биологической активностью, влияя на многие мембранные свойства (текучесть, проницаемость, температура фазового перехода, образование небислойных структур и т.д.) и постоянно переходят друг в друга. В фосфорилированном виде эти соединения, помимо указанных функций, играют роль связанных с мембраной промежуточных акцепторов углеводных остатков в процессах биосинтеза углеводсодержащих биополимеров (у эукариотов — гликопротеинов) и служат ключевым звеном при гликозилировании [1, 5, 9].

По своей структуре они являются терпеновыми, изопреноидными спиртами, построенными из изопреновых звеньев, что роднит их со скваленом, часто используемым в качестве масла при составлении адъювантных композиций. Отличие хвойных полипиренолов, использованных в настоящей работе, от сквалена состоит в длине изопреновой цепи: соответственно 16–18 и 6 изопреновых звеньев [5, 9].

В 1940-х и в начале 1950-х гг. были разработаны вакцины против гриппа и полиомиелита на основе минерального масла. Тогда же разработаны требования к нему и к ПАВ. Испытания показали, что чем грубее масло в полном адъюванте, тем большую продукцию антител оно вызывает, но тем сильнее побочные эффекты. Первоначально масло готовили обработкой олеумом парафинов. Оно было токсично за счет входящих в его состав короткоцепных углеводов. С 1970 гг. масло подвергается одинарному или двойному гидрированию. Это привело к существенному снижению токсичности, настолько, что новые адъюванты во избежание путаницы предложено называть «Иммуностимулирующими масляными эмульсиями» — ИОЕ [18]. Как показали наши исследования, полипиренолы, выделенные из листьев березы и имеющие 7 изопреновых звеньев, всего на 1 больше, чем у сквалена, существенно токсичнее хвойного ППФ, LD<sub>50</sub> которого около 12 г/кг [11].

Противовирусный препарат фоспренил, использовавшийся в настоящей работе в качестве источника ППФ, имеет в составе своего комплексного растворителя твин 80 (Полисорбат 80), который применяется при приготовлении очень многих адъювантов [18].

Третий необходимый компонент современного адъюванта — это иммуномодулятор [8, 10, 12]. В случае с ППФ роль иммуномодулятора выполняет сам полипиренол. Многочисленные данные свидетельствуют об иммуномодули-

рующих свойствах экзогенно введенных фосфорилированных полипиренолов: они стимулируют систему естественной резистентности организма, продукцию IL-1, TNF $\alpha$ , IL-12, IFN I и II типов, но не IL-2 [16, 17].

Эти соображения послужили поводом к тому, чтобы рассматривать фоспренил — коллоидный раствор фосфорилированных полипиренолов хвой пихты — готовым адъювантным составом.

Приведенные в настоящей работе данные подтверждают это заключение. ППФ вызывал существенное увеличение антителообразования при самых разных вирусных инфекциях (грипп, бешенство, энтеровирусы, КЭ). Аналогичные результаты были получены ранее и при других вирусных инфекциях (желтая лихорадка, чума плотоядных, болезнь Гамборо, инфекционный бурсит, парвовирусный гастроэнтерит, болезнь Ньюкасла) [2, 3, 6], что заставляет рассматривать адъювантный эффект ППФ как универсальное его свойство.

Важно отметить, что адъювантное действие ППФ приводит к повышению протективного эффекта вакцины. В случае КЭ это связано, по-видимому, со способностью ППФ вызывать раннюю стимуляцию Th1, которая необходима для индукции протективного иммунитета при вирусных инфекциях. При этом сдвигается на более поздний срок активация Th2, основных продуцентов IL-4. Ранняя активация последних не приводит к защите от инфекции, вызванной вирусом КЭ [4].

Разные адъюванты направляют иммунный ответ либо в сторону Th1, вызывая через продукцию иммуноглобулинов, связывающихся с Fc $\gamma$ 1-рецепторами (IgG2a у мыши, IgG1 у человека), IFN $\gamma$  и усиливая ГЗТ, либо в сторону Th2. Ключевым фактором здесь может быть ранняя продукция IL-12 [7, 8, 12, 14]. Однако конкретные механизмы, обеспечивающие поляризацию иммунного ответа в сторону Th1 при воздействии ППФ подлежат дальнейшему исследованию.

