

УДК 615.371

## ИММУНОАДЪЮВАНТЫ, КЛАССИФИКАЦИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

Д.В. Васильева<sup>1\*</sup>, М.С. Григорьева<sup>1</sup>, Е.В. Ворфоломеева<sup>1</sup>, А.В. Панов<sup>1</sup>,  
С.А. Кедик<sup>1</sup>

**Резюме.** Данный обзор посвящен изучению иммуноадъювантов. Рассмотрены основные свойства адъювантов, их виды и причины их использования в вакцинах. Приведена классификация адъювантов.

**Ключевые слова:** адъюванты, классификация адъювантов, адъювантные соединения.

### IMMUNOADJUVANTS, ITS CLASSIFICATION AND APPLICATION IN PHARMACEUTICAL INDUSTRY

D.V. Vasilyeva<sup>1\*</sup>, M.S. Grigoryeva<sup>1</sup>, E.V. Vorfolomeeva<sup>1</sup>, A.V. Panov<sup>1</sup>, S.A. Kedik<sup>1</sup>

**Abstract.** The present review is devoted to the investigation of immunoadjuvants. The main properties of adjuvants, their species and reasons of the use in vaccines are considered. Adjuvant classification is described.

**Keywords:** adjuvants; adjuvant classification; adjuvant combinations.

1 – ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (Институт тонких химических технологий), 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, 86

1 – Moscow Technological University (MITHT), 86, Vernadsky prosp., Moscow, 119571, Russia

\* адресат для переписки:

E-mail: VasilyevaDarya@yandex.ru

## ВВЕДЕНИЕ

Вакцины, по мнению многих учёных, являются одной из наиболее успешных медицинских мер против инфекционных заболеваний [1]. Для эффективности вакцины решающее значение имеет включение иммунных усилителей – адъювантов, которые вызывают ранние врожденные иммунные ответы, чтобы помочь в генерации надежных и долговечных адаптивных иммунных реакций [2].

Адъюванты, широко используемые в настоящее время как для человека, так и для животных, по большей части были разработаны эмпирически, без четкого понимания клеточных и молекулярных механизмов их действия. Тем не менее последние данные показывают, что большинство, если не все адъюванты повышают Т- и В-клеточные ответы путем привлечения компонентов иммунной системы, а не путем прямого воздействия на сами лимфоциты [3–5].

В борьбе с инфекционными заболеваниями наряду с созданием эффективных вакцин, способных вызвать стойкий иммунитет, актуальным остается дальнейшее совершенствование существующих и разработка новых веществ, способных усиливать эффект иммунизации. Необходимость применять адъюванты, которые

оказывают иммуностимулирующее действие, обусловлено слабой иммуногенностью некоторых препаратов (например, противомаларийная, пневмококковая и другие вакцины) [6].

## ПОНЯТИЕ АДЪЮВАНТОВ

Адъюванты (от лат. *adjuvare* – помогать, усиливать) – это вещества, повышающие иммунный потенциал вакцин. Они являются вспомогательными компонентами различного происхождения и различной химической природы, оказывающими неспецифическое стимулирующее действие на иммунный ответ при совместном их применении со специфическими антигенами [6].

Адъюванты используют для повышения иммуногенности высокоочищенных бактериальных и вирусных антигенов, анатоксинов, рекомбинантных и синтетических антигенов. Включение адъювантов в состав вакцин обеспечивает более быстрое формирование выраженного и длительного специфического иммунитета. Целесообразность использования адъювантов в вакцинах заключается в повышении иммуногенности вакцин, изменении характера иммунного ответа, снижении количества антигена, необходимого для успешной иммунизации, уменьшении кратности введения вакцины и повышении интенсивности иммунного ответа у лиц со сниженной им-

мунологической активностью, в том числе у пожилых лиц [7].

В идеальном случае адъюванты должны быть стабильными, иметь длительный срок хранения, быть биodeградируемыми, безопасными и усиливать соответствующий иммунный ответ (клеточный или гуморальный иммунитет в зависимости от требований защиты организма) [8].

## ВИДЫ АДЪЮВАНТОВ

В настоящее время известно множество веществ органической и неорганической природы, которые способны оказывать адъювантное действие. В качестве адъювантов используют минеральные соединения (гели гидроксида и фосфата алюминия); полимерные вещества; сложные химические смеси (липополисахариды, белково-липополисахаридные комплексы, мурамилдипептид и его производные); бактерии и компоненты бактерий (вытяжки вакцины БЦЖ); липиды и эмульгаторы (ланолин, арлацел); вещества, вызывающие воспалительную реакцию (сапонин, скипидар).

Как видно, адъюванты имеют различный химический состав и происхождение, сходство их состоит в том, что все они способны усиливать иммуногенность антигена, изменять степень гуморального ответа на иммуноген, являясь при этом чужеродными для организма веществами [6].

## ПРИЧИНЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АДЪЮВАНТОВ

Адъюванты традиционно используются для повышения интенсивности адаптивного ответа на вакцины, основанной на титре антител или способности предотвращать инфекцию, вторая роль адъювантов – это направление адаптационной реакции для получения наиболее эффективной формы иммунитета для каждого конкретного возбудителя.

Адъюванты в настоящее время используются в клинике для:

- 1) увеличения отклика на вакцину в общей популяции с помощью увеличения среднего титра антител и/или доли субъектов, которые становятся иммунизированными;
- 2) увеличения сероконверсии в популяциях с уменьшенной ответной реакцией из-за возраста (как детей, так и пожилых людей), болезней или терапевтических вмешательств [9, 10];
- 3) содействия использованию небольших доз антигена [11–13], потому что способность адъюванта разрешить сопоставимые ответы с существенно меньшими количествами антигена может быть важна в условиях, в которых широкомасштабная

вакцинация является срочной и ограниченной по производственной мощности, например в случае появления пандемического штамма вируса гриппа;

- 4) иммунизации с меньшим количеством доз вакцины: необходимость в многократных инъекциях для многих вакцин вызывает в большинстве стран мира значительные логистические проблемы – адъюванты могут уменьшить число доз, необходимых для достижения защиты [12, 13].

Вторая причина для включения адъюванта в вакцину – достижение качественного изменения иммунного ответа. Для вакцин, находящихся в разработке в настоящее время, адъюванты всё чаще используются для поддержания тех видов иммунитета, которые неэффективно вызваны неадъювантными антигенами. Например, в доклинических и клинических исследованиях адъюванты были использованы, чтобы:

- 1) обеспечить функционально подходящие типы иммунного ответа (например, клетки Т-хелперы-1 (Th1) по сравнению с клетками Th2, Т-клетки CD8<sup>+</sup> по сравнению с CD4<sup>+</sup>, специфические изотипы антител);
- 2) увеличить выработку памяти, особенно Т-клеточной памяти [14–16];
- 3) увеличить скорость начальной реакции, которая может иметь решающее значение во вспышках пандемической инфекции [17–19];
- 4) изменять широту, специфичность или сродство иммунного ответа [19, 20].

## КЛАССИФИКАЦИЯ АДЪЮВАНТОВ

Адъюванты могут быть классифицированы по происхождению, механизму действия и физико-химическим свойствам.

### Минеральные соли

Соли алюминия, главным образом гидроксид алюминия  $Al(OH)_3$  или фосфат алюминия  $AlPO_4$ , наиболее широко применяются в качестве адъювантов для человека [21]. Механизм, по которому действуют соли алюминия, остается неизвестным, хотя существует предположение, что они работают, образуя депо антигена на месте прививки [22]. Другие возможные механизмы действия могут включать активацию комплемента или эозинофилов или активацию макрофагов [23].

Что касается алюминиевых квасцов, то они являются относительно слабыми адъювантами, особенно для вызывания клеточного иммунного ответа. Когда квасцы вводят подкожно или внутримышечно, а не внутримышечно, появляются гранулемы. Другие побочные эффекты квасцов – увеличение уровня имму-

ноглобулина E (IgE), аллергенность и потенциальная нейротоксичность. Обычно алюминий выводится почками, хотя при определенных условиях, таких как низкое функционирование почек, алюминий накапливается в организме и может стать токсичным. Высокие уровни алюминия в организме влияют преимущественно на мозг и костные ткани, вызывая фатальный неврологический синдром и диализную деменцию. Интоксикация алюминием также потенциально связана с боковым амиотрофическим склерозом и болезнью Альцгеймера. Соли других металлов, таких как кальций, железо и цирконий, также используются для адсорбции антигенов. В частности, фосфат кальция был использован в вакцине от коклюша [24, 25].

### **Поверхностно-активные соединения**

Квил-А (Quil A®) – это сапонин, полученный из водного экстракта коры квиллайи мыльной (*Quillaja saponaria*). Фракции, выделенные из этого экстракта с помощью обращенно-фазовой хроматографии, такие как QS-21, имеют способность индуцировать сильные клеточные ответы против ВИЧ-1 и других патогенов производных антигенов [26, 27].

Квил-А (Quil A®) представляет собой натуральный продукт, который состоит из более чем 23 различных сапонинов и является слишком токсичным для человека. В дополнение к тяжелым местным реакциям и гранулемам токсичность вызывает тяжелый гемолиз [28–32]. Производный сапонин QS-21 менее токсичен, чем Quil A®, но имеет ряд недостатков, что делает его непригодным для применения в составе вакцин. Его употребление возможно лишь в случаях приемлемости высокой токсичности (вакцины от рака) или использования в низких дозах [33].

### **Адъюванты, производные микроорганизмов**

Учитывая сильный иммуностимулирующий потенциал бактериальных или грибковых веществ, можно сделать заключение, что они являются продуктивным источником потенциальных адъювантов. Пептидогликан клеточной стенки бактерии или липополисахариды (ЛПС) усиливают иммунную реакцию, в то время как сами по себе не являются высокоиммуногенными. Эта адъювантная активность опосредуется через активацию Толл-подобных рецепторов (TLRs), которые обеспечивают сигналы опасности, активирующие системы иммунной защиты [34].

Различные виды бактерий используются в качестве источников адъювантов: *Mycobacterium* spp., *Corynebacterium parvum*, *C. granulorum*, *Bordetella pertussis* и *Neisseria meningitidis*. В целом убитые микроорганизмы слишком токсичны для использования в качестве адъювантов для человека [35].

Однако, по-видимому, основная адъювантная активность этих бактерий опосредуется N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамином, также называемым мурамилдипептидом (MDP). В физиологическом растворе MDP усиливает основной гуморальный иммунитет, а будучи включенным в липосомы или в смеси с глицерином, вызывает сильный клеточный иммунитет. Соединения с адъювантной активностью, полученные из MDP, включают треонил-MDP [36].

Другой важной группой соединений, полученных из клеточной стенки грамотрицательных бактерий, являются липополисахариды (ЛПС). Основным структурным элементом ЛПС, ответственным за их адъювантный эффект, является липид А. В условиях низкой кислотности липид А можно гидролизовать с получением монофосфорилированного липида А (MPL), соединения, которое совмещает адъювантную активность липида А с пониженной токсичностью [37].

### **Эмульсии**

Этот класс включает эмульсии типа «масло в воде» или «вода в масле», такие как неполный адъювант Фрейнда (FIA), Монтанид (Montanide®), адъювант-65 [38–40] или Липовант (Lipovant®) [41]. Механизм действия адъювантной эмульсии включает в себя формирование депо в месте инъекции, что обеспечивает медленное высвобождение антигена и стимуляцию клеток плазмы, производящих антитела [42].

В общем, эти адъюванты слишком токсичны для повседневного использования в качестве человеческой профилактической вакцины, хотя они могут быть пригодны для использования в таких случаях, как рак, где сохраняется большая терпимость к побочным эффектам. Частые побочные эффекты эмульсий: воспалительные реакции, гранулемы и язвы в месте введения. Например, Montanide® – совокупность масляных адъювантов, которые были использованы в пробных вакцинах против ВИЧ, малярии и рака молочной железы [43].

### **Системы доставки крупнодисперсных антигенов**

Из наиболее изученных адъювантов в категорию «системы доставки крупнодисперсных антигенов» могут быть включены липосомы, полимерные микросферы, наночастицы, вирусоподобные частицы (VLPs), как наиболее важные из систем доставки антигенов. Эти адъюванты широко используются в качестве носителей субъединиц белка и ДНК-вакцин. Существует обширное понимание их биологических взаимодействий и механизмов действия, связанное с их размерами и химической природой [44].

### *Липосомы*

Липосомы – синтетические сферические наночастицы, состоящие из липидного бислоя, которые могут инкапсулировать антигены и действовать как в качестве механизма доставки вакцины, так и в качестве адъюванта [45].

Активность липосом зависит от количества липидных слоев, электрического заряда, состава и способа их создания. Недавние результаты показали, что соединенные с поверхностью липосомальные антигены могут быть применимы для разработки противоопухолевых вакцин для доставки опухолевых антигенов до антигенпрезентирующих клеток (АРС) и индукции противоопухолевой реакции [46].

Хотя липосомы являются одной из наиболее изученных систем доставки антигенов, они по-прежнему являются источником новых результатов по активации стратегии иммунной защиты. Синергетический эффект липосом совместно с ДНК и белком превышает известные адъювантные эффекты плазмидной ДНК и липосомы. Этот новый подход к вакцинации был назван «ко-доставка» («co-delivery»). Тем не менее стабильность, производство и обеспечение качества являются основными факторами, препятствующими использованию липосом в качестве адъювантов для человека [47, 48].

### *Полимерные микросферы*

Среди гранулированных и полимерных систем широко изучены поли-(D,L-лактид-ко-гликолид)-микросферы. Эти биологически совместимые и биодеградируемые микросферы размером от 1 до 1000 нанометров способны включать различные антигены. Одним из их преимуществ является способность манипулировать кинетикой деградации за счет изменения относительной концентрации их компонентов, тем самым управляя временем выпуска антигена [49, 50].

Приготовление катионных и анионных микрочастиц полилактид-ко-гликолида (PLG), которые были использованы для адсорбции различных веществ, в том числе плазмидной ДНК, рекомбинантных белков и иммуностимулирующих олигонуклеотидов, приводит к индукции существенно улучшенных иммунных реакций по сравнению с квасцами. Адсорбция на поверхности микросферы позволяет использовать альтернативный и оригинальный способ доставки антигенов в вакцинных препаратах [51].

### *Наночастицы*

Твердые инертные наночастицы с поверхностно-адсорбированным антигеном ранее использовались для стимулирования CD8<sup>+</sup>-Т-клеточных ответов с оптимальным диаметром 1 мкм [52]. В последнее время использование твердых инертных частиц нанометро-

вого размера (0,04–0,05 мкм) является очень перспективной стратегией для достижения эффективной доставки антигена к антигенпрезентирующим клеткам (АРС), создавая мощный и комбинированный гуморальный и CD8<sup>+</sup>-Т-клеточный иммунитет [53].

Наночастицы в отличие от квасцов индуцируют существенный клеточный ответ наряду с умеренным гуморальным ответом в ходе масштабных испытаний на животных. Таким образом, данные адъюванты потенциально полезны для внутриклеточных патогенов в организме человека и животных в лечебных и профилактических целях [54].

### *Вирусоподобные частицы (VLPs)*

Вирусоподобные частицы – это инертные, пустые капсиды вирусов, которые не содержат ДНК/РНК самого вируса. Однако они сохраняют структуру вируса и могут быть сконструированы с прикрепленными антигенами. Частицы аналогичного размера и формы, что и вирусы, и полученные генно-инженерным способом, с включением антигенов из вирусных или невирусных источников, относятся также к VLPs. Антигены вирусоподобных частиц (VLPs) эффективно поглощаются дендритными клетками (DC) и вызывают сильные иммунные ответы после парентеральной иммунизации, иммунизации через кожу, а также после иммунизации слизистых оболочек [55–57].

### *Цитокины*

Как правило, цитокины включают в современную классификацию адъювантов. Например, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) повышает первичный иммунный ответ путем активации антигенпрезентирующих клеток (АРС) [58].

Тем не менее практическое применение GM-CSF в качестве адъюванта ограничено требованием по количеству доз, токсичности и иммуногенности гетерологичных цитокинов. Цитокины могут иметь особый потенциал для ДНК-вакцин, где цитокин может быть совместно экспрессирован с антигеном с помощью одного вектора. С другой стороны, непосредственное применение интерлейкина-12 (IL-12) и других цитокинов в виде растворимых белков доказало свою эффективность в качестве мукозного адъюванта [59, 60].

### *Полисахариды*

Инулин – углевод, получаемый из корней растений семейства Compositae, – в виде микрочастиц является мощным гуморальным и клеточным иммунным адъювантом. Микрочастица инулина (MPI) является мощным активатором альтернативного пути комплемента и тем самым активирует врожденную иммунную систему [61].

MPI особенно эффективна в повышении клеточного иммунного ответа без токсичности, которая обычно присуща другим адъювантам, таким как полный адъювант Фрейнда (FCA), Montanide или QS-21. Микрочастицу инулина (MPI) можно сочетать с другими компонентами для получения ряда адъювантов с различными степенями активности Th1 и Th2. Например, алгаммулин представляет собой сочетание MPI и гидроксида алюминия. Алгаммулин проявляет более высокую активность Th2 и Th1, чем просто MPI, причем общий эффект эквивалентен эффекту квасцов, несмотря на более низкое общее содержание солей алюминия [62, 63].

Адъюванты на основе MPI успешно тестируются на многих животных моделях, включая дифтерию, анатоксин столбняка, респираторно-синцитиальный вирус, белок E7 ВПЧ, гликопротеин D вируса герпеса 2-го типа, гемагглютинин гриппа, гемофильную инфекцию и малярийный плазмодий. Микрочастица инулина (MPI) преимущественно индуцирует иммунные ответы как Th1-, так и Th2-типа, не вызывая повышения иммуноглобулина E (IgE), и не связана с какой-либо значительной локальной или системной токсичностью. Инулин метаболизируется в простые сахара – фруктозу и глюкозу и, следовательно, безопасен [64].

