УДК: 616.151.5;616–003.725:616.155–092–085

РОЗРОБКА МЕТОДІВ СОЛЮБІЛІЗАЦІЇ МЕМБРАН ВІРУСІВ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ ПРИ ВИГОТОВЛЕННІ ПРЕПАРАТІВ КРОВІ

Т. В. Даниш

ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини АМН України»

Розглянуті основні теоретичні та практичні підходи щодо відбору та використання детергентів та органічних розчинників для видалення вірусів з ліпідною оболонкою при одержанні фармацевтичних та ветеринарних препаратів, їх переваги та недоліки. Наведені приклади застосування хімічних агентів для ефективної інактивації вірусів гепатитів В та С, а також імунодефіциту людини. Охарактеризовані методи відділення інактивуючих речовин від білкових препаратів. Описаний сольвент-детергентний метод вірусної інактивації. Продемонстровано, що метод хроматографії з використанням макропористих кремнеземних сорбентів дозволяє з високою ефективністю та продуктивністю одержувати білкові препарати з плазми крові без присутності в них Тритону Х-100 та три(n-бутил)фосфату — потенційних токсичних агентів.

Ключові слова: ПЛАЗМА КРОВІ, ДЕТЕРГЕНТИ, МЕМБРАНИ ВІРУСІВ, СОЛЮБІЛІЗАЦІЯ, ТЕРАПЕВТИЧНІ БІЛКОВІ ПРЕПАРАТИ, ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ, КРЕМНЕЗЕМНІ СОРБЕНТИ

Важливою проблемою, яка виникає при одержанні очищених білкових препаратів, є необхідність видалення можливих вірусних чи бактеріальних агентів — небезпечних чинників для дослідника чи пацієнта (у випадку застосування терапевтичного препарату). Ця проблема набула особливої гостроти в кінці 80-х на початку 90-х років XX сторіччя, коли в різних країнах почали спостерігати спалахи масових захворювань, спричинених передачею з препаратами крові вірусних інфекцій — гепатитів В та С, вірусу імунодефіциту людини [1, 2]. Промислове фракціонування плазми розпочалося в кінці 40-х років XX сторіччя, коли Коном і співробітниками був розроблений метод осадження білків крові буферно-спиртовими розчинами при низьких температурах [3–5]. З кожним роком зростала кількість методів, які використовувалися в технологічних процесах фракціонування донорської плазми крові для збільшення безпеки продуктів такої переробки. Більшість з цих методів базувалася на використанні раніше відомих прийомів спиртового осадження, фракціонування з використанням зміни pH, іонної сили, в'язкості розчину, фазового розподілу речовин, температурної та хімічної обробки розчинів білкових препаратів, хроматографічних методів.

До кінця 80-х років основні концепції одержання білкових препаратів крові практично сформувались. Технології їх очистки вдосконалились і поповнились такими принципово новими методами, як осадження поліетиленгліколем, гель-проникна-, іоно-обмінна, метало-хелатна, різновидностями афінної хроматографії і т.д. [6–10].

На сьогоднішній день традиційні методи фракціонування плазми за Коном вдало поєднують з сучасними хроматографічними методами одержанням білкових препаратів [7, 11]. Завдяки цьому в промислових масштабах одержують ряд достатньо очищених препаратів крові [12].

Зростання застосування біопрепаратів у діагностиці та лікуванні в останні роки підняло вимоги перед їх виробниками стосовно антивірусної безпеки продуктів. Значні кошти були затрачені фармацевтичними компаніями для розробки ефективних способів вірусної інактивації. Метод пастеризації, що застосовувся раніше при виготовленні препаратів, з однієї сторони, негативно впливав на структуру та функції біомолекул, а з іншої, виявився недостатньо ефективним для руйнування вірусів з ліпідною оболонкою.

