

УДК 547.596:615.291

Синтез производных растительных тритерпенов и исследование их противовирусной и иммуностимулирующей активности

А. Г. ПОКРОВСКИЙ¹, О. А. ПЛЯСУНОВА¹, Т. Н. ИЛЬЧЕВА¹, О. А. БОРИСОВА¹, Н. В. ФЕДЮК¹,
Н. И. ПЕТРЕНКО², В. З. ПЕТУХОВА², Э. Э. ШУЛЬЦ², Г. А. ТОЛСТИКОВ²

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор",
пос. Кольцово Новосибирской обл. 633159 (Россия)

²Новосибирский институт органической химии имени Н. Н. Ворожцова Сибирского отделения РАН,
проспект Академика Лаврентьева, 9, Новосибирск 630090 (Россия)

(Поступила 14.05.2001)

Аннотация

Приведены данные по противовирусной и иммуностимулирующей активности глицирретовой и бетулоновой кислот, а также их амидов и пептидов. Показана перспективность поиска ингибиторов ВИЧ в ряду исследованных соединений.

ВВЕДЕНИЕ

Широкий спектр биологической активности природных тритерпенов (противовоспалительная, противовирусная, противоопухолевая, иммуностимулирующая и т.д.) и доступность источников их получения определяют перспективность использования соединений этого класса для создания на их основе модифицированных производных и – далее – лекарственных препаратов [1]. К наиболее изученным соединениям этого класса относятся глицирризиновая кислота (ГК), получаемая из корня солодки, и бетулиновая кислота, входящая в состав коры березы.

Известна противовирусная активность ГК в отношении вирусов осповакцины, герпеса, иммунодефицита человека (ВИЧ-1) [2–4]. Показано, что химические трансформации молекулы ГК как по агликону, так и по углеводному фрагменту существенно влияют на свойства соединения, в частности на противовирусную активность, усиливая или ослабляя ее [5]. Несколько лет назад появились первые публикации о производных бетулиновой

кислоты как о новых ингибиторах ВИЧ в культуре клеток [6–8]. Исследователи показали, что простые химические трансформации соединений лупанового ряда (например, получение амидов, пептидов) влияют на способность соединения ингибировать репродукцию вируса в клеточных культурах. Авторам [6] удалось таким образом получить селективные высокоактивные ингибиторы ВИЧ-1 с индексами селективности более 200 (отношение концентрации соединения, вызывающей 50 % цитотоксический эффект, к его концентрации, вызывающей 50 % подавление размножения вируса), имеющие модификации, отличающиеся длиной латеральной цепи (количеством метиленовых групп) аминокислотного фрагмента. Предполагается, что антивирусное действие таких соединений обусловлено блокированием проникновения вируса в клетку [6]. Путем химической модификации бетулиновой кислоты авторы [8] получили еще более активные ингибиторы ВИЧ.

Среди тритерпенов найдены также высокоэффективные иммуностимуляторы, одним из которых является ISCOMs – иммуностиму-

лирующий комплекс, состоящий из антигена, холестерина, фосфолипидов и сапонинов южно-американского дерева *Quillaja saponaria* [9]. Фракция сапонинов, активирующая иммунный ответ (QuilA), представляет собой смесь тритерпеновых гликозидов [10]. Кроме того, иммуномодулирующей активностью обладает ГК [11].

Цель настоящей работы – синтез новых производных тритерпенов (глицирретовой и бетулоновой кислот) и исследование их противовирусной и иммуномодулирующей активности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследуемые соединения. Структуры исследованных соединений приведены на схеме 1. Глицирретовую кислоту (Ia) получали по методике [12], аминокислотные производные глицирретовой кислоты (Ib–n) – согласно [13]. Бетулин (IIa) выделяли из коры березы по методике [14], сукцинатные производные бетулина (IIb,с) получали согласно [15], бетулоновую кислоту (IIId) – окислением бетулина по методике [16], аминокислотные производные бетулоновой кислоты (IIe–i) – методами, описанными в [13]*. Для сравнения использовали моноаммонийную соль ГК (МКК), а также азидотимидин (АЗТ), полученный из Института молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН (Москва).

Клетки. Для оценки цитотоксичности и противовирусной активности исследуемых соединений использовали перевиваемую линию лимфоцитов человека МТ-4, высокочувствительную к вирусу иммунодефицита человека. Клетки культивировали на среде RPMI-1640, содержащей 10 % сыворотки плода коровы фирмы ICN, 0.06 % L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина и 60 мкг/мл линкомицина, с посевной концентрацией 5×10^5 клеток/мл в присутствии препаратов (экспериментальные образцы) либо в их отсутствие (контроль) в культуральных флаконах фирмы "Flow laboratories" при температуре 37 °C в течение 4 сут. В конце каждого пассажа

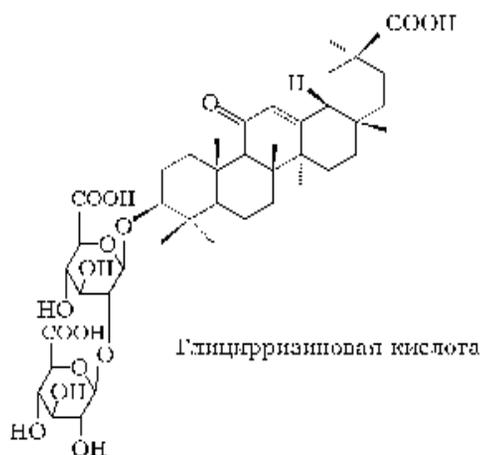
определяли концентрацию и долю жизнеспособных клеток в образце с помощью камеры Горяева после окрашивания клеток 0.4 % раствором трипанового синего. При исследовании противовирусной активности соединений в отношении вируса герпеса использовали эпителиальную культуру клеток человека Her-2 и клетки почки зеленой марьшанки Vero в среде Игла MEM с 5 % фетальной сыворотки (ICN), L-глутамином (300 мг/мл) и антибиотиками. Посевная доза составляла 150 тыс. клеток в 1 мл.

Вирусы. В работе использовали штамм ВИЧ-1/ЭВК (депонирован в Государственной коллекции вирусов № 4005), полученный из Института вирусологии (Москва) [17, 18]. Противовирусное действие исследовали также в отношении вируса простого герпеса 1-го типа (штамм L, полученный из American Tissue Culture Collection (ATCC)).

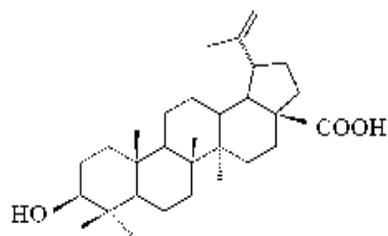
Оценка цитотоксичности соединений. Цитотоксичность исследуемых веществ изучали на культуре перевиваемых Т-лимфоцитов человека (линия МТ-4). Исследуемые соединения растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО), затем готовили последующие 10- и 2-кратные разведения. Аликвоты (1/100 конечного объема) соответствующих растворов веществ вносили в суспензию клеток (посевная концентрация составляла при этом 0.5×10^6 клеток/мл). Клетки культивировали и по окончании инкубации подсчитывали долю жизнеспособных клеток. Строили дозозависимую кривую и определяли концентрацию соединений, вызывающую гибель 50 % клеток (CD_{50}).

Оценка анти-ВИЧ активности соединений. Оценку анти-ВИЧ активности проводили по двум схемам, отличающимся временем внесения соединений в суспензию клеток: 1) после адсорбции вируса; 2) одновременно с вирусом. Клетки МТ-4 с концентрацией 2×10^6 клеток/мл инфицировали вирусосодержащим материалом с множественностью заражения 0.1–0.5 инфекционных единиц на клетку. Адсорбцию вируса проводили в течение 1 ч при 37 °C. По окончании адсорбции суспензию инфицированных клеток разводили полной ростовой средой до посевной концентрации и вносили препарат в рабочем разведении (по три повтора на каждое разведе-

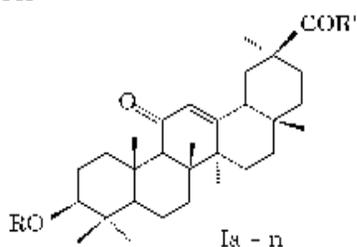
*Физико-химические свойства аминокислотных производных бетулоновой кислоты будут приведены в следующей публикации.



Глицирризиновая кислота



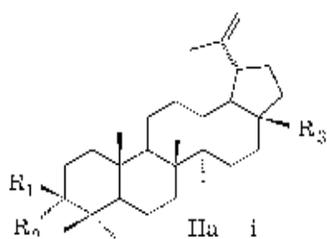
Бегулиновая кислота



Ia - n

- l R - H, R' - NH(CH₂)₈CONHCH₂COOH
- m R - H, R' - NH(CH₂)₈CONHCH(Ph)CH₂COOH
- n R - H, R' - NH(CH₂)₁₀COOH

- a R = H, R' = OH
- b R = H, R' = NHCH₂COOH
- c R = H, R' = NH(CH₂)₂COOH
- d R = H, R' = NH(CH₂)₃COOH
- e R = H, R' = NH(CH₂)₄COOH
- f R = H, R' = NH(CH₂)₅COOH
- g R = H, R' = NH(CH₂)₆COOH
- i R = H, R' = NH(CH₂)₇COOH
- j R = H, R' = NH(CH₂)₈COOH
- k R = Ac, R' = NH(CH₂)₁₁COOH



IIa - i

- g R₁R₂ = O, R₃ - CONH(CH₂)₈CONHCH(Ph)CH₂COOH
- i R₁R₂ = O, R₃ - CONH(CH₂)₁₀COOH

- a R₁ - OH, R₂ - H, R₃ - CH₂OH
- b R₁ - OCOC(CH₂)₃COOH, R₂ - H, CH₂O
- c R₁ - AcO, R₂ - H, R₃ - CH₂OCOC(CH₂)₃COOH
- d R₁R₂ = O, R₃ - COOH
- e R₁R₂ = O, R₃ - CONH(CH₂)₇COOH
- f R₁R₂ = O, R₃ - CONH(CH₂)₈COOH

Схема 1.

ние) до конечной концентрации от 0.00001 до 1 мкг/мл. В случае 2-го варианта соединения вносили в суспензию клеток одновременно с вирусом до конечной концентрации от 0.00001 до 1 мкг/мл, а после адсорбции вируса суспензию инфицированных клеток разводили полной ростовой средой, содержащей исследуемые соединения в тех же концентрациях. Далее экспериментальные (с исследуемым веществом) и контрольные (без добавления вещества и вируса) образцы инкубировали, как описано выше, и на 4-е сутки культивирования учитывали долю жизнеспособных клеток в пробах и оценивали анти-ВИЧ активность соединения по снижению уровня накопления

вирусного антигена р24 по сравнению с контролем.

На основании полученных результатов строили дозозависимые кривые и рассчитывали количественные характеристики ингибирования репродукции ВИЧ-1: ID₅₀ - концентрация соединения, при которой подавляется 50 % продукции вируса; PD₅₀ - концентрация соединения, при которой обеспечивается 50 % защита инфицированных клеток от вирусиндуцированного цитопатического действия (рассчитана, как описано нами ранее [18]); IS - индекс селективности, представляющий собой отношение токсичной дозы соединения CD₅₀ к его эффективной дозе ID₅₀

или PD_{50} . Уровень вируспродукции в экспериментальных и контрольных образцах оценивали путем количественного определения вирусоспецифического белка р24 иммуноферментным методом [19].

Оценка активности тритерпенов в отношении вируса герпеса. Соединения растворяли в диметилсульфоксиде до концентрации 10 мг/мл и хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, а непосредственно перед работой доводили до рабочей концентрации культуральной средой.

При исследовании противовирусного действия в лунки культурального 96-луночного планшета с культурой вносили вирус в дозе 10^5 – 10^6 ID_{50} одновременно с исследуемым соединением, адсорбцию вируса проводили в течение 1 ч при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в атмосфере 5 % CO_2 , питательную среду с препаратом вносили в культуральный планшет сразу после адсорбции вируса. Клетки инкубировали при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в атмосфере CO_2 в течение 3–4 сут.

Токсическое действие веществ оценивали по жизнеспособности клеток при инкубировании в присутствии исследуемого соединения. Защиту клеток определяли по их жизнеспособности в присутствии препарата и вируса. Жизнеспособность клеток оценивали колориметрическим методом с использованием тетразолиевой соли МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазолил)-2,5-дифенилтетразолия) или окрашиванием клеток генцианвиолетом.

Относительную степень защиты инфицированных клеток от гибели рассчитывали по формуле

$$(A-O) / (B-O) \times 100$$

где A – доля жизнеспособных инфицированных клеток в присутствии препарата, B – доля жизнеспособных клеток в контрольной группе, O – доля жизнеспособных инфицированных клеток в отсутствие препарата (контроль вируса).

Иммуностимулирующую активность (адьювантные свойства) соединений исследовали с помощью метода Т-розеток [20]. В работе использовали мышей массой 20–22 г. Животных иммунизировали подкожно в области шейной складки смесью взвеси эритроцитов барана (ЭБ) (10^7 на мышь) с 200 мкг (10 мг/кг) исследуемого препарата в 0.5 мл физиологического раствора. Для каждого пре-

парата были взяты группы по 4 мыши. Одна группа была иммунизирована таким же количеством эритроцитов, не содержащим исследуемого вещества, контрольная группа – неиммунизированные мыши.

На 6-й день после иммунизации из селезенки мышей готовили суспензию лимфоидных клеток. Селезенки протирали через металлическое сито, суспендировали в среде RPMI-1460, затем промывали трижды в той же среде, каждый раз центрифугируя при 2000 об/мин в течение 10 мин. Конечная концентрация составляла 10^7 живых клеток в 1 мл.

Смесь 0.9 мл суспензии лимфоцитов и 0.1 мл суспензии эритроцитов перемешивали и инкубировали при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 16 ч. После инкубации добавляли по 4 мл холодной среды, осторожно, но тщательно перемешивали, пипеткой с широким носиком отбирали 100 мкл суспензии, смешивали с таким же количеством краски (трипановый синий) и считали количество розеток в камере Горяева. За розетку принимался лимфоцит с тремя и более эритроцитами, адсорбированными на его поверхности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При первичном скрининге соединений, проводимом по 1-й схеме, когда вещества вносили в заранее ВИЧ-инфицированные клетки МТ-4 (через 1 ч после добавления вируса к клеткам), анти-ВИЧ активность проявили два соединения из первой группы (Ia и Ik) и четыре вещества лупанового ряда (IIa, IIe, IIf и IIg). Количественные характеристики ингибирования ВИЧ-1 в клетках МТ-4 (CD_{50} , ID_{50} , IS) для этих соединений представлены в табл. 1. Видно, что большая часть полученных производных не проявила заметного ингибирующего действия при данных условиях эксперимента, так как в диапазоне нетоксичных для клеток концентраций не достигала 50%-го ингибирования накопления вирусного антигена р24. Интересно отметить, что активными оказались преимущественно производные с длиной латеральной цепи, равной 7, 8. В отличие от всех исследованных соединений дипептид IIg проявил защит-

ТАБЛИЦА 1

Анти-ВИЧ активность производных растительных тритерпенов

Соединение	CD ₅₀ , мкМ	Ингибирование накопления p24		IS
		ID ₅₀ , мкМ	ID ₉₀ , мкМ	
Ia	85.1	3.2	Н/д	26.7
Ib	40.8	Н/д	»	-
Ic	70.2	»	»	-
Id	57.7	»	»	-
Ie	58.0	»	»	-
If	61.8	»	»	-
Ig	>67.0	»	»	-
I	26.2	»	»	-
Ij	97.6	»	»	-
Ik	27.0	2.9	»	9.3
I	28.6	Н/д	»	-
Im	31.0	14.4	»	2.2
In	44.4	10.2	»	4.35
IIa	>90.5	4.3	90.5	>21
IIb	>62.2	Н/д	Н/д	-
IIc	17.1	»	»	-
IId	>44.1	»	»	-
IIe	42.0	3.0	»	14.0
IIf	32.8	2.8	7.4	11.7
IIg	5.6	0.4	Н/д	14.0
IIh	48.9	11.8	»	4.1
A3T	40.0	0.014	0.062	2857
MГK	2542	57	96	44.6

Примечание. Н/д - не достигается.

ное действие (ID₅₀ = 0.4 мкМ, или 0.3 мкг/мл; IS = 14). Производные с длиной латеральной цепи меньше или больше 7, 8 проявили незначительный ингибирующий эффект.

С учетом известных данных об ингибировании производными бетулиновой кислоты ранних стадий вирусной репродукции [6] была исследована анти-ВИЧ активность этих соединений при их одновременном добавлении с вирусом к клеткам МТ-4 по 2-й схеме. Данные эксперимента приведены в табл. 2. Следует отметить, что важной характеристикой противовирусной активности соединения являются концентрации, при которых происходит 50 и 90 % ингибирование накопления вируса. Как видно из табл. 2, при этих условиях эксперимента эффективность противовирусного действия всех препаратов очень

ТАБЛИЦА 2

Анти-ВИЧ действие производных тритерпенов при одновременном внесении с вирусом в культуре клеток МТ-4

Соединение	Ингибирование накопления p24		IS
	ID ₅₀ , мкМ	ID ₉₀ , мкМ	
Ia	0.43	42.55	198
Ik	0.0031	15.3	8887
IIa	0.0045	Н/д	>20111
IId	0.132	19.82	>334
IIf	1.31	14.76	25
IIg	0.0026	0.198	2135
MГK	62	105	41

высока: для большинства из них индексы селективности на 2-3 порядка превышают таковые при использовании 1-й схемы. Сравнение этих характеристик позволяет более детально оценить эффективность соединений. Интересно отметить, что соединение IIa (см. табл. 2) вызывает 50 % ингибирование накопления вирусного антигена в очень низкой концентрации (0.0045 мкМ), но его максимальный ингибирующий эффект составляет 60 % даже при концентрации более 22 мкМ. Наиболее эффективным в этой группе оказался дипептид IIg, который обеспечивает 50 % ингибирование репродукции вируса при концентрации 2.6 нМ. Кроме того, это соединение эффективно защищает клетки от вирусиндуцированного цитопатического действия (PD₅₀ = 0.029 мкМ, IS = 191).

Приведенные данные позволяют предположить, что основное анти-ВИЧ действие полученных нами производных тритерпенов связано с их влиянием на ранние этапы цикла репродукции вируса, следующие сразу за связыванием вируса с клеткой. Это предположение подтверждается данными авторов [6], которые в серии экспериментов доказали такой механизм действия для производного бетулиновой кислоты RPR 103611. Другое объяснение значительного повышения эффективности действия препарата при его раннем добавлении может быть связано с особенностями проникновения соединения в клетки. В случае медленной скорости проникновения соединения его эффективность будет существенно возрастать при предварительном добавлении препарата к клеткам.

По сравнению с ГК и МГК анти-ВИЧ индекс селективности для наиболее активных синтезированных соединений увеличился в 50–200 раз. Кроме того, следует отметить, что низкие ингибирующие концентрации этих соединений (в 1000 раз и более ниже по сравнению с МГК) открывают перспективу для их перорального применения при терапии ВИЧ-инфекции. Так, один из недостатков терапии вирусных инфекций ГК – необходимость внутривенного введения препарата для достижения высокой концентрации в крови, необходимой для проявления противовирусной активности.

Данные по изучению активности исследуемых соединений в отношении вируса простого герпеса 1-го типа представлены в табл. 3.

Оказалось, что наиболее активное в отношении ВИЧ-1 соединение IIg обладает противовирусной активностью в отношении вируса простого герпеса. Заслуживает внимания достаточно высокая активность дипептида глицирретовой кислоты (Im) в отношении этого вируса.

Данные исследования иммуностимулирующей активности полученных соединений приведены в табл. 4. Установлено, что соединения IIд, IIг и Ik оказывают выраженное иммуностимулирующее действие, сравнимое с эффектом ГК и превышающее иммуностимулирующий эффект неполного адьюванта Фрейнда. Двукратная стимуляция иммунного ответа этими соединениями показывает перспективность их дальнейшего исследования с использованием других антигенов, в том числе коммерческих вакцин.

Таким образом, среди исследованных нами модифицированных производных глицирретовой и бетулоновой кислот найдены соединения с высокой анти-ВИЧ активностью. В отличие от ГК исследованные соединения не

ТАБЛИЦА 3

Противовирусная активность тритерпенов в отношении вируса герпеса 1-го типа

Соединение	CD ₅₀ , мкМ	ID ₅₀ , мкМ	IS
IIд	4.4	2.2	2
IIг	26.4	0.66	40
I	45.0	н/д	–
Im	32.7	1.3	25.15

ТАБЛИЦА 4

Адьювантные свойства тритерпенов

Препарат	Количество розеток на 10 ³ клеток	Индекс иммуногенности
Контроль		
(до иммунизации)	2±0.8	
ЭБ без препарата	12±2.9	1
НАФ	18±0.1	1.5
ГК	24±1.1	2
Ia	18±1.2	1.5
Ik	23±0.7	1.9
I	20±0.8	1.67
In	9±0.1	0.75
IIa	19±0.2	1.6
IIc	17±0.1	1.4
IIд	24±0.7	2
IIе	12±0.1	1
IIг	21±1.4	1.75

Примечание. ЭБ – смесь эритроцитов барана; НАФ – неполный адьювант Фрейнда.

обладают противовирусной активностью в отношении аденовируса и вируса кори (данные не приведены). Высокие значения индекса селективности для дипептидов глицирретовой и бетулоновой кислот в отношении вируса простого герпеса (>25) свидетельствует о перспективности поиска противовирусных препаратов с антигерпетической активностью среди соединений этой группы. Между тем значительное различие в активности одних и тех же соединений против разных вирусов указывает на специфичность воздействия веществ. Для соединения IIг установлено существенное уменьшение (в 23 846 раз) эффективной дозы, обеспечивающей 50 % ингибирование репродукции ВИЧ, по сравнению с МГК (0.0026 и 62 мкМ соответственно) (см. табл. 2). Эти данные могут быть объяснены различным механизмом действия сравниваемых соединений. В пользу такого предположения свидетельствует сохранение анти-ВИЧ активности МГК при ее внесении после адсорбции вируса, в то время как при добавлении по этой схеме соединения IIг его активность снижается в 154 раза. Возможно, что в отличие от МГК, антивирусная активность которого, как предполагается, обеспечивает

ся за счет ингибирования препаратом клеточных протеинкиназ, участвующих в этапах проникновения различных вирусов в клетки и активации вирусных ферментов [21], соединение IIg воздействует непосредственно на вирусные белки. Именно за счет этого значительно повышается эффективность препарата при его добавлении одновременно с вирусом.