## Список литературы

1. Васильев А.Н., Ожерелков С.В., Козлов В.В., Пронин А.В., Санин А.В., Парфенова Т.М., Изместьева А.В., Амченкова А.М., Кожевникова Т.Н., Степанова Т.Н., Наровлянский А.Н. Противовирусная и иммуномодулирующая активность полипиренилфосфатов при вирусных инфекциях // Антибиотики и химиотерапия. — 2008. — Т. 53. — С. 3–8.
2. Деева А.В., Белоусова Р.В., Данилов Л.Л., Мальцев С.Д., Ожерелков С.В., Лобова Т.П., Третьякова И.В., Иванов Н.В., Виноградова П.А., Зайцева М.Л., Григорьева Е.А., Сосновская О.Ю., Бакулин И.Н., Богаутдинов З.Ф., Пронин А.В. Применение фоспренила. Механизмы повышения

- продуктивности, профилактического и терапевтического действия // *Ветеринария*. — 2004. — № 11. — С. 9–13.
3. Деева А.В., Данилов Л.Л., Ожерелков С.В., Лобова Т.П., Третьякова И.В., Зайцева М.Л., Григорьева Е.А., Наровлянский А.Н., Сосновская О.Ю., Санин А.В., Бакулин И.Н., Богаутдинов З.Ф., Пронин А.В., Белоусова Р.В. Средство для профилактики и лечения — Фоспренил. Свойства, механизмы биологического действия и клинические эффекты в ветеринарии // *Ветеринарная патология*. — 2003. — № 3. — С. 20–31.
  4. Карганова Г.Г., Кондратьева Я.Ю., Дживанян Т.И. Особенности иммунного ответа при инаппарантной и острой инфекции, вызываемой вирусом клещевого энцефалита, в экспериментах на мышах // Третья Международная конференция, посвященная 80-летию института имени Пастера, Санкт-Петербург, 4–5 сентября 2003 года: материалы конф. — С. 28.
  5. Наровлянский А.Н., Васильев А.Н., Савойская С.Л., Иванова А.М., Измestьева А.В., Данилов Л.Л., Веселовский В.В., Ожерелков С.В., Зубашев И.К., Пронин А.В., Санин А.В., Ершов Ф.И. Система изопреноидов: роль в противовирусном иммунитете // *Ведомости НЦ экспертизы средств мед. применения*. — 2007. — № 3. — С. 66–75.
  6. Ожерелков С.В., Тимофеев А.В., Новикова Г.П., Деева А.В., Наровлянский А.Н., Санин А.В., Пронин А.В. Защитное действие нового противовирусного препарата Фоспренил при экспериментальном клещевом энцефалите // *Вопросы вирусологии*. — 2000. — Т. 45. — С. 33–37.
  7. Carter D., Reed S.G. Role of adjuvants in modeling the immune response // *Curr. Opin. HIV AIDS*. — 2010. — Vol. 5. — P. 409–413.
  8. Chiarella P., Massi E., De Robertis M., Signori E., Fazio V.M. Adjuvants in vaccines and for immunomodulation: current trends // *Expert Opin. Biol. Ther.* — 2007. — Vol. 7. — P. 1551–1562.
  9. Chojnacki T., Dallner G. The biological role of dolichol // *Biochem J.* — 1988. — Vol. 251. — P. 1–9.
  10. Coffman R.L., Sher A., Seder R.A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work // *Immunity*. — 2010. — Vol. 33. — P. 492–503.
  11. Danilov L.L., Maltsev S.D., Deyeva A.V., Narovlyansky A.N., Sanin A.V., Ozerelkov S.V., Pronin A.V. Phosprenyl: a novel drug with antiviral and immune modulating activity // *Arch. Immunol. Ther. Exper.* — 1996. — Vol. 44. — P. 395–400.
  12. Kornbluth R.S., Stone G.W. Immunomodulatory combinations: designing the next generation of vaccine adjuvants // *J. Leukocyte Biol.* — 2006. — Vol. 80. — P. 1084–1102.
  13. Mbow M.L., De Gregorio E., Valiante N.M., Rappuoli R. New adjuvants for human vaccines // *Curr. Opin. Immunol.* — 2010. — Vol. 22. — P. 411–416.
  14. Metzger D.W. Interleukin-12 as an adjuvant for induction of protective antibody responses // *Cytokine*. — 2010. — Vol. 52. — P. 102–107.
  15. Mutwiri G., Gerdt V., van Drunen Littel-van den Hurk S., Auray G., Eng N., Garlapati S., Babiuk L.A., Potter A. Combination adjuvants: the next generation of adjuvants? // *Expert Rev. Vaccines*. — 2011. — Vol. 10. — P. 95–107.
  16. Pronin A.V., Ozerelkov S.V., Narovlyansky A.N., Danilov L.L., Maltsev S.D., Deyeva A.V., Grigorieva E.A., Sanin A.V. Role of cytokines in immunomodulatory effects of polyphenyl phosphate: new generation of antiviral drug // *Russ. J. Immunol.* — 2000. — Vol. 5. — P. 156–164.
  17. Pronin, A.V., Grigorieva E.A., Sanin A.V., Narovlyansky A.N., Ozhherelkov S.V., Deyeva A.V., Danilov L.L., Maltsev S.D., Najid A. Polyphenols as possible factors that determine an instructive role of the innate immunity in the acquired immune response // *Russ. J. Immunol.* — 2002. — Vol. 7. — P. 136–141.
  18. Stills H.F. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants // *ILAR J.* — 2005. — Vol. 46. — P. 280–293.