Одними з найефективніших методів солюбілізації мембран і достатньо відомими є методи з використанням різноманітних детергентів [13]. До недавнього часу вибір

детергента для виділення компонентів мембран чи її руйнування був в основному емпіричним; в результаті зібралась обширна література з суперечливими даними, які досить важко узагальнити. Приблизно з 80-х років почали прояснятися деякі принципи дії детергентів на мембрани. В основі солюбілізуючої здатності детергентів лежить їх амфіфільна природа, що дозволяє їм взаємодіяти як з гідрофільними, так і з гідрофобними групами білків та ліпідів, причому ці взаємодії мають, по суті, руйнівний характер.

Ефект детергента визначається двома видами взаємодії — взаємодією молекул детергента з мембранними компонентами і взаємодією молекул детергента між собою. Зв'язування детергента з компонентами мембран залежить від кількості місць зв'язування і від їх спорідненості до молекул детергента. Спочатку відбувається взаємодія детергента з високоспорідненими ділянками білків чи ліпідів, а пізніше з менш спорідненими. При високій концентрації детергента поступово починають насичуватися місця зв'язування з низькою спорідненістю, а із збільшенням кількості зв'язаних молекул посилюється їх влив на конформацію білка.

З однієї сторони, чим краще детергент руйнує вірусну оболонку, тим він кращий для процесу інактивації. Проте, з іншої сторони, вищеописане явище має велике значення саме для використання процесів вірусної інактивації з використанням детергентів у розчинах білків плазми крові, для яких такий вплив може мати значні негативні наслідки (якщо не порушення нативної структури, то, як мінімум, зменшення чи повне зникнення ферментативної активності, причому незворотнє).

Велике значення має також взаємодія молекул детергента між собою, оскільки здатність детергента зв'язуватися з біологічно активними молекулами визначається не загальною його концентрацією, а концентрацією вільних молекул, тобто молекул, які не зформовані в міцели. Чим вища здатність молекул детергента реагувати одна з однією, тим менша буде кількість вільних молекул. Якщо детергент має низьку критичну концентрацію міцелоутворення (ККМ), то кількості вільних молекул детергента буде достатньо лише для того, щоб зв'язатися з високоафінними місцями зв'язування біологічно активних молекул. У таких випадках зміни комформації білків будуть мінімальними. Саме цим можна пояснити той факт, що найчастіше для роботи з нативними білками, глікопротеїнами, ліпопротеїнами застосовують Тритон Х-100, Брідж 35 і Твіни 20 та 80, які мають низькі величини ККМ, у той час як додецилсульфат натрію, що має високий ККМ, має високу зв'язуючу здатність і дуже сильно порушує нативну структуру білків. Для порівняння, в таблиці 1 наведені показники ККМ для найбільш відомих детергентів [14].

За даними авторів роботи [15] Тритон Х-100 — кращий реагент, який дозволяє максимально збільшити кількість, а також вихід розчинних компонентів мембран, що виділяються в неденатуруючих умовах. При цьому ступінь солюбілізації збільшується із збільшенням концентрації детергента аж до виходу на плато при співвідношенні детергент:білок як 0,5 до 1.

До моменту активного вивчення застосування Тритону Х-100 для солюбілізації вірусів з оболонкою вже були відомі роботи з інактивації вірусів типу HBV у плазмі крові людини, які можна розділити на дві групи:

— використання реактивів для поперечної зшивки білкового компоненту вірусу (наприклад, формальдегіду);

— методи інактивації агентами, які взаємодіють з нуклеїновою кислотою вірусу (β-пропіолактон).

Таблиця 1

Критичні концентрації міцелоутворення для найпоширеніших детергентів [14]

Детергент	Тип детергента	Синонім	Молекулярна маса	ККМ, мМ
Брідж 35	Поліоксиетилени; Неіонні детергенти	Лаурет-23; Поліоксиетилен (23) лауриловий ефір $C_{12}E_{23}$	1200	0,05–0,1
Цетилтриме-тиламонію бромід	Четвертинні амонієві; Катіонні детергенти	СТАВ; Цетримонію бромід; Цетрімід; Цетиламін; Цетавлон; Квамоній	365	1,0

CHAPS	Похідні жовчних кислот; Цвіттеріонні детергенти	3-[(3-Холамідопропіл) диметиламоній]-1-пропан-сульфонат; ХАПС	615	6-10
Дезоксихолат натрію	Жовчні кислоти; Аніонні детергенти	—	415	2–6
Генапол Х-080	Поліоксиетилени; Неіонні детергенти	Октаетиленгліколю ізотридециловий ефір	553	0,06–0,15
Лаурилсуль-фат натрію	Алкілсульфати; Аніонні детергенти	СДС; СЛС	289	7–10
Луброл РХ	Поліоксиетилени; Неіонні детергенти	Поліетилен (9) лауриловий ефір; ПЕГ (9) додециловий ефір; Полідоканол	582	0,10
Таурохолат натрію	Жовчні кислоти; Аніонні детергенти	—	538	3–11
Тритон Х-100	Поліоксиетилени; Неіонні детергенти	Нонаетиленгліколю октилфеніловий ефір; ПЕГ (9) октилфеніловий ефір; NP-40; Ігепал СО-630	625	0,2–0,9
Твін 20	Поліоксиетилени; Неіонні детергенти	Поліоксиетиленсорбітан монолаурат; ПЕГ (20) сорбітан монолаурат; Полісорбат 20	1228	0,059
Твін 80	Поліоксиетилени; Неіонні детергенти	Поліоксиетиленсорбітан моноолеат; ПЕГ (20) сорбітан моноолеат; Полісорбат 80	1310	0,012

Проте, як виявилося пізніше, обробка формальдегідом приводила до денатурації білкових факторів плазми крові. Так, наприклад, після такої обробки рівень VIII фактора зменшувався на 75 %. Негативному впливу піддавалися також фактори II, VII, IX, X, плазміноген, фібриноген і т.д.

Обробка β-пропіолактоном не була прийнята в США, оскільки було показано, що видалення HBV було не завжди повним. Крім того, були виявлені канцерогенні властивості цієї сполуки. Інші методи інактивації вірусів, що були відомі на той час, наприклад, використання антитіл для нейтралізації HBV, через складність процедури виконання не могли бути втілені у виробництво препаратів крові.

Відомі як антисептики загального використання — окислюючі агенти (наприклад, хлорокс, гіпохлорит натрію), — також негативно впливають на фактори плазми крові при їх спробі застосування для антивірусної обробки продуктів переробки плазми.

Роботи [16–18] були присвячені дослідженню застосування амфіфільних детергентів (одночасно мають гідрофобну і гідрофільну групи) для інактивації та деструкції пірогенів (бактеріальних, вірусних і т. д.). Найсильнішими амфіфілами серед досліджуваних були неіонні сурфактанти, які добре розчиняються у воді і мають загальну формулу $RC_6H_4(OC_2H_4)_nOH$, де R — октил або нонил, а n=3. Найкращими субстанціями були визнані детергенти типу октилфеноксиполіетоксиетанолу, які мають комерційну назву Тритони Х (Х-100, 165, 205, 305, 405). Цими ж авторами було показано, що на відміну від Тритону Х-100, Твін 80 мав значно нижчу антивірусну активність. Відділення ж Тритону Х-100 від білків плазми крові після обробки здійснювали методами переосадження білків:

— при виготовленні фактора VIII Тритон Х-100 додавали до плазми перед етапом кріопреципітації. Тритон Х-100 залишався в супернатанті, а фактор VIII осаджувався;

— для одержання γ-глобуліну Тритон Х-100 додавали до плазми і потім проводили спиртове фракціонування за Коном. Тритон Х-100 залишався в супернатанті, а IgG осаджувався у фракції II + III;

— виділяючи альбумін, Тритон Х-100 додавали до супернатанту після видалення фракції II + III. Потім Тритон Х-100 залишався у супернатанті, коли альбумін осаджували у вигляді V фракції за Коном.

Іншим підходом до проблеми солюбілізації мембран є використання органічних розчинників білка. Для прикладу до таких реактивів можна віднести неполярні розчинники: 2-хлоретанол, диметилформамід, гексафторацетон, н-бутанол. Класичним представником

неполярних розчинників є етанол. Вони солюбілізують білки мембран, діючи не як прості розчинники, а викликають руйнування мембран і перетворення білків у розчинну форму (на відміну від детергентів). Так, при обробці водної суспензії тіней еритроцитів н-бутанолом утворюється водна фаза, що містить білки, практично вільні від ліпідів, а також бутанольна фаза, в якій присутні ліпіди [13].

У процесі інтенсивних досліджень було показано, що один з полярних розчинників, а саме три(*n*-бутил)фосфат, може ефективно застосовуватися в процедурі інактивації оболонкових вірусів.

Вперше його використали для дезагрегації оболонкових вірусів з метою виділення антигенів — субстратів для одержання противірусних вакцин [19]. Автори провели порівняльне дослідження інактивації вірусів грипу (вірус Тип A_2/Тайвань; вірус Тип В/Массачусетс; вірус Тип A_2/Японія 170) трьома реактивами: формальдегідом, Твіном 80 та три(*n*-бутил)фосфатом. В якості моделі використовували тест на пірогенноість (рівень температури у кріликів, яким вводили суспензію вірусів після обробки реактивом). В якості контролю використовували вірусну суспензію без будь-якої обробки. У всіх трьох випадках обробка три(*n*-бутил)фосфатом була найбільш ефективною. Твін 80 був досить ефективним у випадку вірусу грипу Типу A_2/Тайвань, проте для двох інших вірусів, а особливо для вірусу грипу Типу В/Массачусетс він був неефективним. У всіх трьох випадках формальдегід не давав чіткого противірусного ефекту. Звичайно, метод тестування був на той час недосконалим.

Теоретичні обґрунтування, викладені вище, а також десятки і сотні попередніх досліджень і стали, очевидно, основою для авторів-розробників сольвент-детергентного методу інактивації мембранних вірусів [20]. На цей момент вже був розроблений метод визначення рівня інфективності в експерименті *in vivo* на шимпанзе [21], в якому ступінь інактивації виражався в log (наприклад, термін 4 log означає, що вірус у сироватці в концентрації 10^4 після обробки повністю інактивується до рівня, що не може бути визначений цим методом).

У нашій роботі досліджувався антивірусний вплив ди- і триалкілфосфатів (C_2–C_{10}), основними з яких було виділено три(*n*-бутил)фосфат, три(*t*-бутил)фосфат, три(*n*-гексил)фосфат, три(2-етилгексил)фосфат, три(*n*-децил)фосфат у концентрації від 0,01 до 100 м/мл, без, і в присутності цілого ряду детергентів (охоплені практично всі типи, але основну увагу було приділено поліоксиетиленовим детергентам) з концентрацією від 0,001 до 10 %. Було показано, що функцією детергентів є покращення доступу алкілфосфатів до компонентів вірусних мембран. У той же час автори стверджують, що детергенти без алкілфосфатів є малоефективними для вірусної інактивації. Проводилися експерименти і по застосуванню алкілфосфатів в присутності ефірів (диметиловий, диетиловий, етилпропіловий, метилбутиловий, метилізопропіловий, метилізобутиловий), спиртів (метанол, етанол, пропанол, ізопропанол, *n*-бутанол, ізобутанол, *n*-пентанол, ізопентаноли) та гліколів (етиленгліколь, 1,2-пропіленгліколь, 1,2-пропандіол, 1,4-бутандіол, 2-гідроксиізобутанол). Всі ці експерименти проводилися в режимі температур від –5 до +70 °С та при різних рівнях атмосферного тиску. В цілому результати проведених досліджень можна узагальнити у вигляді таблиці 2 [20]. Таким чином, найсильніший антивірусний ефект характерний для комбінації 0,1 % TNBP/1 % Твін 80 при температурі 22 ^{o}С. