



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60383 (13) U

(51) МПК

C07K 1/12 (2006.01)

A61K 38/01 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ НА ОСНОВІ МОДИФІКОВАНИХ ОЛІГОПЕПТИДІВ З АНТИВІРУСНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

1

2

(21) u201003810

(22) 02.04.2010

(24) 25.06.2011

(46) 25.06.2011, Бюл.№ 12, 2011 р.

(72) МАРТИНОВ АРТУР ВІКТОРОВИЧ, СМІЛЯН-СЬКА МАЙЯ ВОЛОДИМИРІВНА, ПЕРЕМОТ СВІТЛАНА ДМИТРІВНА

(73) МАРТИНОВ АРТУР ВІКТОРОВИЧ, СМІЛЯН-СЬКА МАЙЯ ВОЛОДИМИРІВНА, ПЕРЕМОТ СВІТЛАНА ДМИТРІВНА

(57) 1. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями, який **відрізняється** тим, що спочатку проводять ферментативний гідроліз білків а потім проводять процес хімічної модифікації отриманих пептидів та використовують отриману суму модифікованих олігопептидів для застосування у лікуванні вірусних інфекцій людей і тварин.

2. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за п. 1, де як білок-об'єкт для ферментативного гідролізу використовують молоко.

3. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за п. 1, де як білок-об'єкт для ферментативного гідролізу використовують яєчний білок.

4. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за п. 1, де як білок-об'єкт для ферментативного гідролізу використовують суміш білків за пп. 2, 3.

5. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-4, де як фермент для ферментативного гідролізу білків використовується пепсин.

6. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-4, де як фермент для ферментативного гідролізу білків використовується трипсин.

7. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-4, де як фермент для ферментативного гідролізу білків використовується хімотрипсин.

8. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-4, де як фермент для ферментативного гідролізу білків використовується папаїн.

9. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-4, де як фермент для ферментативного гідролізу білків використовується протеїназа К.

10. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-4, де як фермент для ферментативного гідролізу білків використовується клострипаїн.

11. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-4, де як фермент для ферментативного гідролізу білків використовується тромбін.

12. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-4, де як фермент для ферментативного гідролізу білків використовується термолізін.

13. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-4, де як фермент для ферментативного гідролізу білків використовується еластаза.

14. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-4, де як ферменти для ферментативного гідролізу білків використовується сума ферментів за пп. 12-20.

15. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-14, де як модифікуючий агент для проведення процесу ацилювання

(13) U
(11) 60383
(19) UA

отриманих олігопептидів використовується оцтовий ангідрид.

16. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-14, де як модифікуючий агент для проведення процесу ацилювання отриманих олігопептидів використовується пропіоновий ангідрид.

17. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-14, де як модифікуючий агент для проведення процесу ацилювання отриманих олігопептидів використовується бутановий ангідрид.

18. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-14, де як модифікуючий агент для проведення процесу ацилювання отриманих олігопептидів використовується оцтово-пропіоновий ангідрид.

19. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-14, де як модифікуючий агент для проведення процесу ацилювання отриманих олігопептидів використовується оцтово-бутановий ангідрид.

20. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-14, де як модифікуючий агент для модифікації суми отриманих олігопептидів використовується бурштиновий ангідрид.

21. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-14, де як модифікуючий агент для модифікації суми отриманих олігопептидів використовується малеїновий ангідрид.

22. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-14, де як модифікуючий агент для модифікації суми отриманих олігопептидів використовується цис- і транс- аконітовий ангідрид.

23. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивіру-

сними властивостями за пп 1-14, де як модифікуючий агент для модифікації суми отриманих олігопептидів використовується глутаровий ангідрид.

24. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-14, де як модифікуючий агент для модифікації суми отриманих олігопептидів використовується фталевий ангідрид.

25. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-14, де як модифікуючий агент для модифікації суми отриманих олігопептидів використовується лимонний ангідрид.

26. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-14, де як модифікуючий агент для модифікації суми отриманих олігопептидів використовується ізолимонний ангідрид.

27. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-14, де як модифікуючий агент для модифікації суми отриманих олігопептидів використовується ацетилхлорид.

28. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-14, де як модифікуючий агент для модифікації суми отриманих олігопептидів використовується ацетилфторид.

29. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-14, де як модифікуючий агент для модифікації суми отриманих олігопептидів використовується пропіонілхлорид.

30. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-14, де як модифікуючий агент для солеутворення із сумою отриманих олігопептидів використовується бурштинова кислота.

31. Спосіб отримання фармацевтичної композиції на основі модифікованих олігопептидів з антивірусними властивостями за пп. 1-14, де як модифікуючий агент для солеутворення із сумою отриманих олігопептидів використовується лимонна кислота.

Корисна модель відноситься до ветеринарії та медицини, а конкретно до вірусології, та може бути використаний в лікуванні вірусних інфекцій тварин та людини.

Вірусні хвороби складають більш 90 % всієї зареєстрованої інфекційної патології. Але противірусних засобів, які впроваджені у виробництво, дуже мало. Такі речовини часто мають токсичні властивості, невеликий спектр дії, до них швидко з'являється ефект звикання. Таким чином, розробка противірусних засобів, які б не мали токсичних властивостей, були ефективними в лікуванні широкого спектру вірусних інфекцій, є актуальною задачею сучасної медицини. Зараз відомо дуже мало речовин, які б мали лікувальну дію на всіх етапах вірусної інфекції. Окрім інтерферонів та їх індукторів ще не відомо таких речовин, які б одно-

часно обіймали лікувальні та противірусні властивості відносно широко розповсюджених вірусних захворювань - СНІДу, герпесу, грипу та ін. Найбільш відомим засобом для лікування грипу є ремантадин [1]. Це речовина, яка блокує тільки етап проникнення вірусу в клітину і ранню стадію специфічної репродукції, не діє на патогенез захворювання. Довготривале використання цього препарату неможливе, бо він має нейротропні ефекти та може викликати галюцинації, порушувати функції мозку завдяки гальмуванню проведенню імпульсу по нервовому волокну.

Серед інших речовин, ефективних у лікуванні грипу, відомий лейкоцитарний α -інтерферон [2]. Цей білок синтезується в активованих лейкоцитах людини. Він має здатність викликати резистентність до грипу у клітин епітелію носоглотки. Але

його лікувальні властивості дуже незначні. Він малоефективний на 2-6-й день захворювання грипом та є профілактичним засобом. Рекombінантні інтерферони мають велику вартість та часто призводять до алергічних реакцій. Окрім того, з розвитком захворювання ефективність інтерферонотерапії зменшується, а резистентність вірусу до інтерферону збільшується.

Найближчим прототипом речовини, що патентується, є модифіковані білки та їх використання для контролю вірусних інфекцій [3]. Це оброблені різними ангiдридами та ацилюючими засобами білки: альбуміни, лактоферін, трансферін, лактальбумін. Автори запатентували також механізм дії цих білків - гальмування вірусної адгезії. Ці білки повинні мати молекулярну масу більше 60000 з невеликим коливанням. Показана значна цитопротекторна дія цих білків в дослідях на культурах клітин. Речовини проявили активність відносно вірусів СНІДу (людини та мавпи), грипу, цитомегаловірусу, поліовірусу, вірусу лісу Селміки, вірусу Сендай, парогрипу, Коксаки вірусу. Автори показали, що ацильовані білки нетоксичні і можуть захищати тварин проти інфікування вірусами.

Прототип має ряд недоліків: він є суто профілактичним засобом (на клітини, що вже інфіковані вірусом такі білки впливу не мали) та не має лікувальних властивостей у інфікованих тварин. У зв'язку з тим, що прототип є високомолекулярним білком, він може бути використаний тільки парентерально.

В основу корисної моделі поставлена задача синтезувати суміш хімічно модифікованих олігопе-

птидів з протівірусними властивостями та з новим механізмом дії, використання яких дозволить значно збільшити ефективність лікування та скоротити терміни лікування вірусних захворювань, таких як грип та герпесвірусні інфекції.

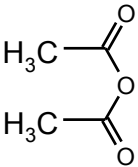
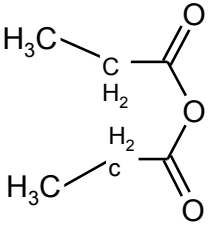
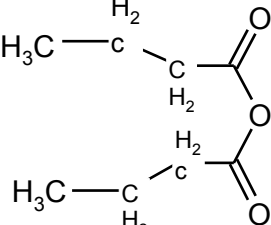
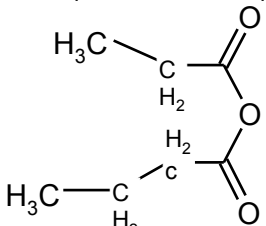
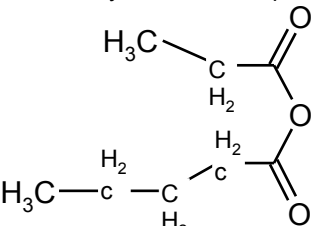
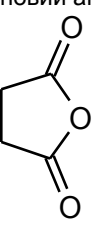
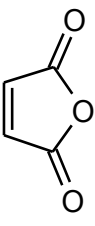
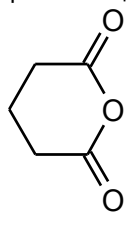
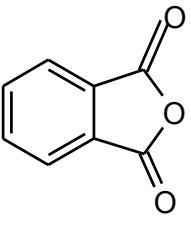
Поставлена задача вирішується шляхом синтезу хімічно модифікованих пептидів, а також їх використання для контролю вірусних інфекцій, спосіб синтезу відрізняється тим, що спочатку проводять ферментативний гідроліз білків а потім проводять процес хімічної модифікації отриманих пептидів та використовують отриману суму модифікованих олігопептидів для застосування у лікуванні вірусних інфекцій людей і тварин.

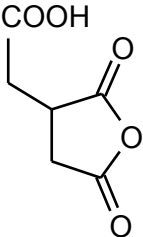
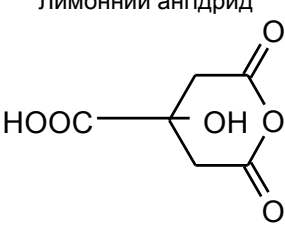
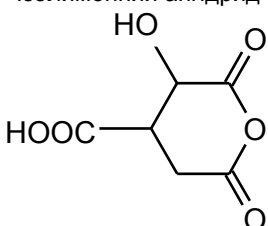
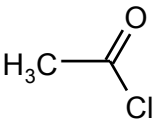
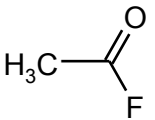
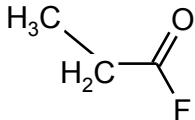
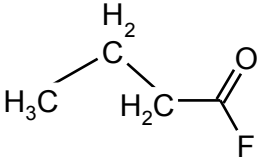
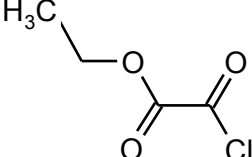
Синтезовані модифіковані олігопептиди здатні гальмувати активність гетеродимеру α - β - імпортинів клітини, які транспортують вірусні полінуклєотиди з цитоплазми до ядра [4]. Відповідно гальмування цих транспортних білків призведе до блокади вірусів, реплікація яких залежних від функцій ядра клітини. Окрім того, препарат ефективний при пероральному застосуванні.

Для синтезу (ацилювання/алкилювання, солеутворення) можуть бути використані такі субстрати: молоко (М), яєчний білок (ЯБ), їх суміш (СБ).