Механизм иммуностимулирующего действия исследованных соединений может быть связан со стимуляцией лимфоцитов разных классов, обусловленной в свою очередь влиянием соединений на синтез цитокинов, например интерлейкина-2, как это установлено для ГК [22]. Кроме того, показано влияние некоторых тритерпенов на синтез интерферона-гамма, интерлейкина-1, фактора некроза опухоли-альфа [23].

Дальнейшее исследование влияния различных трансформаций на биологические свойства производных растительных тритерпенов и изучение механизмов их противовирусного и иммуномодулирующего действия, на наш взгляд, позволило бы в дальнейшем осуществлять направленный дизайн и создавать химически модифицированные соединения с заданными свойствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Г. А. Толстиков, Л. А. Балтина, Э. Э. Шульц, А. Г. Покровский, *Биоорганическая химия*, 23 (1997) 691.
- 2 R. Pompei, O. Flore, M. A. Marccialis et al., *Nature*, 281 (1979) 689.
- 3 M. Ito, H. Nakashima, M. Baba et al., *Antiviral Res.*, 7 (1987) 127.
- 4 M. Baba, S. Shigeta, *Ibid.*, 7 (1987) 99.
- 5 О. А. Плясунова, И. Н. Егоричева, Н. В. Федюк и др., *Вопросы вирусологии*, (1992) 235.
- 6 J.-F. Mayaux, A. Bousseau, R. Pauwels et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 (1994) 3564.
- 7 T. Fujioka, Y. Kashiwada, R. E. Kilkuskie et al., *J. Nat. Prod.*, 57 (1994) 243.
- 8 Y. Kashiwada, F. Hashimoto, L. M. Cosentino et al., *J. Med. Chem.*, 39 (1996) 1016.
- 9 G. F. A. Kersten, D. J. A. Crommelin, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1241 (1995) 117.
- 10 S. Chavali, Th. Francis, J. Campbell, *Int. J. Immunopharmacol.*, 9 (1987) 675.
- 11 А. Г. Покровский, Т. Н. Ильичева, Т. Р. Проняева и др., *ДАН*, 369 (1999) 414.
- 12 Sh. Shibata, K. Takanashi, S. Yano et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 35 (1987) 1910.
- 13 Н. И. Петренко, В. З. Петухова, М. М. Шакиров и др., *Журн. орган. химии*, 36 (2000) 1013.
- 14 G. R. Pettit, V. Green, W. J. Bowyer, *J. Org. Chem.*, (1961) 2879.
- 15 О. Б. Флехтер, Л. Т. Карачурина, В. В. Поройков и др., *Биоорганическая химия*, 26 (2000) 215.
- 16 S. H. L. Kim Darrick, Z. Chen, V. T. Nguyen et al., *Synth. Commun.*, 27 (1997) 1607.
- 17 Э. В. Карамов, Б. Н. Богомолов, В. М. Жданов, *Обзор центров, сотрудничающих с ВОЗ по вирусным инфекциям*, (1986) 4.
- 18 F. P. Svinarchuk, D. A. Konevets, O. A. Pliasunova et al., *Biochimie*, 75 (1993) 243.
- 19 Н. В. Федюк, Е. Е. Коновалов, В. Б. Локтев и др., *Вопросы вирусологии*, (1992) 135.
- 20 J. Wybran, A. Govaerts, H. Fudenberg, *Int. Arch. Allergs Appl. Immunol.*, 55 (1977) 148.
- 21 S. Harada, T. Maekawa, E. Haneda et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 21 (1998) 1282.
- 22 Y. H. Zhang, K. I. Isobe, F. Nagase et al., *Immunology*, 79 (1993) 528.
- 23 Y. H. Zhang, M. Kato, K. I. Isobe et al., *Cell. Immunol.*, 162 (1995) 97.