### Адъювантные препараты

Новые адъювантные препараты представляют собой смесь двух или более адъювантов с различными механизмами действия. Целью этого метода является усиление в дальнейшем и/или модулирование иммунного ответа на данный антиген и в некоторых случаях улучшение доставки и модуляции. Эффективный адъювантный препарат, содержащий монофосфориллипид А (MPL) и квасцы, недавно был включен в утвержденный состав вакцины Fendrix®, используемой для профилактики иммунизации против гепатита В у пациентов с заболеваниями почек, в том числе пациентов на гемодиализе. Эта вакцина развивает более быстрый, интенсивный и продолжительный иммунный ответ по сравнению с контрольной вакциной в группах высокого риска, демонстрируя безопасность и клинически приемлемые местные реакции, как и другие лицензированные вакцины против гепатита В [65].

Адъювантный препарат AS04 был протестирован также в рамках развития перспективной вакцины против ВПЧ [66, 67].

### Синтетические иммуoadъюванты

Перспективным направлением в разработке новых адъювантов является получение высокомолекулярных полимеров, обладающих иммуномодулирующей активностью, которые используются в качестве адъювантов, увеличивающих эффективность приме-

нения консервативных средств профилактики заболеваний [68].

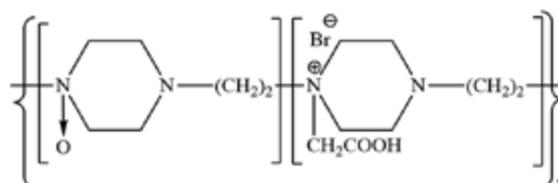
Для использования в качестве синтетических иммуoadъювантов и иммуномодуляторов большой интерес представляют сополимеры N-оксидов (например, полиоксидоний) [69] и сополимеры на основе N-винилпирролидона с различными производными пиридина (например, сополимер N-винилпирролидона с 2-метил-5-винилпиридином) [70].

Синтетический иммуoadъювант — физиологически активное высокомолекулярное соединение, обладающее выраженной иммуномодулирующей активностью. Иммуномодуляторы – это лекарственные средства, обладающие иммуностропной активностью, которые в терапевтических дозах восстанавливают функции иммунной системы [71].

#### Полиоксидоний

Полиоксидоний® – препарат класса синтетических полиэлектролитов, который представляет собой N-оксидированное производное полиэтиленпиперозина с высокой молекулярной массой [72] и используется для лечения и профилактики заболеваний, связанных с нарушениями иммунной системы [73].

На рисунке 1 представлена формула полиоксидония.



**Рисунок 1.** Полиоксидоний – производное N-окиси 1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиил)-1,4-этиленпиперазиния бромида

Полиоксидоний® был разработан в ГНЦ Институт иммунологии Министерства здравоохранения Российской Федерации [74] и включен в качестве адъюванта в состав субъединичной гриппозной вакцины (Гриппол®) [68]. Включение полиоксидония в состав вакцины Гриппол® позволило снизить количество антигена (по 5 мкг гемагглютинина серотипов А/Н1N1 и А/Н3N2 и 11 мкг серотипа В) [75]. Однако имеются публикации, указывающие на недостаточную иммуногенность данной вакцины, главным образом для лиц пожилого возраста [76, 77].

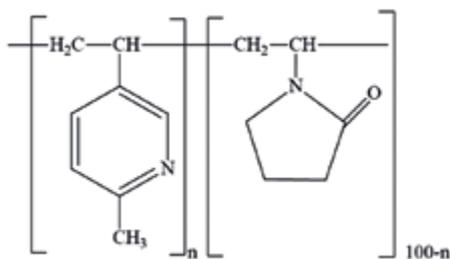
По классификации токсичности Полиоксидоний® относится к 5 классу, то есть к практически нетоксичным соединениям. Высокую степень безопасности полиоксидония подтверждают и результаты доклини-

ческого изучения. Полиоксидоний® в дозе, в 50 раз превышающей терапевтическую, не проявляет пирогенных, раздражающих, токсических, аллергенных, мутагенных, эмбриотоксических, тератогенных и канцерогенных свойств [78].

#### Сополимер N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина

Сополимеры на основе N-винилпирролидона с различными производными пиридина находят широкое применение в медицине и фармации [79–81] вследствие проявления ими выраженной физиологической активности [82]. К числу перспективных относится сополимер N-винилпирролидона с 2-метил-5-винилпиридином, обладающий иммуномодулирующими свойствами [83].

На рисунке 2 представлена его химическая формула.



**Рисунок 2.** Сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона:

$n$  – доля (мольный процент) звеньев мономера 2-метил-5-винилпиридина в сополимере;  $100-n$  – доля (мольный процент) звеньев мономера N-винилпирролидона в сополимере

Сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона – это водорастворимый полимер, который со средневязкостной молекулярной массой  $M_n=30000\div 55000$  дальтон проявляет высокую антигенную активность и может использоваться как адъювант в вакцинах [84, 85].

Сополимер N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина был синтезирован по методике радикальной сополимеризации, разработанной профессором С.А. Кедиком и его сотрудниками [86], и включен в состав инактивированной вакцины для профилактики гриппа Совигрипп® в качестве иммуoadъюванта.

Группой ученых под руководством профессора С.А. Кедика были осуществлены широкие доклинические исследования сополимера N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина. На различных биообъектах было доказано, что данный сополимер обладает низкой токсичностью, отсутствием тератогенного и канцерогенного действия, является эффективным им-

муномодулятором, проявляющим собственные антибактериальные и противовирусные свойства [87].