Для ферментативного гідролізу можуть бути використані пепсин, трипсин, хімотрипсин, папаїн, протеїназа К, клострипаїн, тромбін, термолізін, еластаза.

Як ацилюючі агенти в синтезі можуть бути використані:

<p>Оцтовий ангiдрид</p> 	<p>Пропіоновий ангiдрид</p> 	<p>Бутановий ангiдрид</p> 
<p>Оцтово-пропіоновий ангiдрид</p> 	<p>Оцтово-бутановий ангiдрид</p> 	<p>Бурштиновий ангiдрид</p> 
<p>Малеїновий ангiдрид</p> 	<p>Глутаровий ангiдрид</p> 	<p>Фталевий ангiдрид</p> 

Цис- і транс- аконітовий ангідриди 	Лимонний ангідрид 	Ізолимонний ангідрид 
Ацетил хлорид 	Ацетилфторид 	Пропіонілхлорид 
Бутіроїлхлорид 	Етоксіоксалілмонохлорид 	

В експерименті була підтверджена ефективність препарату при грипі, герпесі, на моделях *in vivo* та *in ovo*, що описані нижче.

Приклад 1. Спосіб отримання суміші модифікованих пептидів (МП) з антивірусними властивостями, що здатні до самоорганізації на імпортині В асептичних умовах 500 мг сухого молока розчиняють в 50 мл підігрітої дистильованої води, додають 5 мг папаїну, залишають розчин на 3-45 годин, спостерігається гідроліз білків молока з утворенням суміші пептидів. До цієї суміші додають 501-2000 мг бурштинової кислоти, перемішують при температурі 16-65 °C 20 хвилин. Суміш пропускають через мембранні фільтри з метою стерилізації та розливають у скляні флакони.

Приклад 2. Підтвердження механізму дії АП. Універсальним білком, який транспортує вірусний полінуклеотид (РНК чи ДНК) до ядра клітини, є гетеродимер α - β - імпортинів [8]. Основний транспортний компонент цієї системи β - імпорт має консервативну сигнальну послідовність амінокислот, яку впізнають білки ядерної пори та відкривають її для проходження комплексу нуклеопротейд-транспортний білок.

Отримана сума кислих ацильованих олігопептидів (АП) блокує саме цю сигнальну послідовність.

Для підтвердження механізму дії АП ми використовували ДНК вірусу простого герпесу 1 типу штам Л-2. ДНК виділяли за відомою методикою [5]. Кон'югацію ДНК з частинками колоїдного золота проводили за методом [6]. Отриманий комплекс вводили до ліпосом за методом [7]. Докладно експеримент був описаний з вірусом SV40 мавпи в [8].

Такі ліпосоми зливалися з мембранами клітин з культури курячих фібробластів. Після об'єднання ліпосом з мембраною клітин, ДНК вірусу з частками золота потрапляла до цитоплазми.

Гетеродимер α - β - імпортинів переносив колоїдні частки з полінуклеотидом до ядерних пор.

Якщо клітини інкубували з АП, що патентуються, то накопичення часток колоїдного золота на ядерних порах не спостерігалось. Всі частки рівномірно розподілялися по цитоплазмі клітин. В цьому випадку цитопатичної дії вірусу не спостерігалось.

Таким чином, спроектована та синтезована сума олігопептидів гальмує постачання вірусної ДНК в клітинне ядро, що і необхідно було підтвердити.

Приклад 3. Підтвердження лікувальної дії МП на білих мишах з герметичним енцефалітом.

20 білих мишей Balb-C інфікували внутрішньочеревно летальною дозою 0,01 мл 7,0 Іg ВПГ1 штам Л2. Через 2 доби у більшості тварин з'явилися ознаки енцефаліту: порушення рухової активності, зменшення споживання їжі, судом. Лікування починали на другу добу після інфікування. АП використовували перорально в дозі 10 мг/кг ваги тварин два рази на добу 5 діб. Як контроль використовували інфікованих тварин (20 голів), яким давали 0,9 % розчин натрію хлориду (вводився перорально в тому ж об'ємі). Основним критерієм ефективності препарату був відсоток тварин в основній групі, що вижили на 17 добу, проти контролю.

В дослідній групі тварин, яким давали препарат, загинуло тільки 2 тварини з 20 (10 %), тоді як в контрольній групі загинуло 18 з 20 тварин (90 %). На другий день після початку лікування АП симптоми герпетичного енцефаліту зникали. Таким чином, препарат мав чіткий терапевтичний ефект у лікуванні герпетичного енцефаліту у мишей.

Приклад 4. Лікувальна дія препарату на моделі герпетичного офтальмо-герпесу (ОГ) у кролів

Найбільш зручними для відтворення ОГ і оцінки ефективності хіміопрепаратів є моделі герпетичного кератиту і кератокон'юнктивіту у кролів [9]. ВПГ-1 штам Л2 використовували у вигляді культуральної рідини зараженої культури клітин Нер-2.

Максимальне значення інфекційного титру складало 5,0-5,5 1lgLD50/0,03мл.

Використовували кролів обох статей вагою 2,5 кг. Для створення моделі ОГ очі кролям промивали фізіологічним розчином і обезболювали дикаїном, закапуючи його у кон'юнктиву. ВПГ-1 у інфекційній дозі (6-7 крапель) наносили на скарифіковану рогівку. Контроль склали дві групи тварин: інфіковані тварини, яким вводили 0,9 % розчин натрію хлориду та група тварин, яким вводили препарат з прототипу.

Інтенсивність клінічної симптоматики ОГ кроликів оцінювали по 4-бальній системі для кожного симптому, які потім сумували. Оцінку ефективності хіміопрепаратів проводили з врахуванням різниці у виразності симптоматики (СІВС в балах) у досліді і контролі.

СІВС у контролі (неліковані тварини) приймали за 100 %.

Препарат вводили через 48 годин після інфікування в дозі 0,01 г препарату на кроля 3 рази на добу перорально в розчині на дистильованій воді. Аналогічно, але парентерально (у вушну вену) вводили препарат з прототипу та 0,9 % розчин натрію хлориду.

У 90 % кролів контрольної групи виразність лише кон'юнктивіту становила 3-4 бали. Тривалість симптоматики - в середньому становила 21 день. Максимального розвитку вона досягала на 4-8 день (СІВС рівні 8-10 балам).

Критеріями оцінки лікувального ефекту препаратів були: а) зменшення виразності клінічної симптоматики; б) скорочення тривалості захворювання; в) запобігання летального менінгоенцефаліту. Дані про ефективність досліджуваних препаратів представлені у таблиці 1.

Таблиця 1

Ефект лікування хворих кролів МП

Назва препарату	Кількість тварин	Тривалість захворювання (дні)	СІВС (бали)
МП	7	1,5+ 2,5*	36,3 ± 4,8
Контрольний препарат з прототипу	7	25,5 ± 2,5*	100±2
Нелікований контроль	5	26 ± 2,5**	109,2±2,2

*P<0,001 **P<0,01

Як видно з таблиці, застосування препарату, що патентується, призводило до зниження в 2 рази виразності клінічних проявів хвороби у порівнянні з інфікованими, але не лікованими тваринами. При його застосуванні спостерігалось не тільки зниження інтенсивності симптоматики, тривалості захворювання в 3 рази, а і відсутність загибелі тварин. СІВС у групі, де використовувався препарат був вдвічі меншим за СІВС у групі контролю. Тоді як речовина з прототипу, використана в тій же дозі парентерально (внутрішньовенно в вушну вену) не впливала на терміни життя та тривалість захворювання.

Приклад 5. Дослідження протигрипозних властивостей МП на моделі in ovo

В досліді використовували штаб вірусу грипа-А/Гонконг/95(Н3N2). Всього в досліді використовували 60 штук 9-11 добових курячих ембріонів.