Перспективным оказалось введение данного полимера в вакцины для повышения их эффективности, возможного снижения дозы антигена и реактогенности вакцины (т.е. снижение каких-либо побочных эффектов при введении вакцины в организм). Было определено, что препарат в дозе 5000 мг/кг не вызывал гибели мышей F1(CBAxС57B1). При подкожном введении мышам препарата в дозе 500 мг/кг отсутствовали признаки раздражающего действия и выпадение волосяного покрова. В опыте по изучению миграционной активности колонии образующихся клеток селезенки с отрицательным контролем (физиологический раствор) и положительным контролем (продигиозан) было подтверждено, что сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона обладает выраженным иммуномодулирующим действием [87].

В опытах на грызунах, собаках, обезьянах, овцах и свиньях были изучены фармакологическая активность, безвредность и противолучевая эффективность сополимера 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона: в дозах до 100 мг/кг он не оказывает эмбриотоксического действия и не нарушает репродуктивную функцию крыс и кроликов. Кроме того, сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона не оказывает влияния на функцию центральной нервной системы, имеет слабое сосудорасширяющее действие и несколько ослабляет сосудосуживающий эффект  $\alpha$ -адреномиметиков [88]. Препарат выводится главным образом через почки. Было показано, что данный препарат обладает широким спектром биологической активности: противоопухолевым, антибактериальным, противовирусным действием, а также тормозит аутоиммунные процессы и стимулирует кроветворение [88–90].

На основании этих данных можно с большой долей уверенности говорить о его высоком уровне безопасности для использования у человека. Сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона является перспективным в качестве иммуoadъюванта в составе различных профилактических и терапевтических вакцин и препаратов как против соматических, так и против инфекционных заболеваний.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время повышения эффективности вакцин в основном добиваются благодаря использованию неспецифических стимуляторов. Актуальным остается улучшение существующих и создание новых профилактических препаратов. Это значит, несмотря на существующие достижения, разработки перспективных адъювантов продолжают.

**ЛИТЕРАТУРА**

- M.R. Hilleman. Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries // *Vaccine*. 2000. V. 18. № 15. P. 1436–1447.
- D.T. O'Hagan. Recent developments in vaccine delivery systems // *New Generation Vaccines*, 2<sup>nd</sup> / Ed. by M.M. Levine, J.B. Kaper, R. Rappuoli, M. Liu, M.F. Good. – New York: Marcel Dekker, 2004. P. 259–270.
- S. McCartney, W. Vermi, S. Gilfillan, M. Cella, T.L. Murphy, R.D. Schreiber, K.M. Murphy, M. Colonna. Distinct and complementary functions of MDA5 and TLR3 in poly (I: C)-mediated activation of mouse NK cells // *J. Exp. Med.* 2009. V. 206. № 13. P. 2967–2976.
- A.S. McKee, M.W. Munks, P. Marrack. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants // *Immunity*. 2007. V. 27. № 5. P. 687–690.
- D.T. O'Hagan, E. De Gregorio. The path to a successful vaccine adjuvant—'The long and winding road' // *Drug Discovery Today*. 2009. V. 14. P. 541–551.
- Е.Ю. Исаенко, Е.М. Бабич, И.В. Елисева, Л.А. Ждамарова, В.И. Белозерский, С.А. Колпак. Адьюванты в современной вакцинологии // *Annals of Mechnikov Institute*. 2013. № 4. С. 5–21.
- Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, В.П. Бондарев, Р.А. Волкова, Н.И. Лонская, Е.В. Лебединская, Н.В. Медуницын, А.Н. Миронов, Н.А. Озерецковский, А.А. Солдатов, В.А. Шевцов. Вакцины с адьювантами. Доклинические исследования // *Биопрепараты*. 2015. № 1(53). С. 15–20.
- R. Edelman. Vaccine adjuvants // *Rev. Infect. Dis.* 1980. V. 2. P. 370–383.
- J. Beran. Safety and immunogenicity of a new hepatitis B vaccine for the protection of patients with renal insufficiency including pre-haemodialysis and haemodialysis patients // *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2008. V. 8. № 2. P. 235–247.
- A. Podda. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: Experience with the MF59-adjuvanted vaccine // *Vaccine*. 2001. V. 19. P. 2673–2680.
- A. Banzhoff, R. Gasparini, F. Laghi-Pasini, T. Staniscia, P. Durando, E. Montomoli, P. Capecchi, P. di Giovanni, L. Sticchi, C. Gentile, A. Hilbert, V. Brauer, S. Tilman, A. Podda. MF59-adjuvanted H5N1 vaccine induces immunologic memory and heterotypic antibody responses in non-elderly and elderly adults // *PLoS ONE*. 2009. V. 4. № 2. P. e4384.
- J. Boyle, D. Eastman, C. Millar, S. Camuglia, J. Cox, M. Pearce, J. Good, D. Drane. The utility of ISCOMATRIX adjuvant for dose reduction of antigen for vaccines requiring antibody responses // *Vaccine*. 2007. V. 25. № 14. P. 2541–2544.
- T.F. Schwarz, T. Horacek, M. Knuf, H.G. Damman, F. Roman, M. Drame, P. Gillard, W. Jilg. Single dose vaccination with AS03-adjuvanted H5N1 vaccines in a randomized trial induces strong and broad immune responsiveness to booster vaccination in adults // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 45. P. 6284–6290.
- G. Galli, D. Medini, E. Borgogni, L. Zedda, M. Bardelli, C. Malzone, S. Nuti, S. Tavarini, C. Sammicheli, A.K. Hilbert, V. Brauer, A. Banzhoff, R. Rappuoli, G. Del Giudice, F. Castellino. Adjuvanted H5N1 vaccine induces early CD4<sup>+</sup> T cell response that predicts long-term persistence of protective antibody levels // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 3877–3882.
- I. Leroux-Roels, F. Roman, S. Forgas, C. Maes, F. De Boever, M. Drame, P. Gillard, R. van der Most, M. Van Mechelen, E. Hanon, G. Leroux-Roels. Priming with AS03 A-adjuvanted H5N1 influenza vaccine improves the kinetics, magnitude and durability of the immune response after a heterologous booster vaccination: An open non-randomised extension of a doubleblind randomised primary study // *Vaccine*. 2010. V. 28. № 3. P. 849–857.
- P. Vandepapeliere, Y. Horsmans, P. Moris, M. Van Mechelen, M. Janssens, M. Koutsoukos, P. Van Belle, F. Clement, E. Hanon, M. Wettendorff, N. Garcon, G. Leroux-Roels. Vaccine adjuvant systems containing monophosphoryl lipid A and QS21 induce strong and persistent humoral and T cell responses against hepatitis B surface antigen in healthy adult volunteers // *Vaccine*. 2008. V. 26. № 10. P. 1375–1386.
- G. Galli, K. Hancock, K. Hoshler, J. DeVos, M. Praus, M. Bardelli, C. Malzone, F. Castellino, C. Gentile, T. McNally, G. Del Giudice, A. Banzhoff, V. Brauer, E. Montomoli, M. Zambon, J. Katz, K. Nicholson, I. Stephenson. Fast rise of broadly cross-reactive antibodies after boosting long-lived human memory B cells primed by an MF59 adjuvanted prepandemic vaccine // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 7962–7967.
- J.W. Huleatt, A.R. Jacobs, J. Tang, P. Desai, E.B. Kopp, Y. Huang, L. Song, V. Naakaar, T.J. Powell. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity // *Vaccine*. 2007. V. 25. № 4. P. 763–775.
- S. Khurana, W. Chearwae, F. Castellino, J. Manischewitz, L.R. King, A. Honorkiewicz, M.T. Rock, K.M. Edwards, G. Del Giudice, R. Rappuoli, H. Golding. Vaccines with MF59 adjuvant expand the antibody repertoire to target protective sites of pandemic avian H5N1 influenza virus // *Science Translational Medicine*. 2010. V. 2. № 15. pp. 15ra5.
- L. Malherbe, L. Mark, N. Fazilleau, L.J. Mc Heyzer-Williams, M.G. Mc Heyzer-Williams. Vaccine adjuvants alter TCR-based selection thresholds // *Immunity*. 2008. V. 28. P. 698–709.
- A.C. Allison, N.E. Byars. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects // *Mol. Immunol.* 1991. № 28. P. 279–284.
- N.N. Blagowechensky. Dur'ee du s'ejour de l'antig'ene dans l'organisme et l'immunit'e // *Rev Immunol Paris*. 1938. № 4. P. 161.
- R.S. Walls. Eosinophil response to alum adjuvants: involvement of T cells in non-antigen-dependent mechanisms // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1977. V. 156(3). P. 431–435.
- R.K. Gupta. Aluminum compounds as vaccine adjuvants // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1998. V. 32. № 3. P. 155–172.
- J.C. Aguilar, E.G. Rodríguez. Review. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*. V. 25. № 19. 2007. P. 3752–3762.
- C.R. Kensil. Saponins as vaccine adjuvants // *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1996. № 13. P. 1–55.
- H. Takahashi, T. Takeshita, B. Morein, S. Putney, R.N. Germain, J.A. Berzofsky. Induction of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs // *Nature*. 1990. V. 344. P. 873–875.
- H.S. Warren, L.A. Chedid. Future prospects for vaccine adjuvants // *CRC Crit Rev Immunol*. 1986. V. 4. P. 369–388.
- K. Dalsgaard. Adjuvants // *Vet. Immunol. Immunopathol*. 1987. V. 17. P. 145–153.
- Bomford RHR. The differential adjuvant activity of Al(OH)<sub>3</sub> and saponin // *Immunopharmacology of infectious diseases: vaccine adjuvants and modulators of non-specific resistance* / Ed. by J. Madje. – New York: Alan R. Liss, 1987. P. 65–70.

31. B. Ronnberg, M. Fekadu, B. Morein. Adjuvant activity of nontoxic *Quillaja saponaria* Molina components for use in iscom-matrix // *Vaccine*. 1995. V. 13. P. 1375–1382.
32. C.R. Kensil, U. Patel, M. Lennick, D. Marciani. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex // *Journal of Immunology*. 1991. V. 146. P. 431–437.
33. C.R. Kensil, J.-Y. Wu, S. Soltysik. Structural and immunological characterization of the vaccine adjuvant QS-21. // *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach* / Ed. by M.F. Powell, M.J. Newman. – New York: Plenum Press, 1995. P. 525–541.
34. F.M. Audibert, L.D. Lise. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects // *Immunol. Today*. 1993. V. 14. P. 281–284.
35. J.M. Brewer, M. Conacher, A. Satoskar, H. Bluethmann, J. Alexander. In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production // *European journal of immunology*. 1996. V. 26(9). P. 2062–2066.
36. S. Kotani, Y. Watanabe, T. Shimoto, T. Narita, K. Kato, D.E.S. Stewart-Tull et al. Immunoadjuvant activities of cells walls, their water soluble fractions and peptidoglycan subunits, prepared from various gram-positive bacteria, and of synthetic *N*-acetylmuramyl peptides // *Z Immunitatsforsch*. 1975. 149S. P. 302–305.
37. M.A. Tomai, A.G. Johnson. T cell and interferon-gamma involvement in the adjuvant action of a detoxified endotoxin // *J. Biol. Resp. Modifiers*. 1989. V. 8. P. 625–630.
38. M.R. Hilleman, A.F. Woodhour, A. Friedman, A.H. Phelps. Studies for safety of adjuvant 65 // *Ann. Allergy*. 1972. V. 30. P. 477–480.
39. J.W. Smith, W.B. Fletcher, M. Peters, M. Westwood, F.G. Perkins. Response to influenza vaccine in adjuvant 65-4 // *J. Hyg. (Camb)*. 1975. V. 74. P. 251–259.
40. R.E. Weibel, A. McLean, A.F. Woodhour, A. Friedman, M.R. Hilleman. Ten-year follow-up study for safety of Adjuvant 65 influenza vaccine in man // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1973. V. 143. P. 1053–1056.
41. N.E. Byars, A.C. Allison. Immunologic adjuvants: general properties, advantages, and limitations // *Laboratory Methods in Immunology* / Ed. by H. Zola. – Boca Raton: CRC Press, 1990. P. 39–51.
42. J. Freund. The mode of action immunological adjuvants // *Adv. Tuberc. Res*. 1956. V. 7. P. 50–55.
43. G.L. Jones. Peptide vaccine derived from a malarial surface antigen: effect of dose and adjuvant on immunogenicity // *Immunol. Lett*. 1990. V. 24. P. 253–260.
44. V.W. Bramwell, Y. Perrie. Particulate delivery systems for vaccines // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst*. 2005. V. 22. P. 151–214.
45. A.C. Allison, G. Gregoriadis. Liposomes as immunological adjuvants // *Nature*. 1974. V. 252. No. 5480. Article 252.
46. J. De Souza Reboucas, I. Esparza, M. Ferrer, M.L. Sanz, J.M. Irache, C. Gamazo. Review Article. Nanoparticulate Adjuvants and Delivery Systems for Allergen Immunotherapy // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011. V. 2012. P. 1–13.
47. M. Taneichi, H. Ishida, K. Kajino, K. Ogasawara, Y. Tanaka, M. Kasai et al. Antigen chemically coupled to the surface of liposomes are crosspresented to CD8+ T cells and induce potent antitumor immunity // *J. Immunol*. 2006. V. 177. P. 2324–2330.
48. A. des Rieux, V. Fievez, M. Garinot, Y.J. Schneider, V. Preat. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach // *Journal of Controlled Release*. 2006. V. 116. № 1. P. 1–27.
49. J.H. Eldrige, J.K. Staas, J.A. Meulbroek, T.R. Tice, R.M. Gilley. Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system // *Mol. Immunol*. 1991. V. 28. P. 287–290.
50. J.H. Eldrige, J.K. Staas, J.A. Meulbroek, T.R. Tice, R.M. Gilley. Biodegradable and biocompatible poly (dl-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for Staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies // *Infect. Immun*. 1991. V. 59. P. 2978–2983.
51. M. Singh, J. Kazzaz, M. Ugozzoli, P. Malyala, J. Chesko, D.T. O'Hagan. Polylactide-co-glycolide microparticles with surface adsorbed antigens as vaccine delivery systems // *Curr. Drug. Deliv*. 2006. V. 3. P. 115–120.
52. L.D. Falo Jr., M. Kovacsovics-Bankowski, K. Thompson, K.L. Rock. Targeting antigen into the phagocytic pathway in vivo induces protective tumour immunity // *Nat. Med*. 1995. V. 1. P. 649–653.
53. T. Fifis, A. Gamvrellis, B. Crimeen-Irwin, G.A. Pietersz, J. Li, P.L. Mottram et al. Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors // *J. Immunol*. 2004. V. 173. P. 3148–3154.
54. J.P. Scheerlinck, S. Gloster, A. Gamvrellis, P.L. Mottram, M. Plebanski. Systemic immune responses in sheep, induced by a novel nano-bead adjuvant // *Vaccine*. 2006. V. 24. P. 1124–1131.
55. A.F. Antonis, C.J. Brusckhe, P. Rueda, L. Maranga, J.I. Casal, C. Vela et al. A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure // *Vaccine*. 2006. V. 24. P. 5481–5490.
56. S.L. Young, M. Wilson, S. Wilson, K.W. Beagley, V. Ward, M.A. Baird. Transcutaneous vaccination with virus-like particles // *Vaccine*. 2006. V. 24. P. 5406–5412.
57. K. Dell, R. Koesters, M. Linnebacher, C. Klein, L. Gissmann. Intranasal immunization with human papillomavirus type 16 capsomeres in the presence of non-toxic cholera toxin-based adjuvants elicits increased vaginal immunoglobulin levels // *Vaccine*. 2006. V. 24. P. 2238–2247.
58. C. Heufler, F. Koch, G. Schuler. Granulocyte/macrophage colonystimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells // *J. Exp. Med*. 1988. V. 167. P. 700–705.
59. J.M. Lynch, D.E. Briles, D.W. Metzger. Increased protection against pneumococcal disease by mucosal administration of conjugate vaccine plus interleukin-12 // *Infect. Immun*. 2003. V. 71. P. 4780–4788.
60. C.P. Bradney, G.D. Sempowski, H.X. Liao, B.F. Haynes, H.F. Staats. Cytokines as adjuvants for the induction of anti-human immunodeficiency virus peptide immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies in serum and mucosal secretions after nasal immunization // *J. Virol*. 2002. V. 76. P. 517–524.
61. P.D. Cooper. Vaccine adjuvants based on gamma inulin // *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach* / Ed. by M.F. Powell, M.J. Newman. – New York: Plenum Press, 1995. P. 559–580.
62. P.D. Cooper, E.J. Steele. Algammulin: a new vaccine adjuvant comprising gamma inulin particles containing alum, preparation and in vitro properties // *Vaccine*. 1991. V. 9. P. 351–357.

63. P.D. Cooper, C. McComb, E.J. Steele. The adjuvanticity of algammaulin, a new vaccine adjuvant // *Vaccine*. 1991. V. 9. P. 408–415.
64. D.G. Silva, P.D. Cooper, N. Petrovsky. Inulin-derived adjuvants efficiently promote both Th1 and Th2 immune responses // *Immunol. Cell. Biol.* 2004. V. 82. P. 611–616.
65. N.K. Tong, J. Beran, S.A. Kee, J.L. Miguel, C. Sanchez, J.M. Bayas et al. Immunogenicity and safety of an adjuvanted hepatitis B vaccine in pre-hemodialysis and hemodialysis patients // *Kidney Int.* 2005. V. 68 P. 2298–2303.
66. S.L. Giannini, E. Hanon, P. Moris, M. Van Mechelen, S. Morel, F. Dessy, et al. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/ aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only // *Vaccine*. 2006. V. 24. P. 5937–5949.
67. D.M. Harper, E.L. Franco, C. Wheeler, D.G. Ferris, D. Jenkins, A. Schuid et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial // *Lancet*. 2004. V. 364. P. 1757–1765.
68. А.Н. Никифорова. Безопасность и иммуногенность тривалентной инактивированной гриппозной вакцины с новым адъювантом: дис. ... канд. биол. наук. – СПб. 2015. 136 с.
69. Р.В. Петров, Р.М. Хаитов, А.В. Некрасов, Р.И. Атауллаханов, Б.В. Пинегин, Н.Г. Пучкова, А.С. Иванова. Полиоксидоний – иммуномодулятор последнего поколения: итоги трехлетнего клинического применения // *Аллергия, астма и клиническая иммунология*. 1999. № 3. С. 3–6.
70. С.А. Кедик, А.А. Вагина, А.В. Панов, Е.С. Жаворонок, Е.В. Ворфоломеева, В.В. Суслов. Влияние различных факторов на коэффициент поглощения водных растворов сополимеров N-винилпирролидона с 2-метил-5-винилпирдином // *Химико-фармацевтический журнал*. 2015. Том 49. № 6. С. 47–50.
71. Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин. Основные принципы иммуномодулирующей терапии // *Аллергия, астма и клиническая иммунология*. 2000. № 1. С. 9–16.
72. Л.В. Крамарь, О.А. Карпухина, Ю.О. Хлынина. Современные возможности иммуномодулирующей и иммунокорректирующей терапии при инфекционных заболеваниях у детей // *Лекарственный вестник*. 2011. № 3(43). Т. 6. С. 15–23.
73. Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин. Современные представления о защите организма от инфекции // *Иммунология*. 2000. № 1. С. 7–13.
74. Патент РФ № 2073031. Производное поли-1,4-этиленпиперазина, обладающее иммуномодулирующей, противовирусной и антибактериальной активностью / А.В. Некрасов, Н.Г. Пучкова, А.С. Иванова и др. 1997.
75. Л.В. Лусс, М.П. Костинов. Проблемы терапии и профилактики гриппа: мифы об опасностях поствакцинальных реакций, результаты анализа поствакцинальных осложнений после прививки против гриппа у детей пермского края // *Иммунология*. 2009. № 1. С. 13–21.
76. Е.И. Бурцева, А.Н. Слепушкин, Е.Н. Власова и др. Опыт вакцинопрофилактики гриппа у лиц пожилого возраста. Сообщение I. Реагтогенность и иммуногенность инактивированных гриппозных вакцин // *Журн. Микробиол.* 2000. № 5. С. 44–45.
77. Г.А. Ельшина, М.А. Горбунов, В.И. Шерварли и др. Оценка эффективности гриппозной тривалентной полимерсубъединичной вакцины «Гриппол» // *Журн. Микробиол.* 1998. № 3. С. 40–43.
78. А.В. Некрасов, Н.Г. Пучкова. Полиоксидоний: основы синтеза и свойства // *Иммунология*. 2002. № 6. С. 329–333.
79. Ф.П. Сидельковская. Химия N-винилпирролидона и его полимеров. – М.: Наука, 1970. 328 с.
80. Ю.Э. Кирш. Поли-N-винилпирролидон и другие поли-N-виниламиды: синтез и физико-химические свойства. – М.: Наука, 1988. 236 с.
81. Полимеры медицинского назначения / Под ред. С. Манабу. – М.: Медицина, 1981. 218 с.
82. Н.А. Плате, А.Е. Васильев. Физиологические активные полимеры. – М.: Химия, 1986. 302 с.
83. Ю.В. Кочкина. Разработка технологии получения сополимера N-винилпирролидона с 2-метил-5-винилпирдином и разработка лекарственной формы на её основе: дис. ... канд. фарм. наук. – М. 2014. 139 с.
84. Патент РФ № 2415876 С1, МПК C08F226/10, A61K31/79. Сополимеры на основе N-винилпирролидона / С.А. Кедик, В.И. Свергун, Ю.В. Черта и др.; заявитель и патентообладатель С.А. Кедик. – № 2010105912/04; заявл. 19.02.2010; опубл. 10.04.2011, Бюл. № 10. – 10 с.
85. Патент РФ № 2459838 С1, МПК C08F226/10, A61K31/79. Сополимер, содержащий звенья N-винилпирролидона, 2-метил-5-винилпиридина и 4-винилпиридина / С.А. Кедик, А.В. Панов, Ю.В. Кочкина и др.; заявитель и патентообладатель С.А. Кедик. – № 2011140410/04; заявл. 05.10.2011; опубл. 27.08.2012, Бюл. № 24. – 13 с.
86. С.А. Кедик, А.В. Панов, И.В. Сакаева, Ю.В. Кочкина (Черта), Д.В. Еремин, В.В. Суслов. Синтез и молекулярно-массовые характеристики сополимеров N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина // *Химико-фармацевтический журнал*. 2012. Т. 46, № 8. С. 19–22.
87. Патент РФ № 2000004, МПК А 61К 31/79. Сополимеры 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона, обладающие иммуностимулирующим действием / С.А. Кедик, Е.К. Федоров, В.И. Свергун, В.А. Гаврилов, М.М. Зубаиров. – Заявл. 16.07.1992; опубл. 15.02.1993.
88. В.Г. Калистратов, С.А. Кедик, В.И. Свергун. Противолучевые и другие биологические свойства сополимера 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона // *Медицинская радиология*. 1993. Т. 38. № 10. С. 21–25.
89. Патент РФ № 2415876 С1, МПК C08F226/10, A61K31/79. Сополимеры на основе N-винилпирролидона / С.А. Кедик, В.И. Свергун, Ю.В. Черта и др.; заявитель и патентообладатель С.А. Кедик. – № 2010105912/04; заявл. 19.02.2010; опубл. 10.04.2011, Бюл. № 10. – 10 с.
90. Патент РФ № 2015993 С1, МПК C08F226/10, A61K31/79, C08F226/06. Сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона, обладающий противоопухолевой активностью / С.А. Кедик, В.И. Свергун, Е.И. Ярцев и др.; заявитель и патентообладатель фармацевтическая фирма «Ковидон». – № 5054916/05; заявл. 16.07.1992; опубл. 15.07.1994, Бюл. № 27-2000. – 10 с.