Використовували по 20 ембріонів на кожний дослід: культуральну рідину (0,1 мл) з титром вірусу 7 lg вводили до амніотичної порожнини ембріонів, інкубували 1 добу при 35 ° С. До амніотичної порожнини 20 інфікованих ембріонів вводили по 0,2 мл (з перерахунку 0,003 г препарату на кг ваги) засобу, що патентується, іще 20 ембріонам вводили по 0,3 мл препарату з прототипу та 20 ембріонам вводили по 0,2 мл 0,9 % розчину натрію хлориду. Через 3 доби ембріони анатомували та ставили реакцію гемаглютинації на скельці з 1 % суспензією еритроцитів курей. Як матеріал в реакції гемаглютинації використовували алантоїсну та амніотичну рідину. Порівнювали середній геометричний титр гемаглютиніни вірусу в алантоїсній рідині контрольних ембріонів та ембріонів, в які було введено препарат з розрахунком індексу ефективності (ІЕ) [10](таб 2).

Таблиця 2

Протигрипозна дія МП на моделі in ovo

Препарат	Титр вірусу * (lg)		
	Середній геометричний титр в lg ED50	Індекс ефективності (ІЕ), %	Неінфіковані ембріони
МП	1,5±0,2	80	0
Речовина з прототипу	7,2+1,2	44	0
0,9 % розчин натрію хлориду	7,5±1,0		0

* при P<0,001

Як видно з таблиці, МП на 6 Ig зменшує концентрацію вірусу грипу, тоді як речовина з прототипу не має протигрипозних властивостей. В амніотичній рідині, куди вводили розчин препарату, зовсім не було вірусу. Можливо він, потрапивши до цитоплазми клітини, потім руйнується під впливом протеаз та нуклеаз. Це свідчить про інший механізм дії МП проти контрольної речовини з прототипу. Останній як інгібітор адгезії вірусу здатний тільки захищати клітини від інфікування вірусами, а не блокували реплікацію вірусу в інфікованих клітинах.

Джерела інформації:

1. Мальчиков И.А., Слободянюк А.В. Использование противогриппозной вакцины и ремантадина для защиты от гриппа в промышленности // ЖМЭИ.-1990. -№ 10,С. 79-84
2. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии.- М.: Медицина, 1995.
3. Robert Walter Jansen, Dirk Klaas Fokke Meijer, Grietje Molema, Erik Desire Alice De Clercq, Rudi Wilfried Jan Pauwels, Dominique Schols Modified proteins and their use for controlling viral infection // A61K 3804; A61K 3816, US Patent № 5869457, Reg. 9.02.1999. Appl. Sep 4, 1997
4. Carriere M., Escrion V., Savarin A., Scherman D. Coupling of importin beta binding peptide on

plasmid DNA: transfection efficiency is increased by modification of lipoplex's physico-chemical properties.// BMC Biotechnology.-2003.-Vol. 3.- P. 14

5. Harper F, Florentin Y, Puvion E. Localization of T-antigen on simian virus 40 minichromosomes by immunoelectron microscopy// EMBO J.-1984.- Jun.- Місцю 3,№6.-P. 1235-1241.

6. Feldherr C, Kallenbach E, Schultz N. Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes. // J.Cell.Biol..-1984.-Vol.99, P.2216-2222

7. Дикий И.Л., Чуешов В.И., Стрельников Л.С. и др. // Методические рекомендации: "Технологические основы получения и перспективы клинического применения липосом". Харьков 1989г.-40с.

8. Lanford R.E., Butel J.S. Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen// Cell.-1984.Vol.37., P. 801-813

9. Perez Martin C, Vilas P., Perez Prieto S., Martin A. Antiviral activity of a D-glucosamine derivative against herpetic ulcers (HSV type 2) in rabbit cornea.// Acta Ophthalmol.-1989.-Vol.67.-N 1.- P. 55-60.

10. Методичні рекомендації "Вивчення антивірусної дії потенційних лікарських засобів», Київ.-2000.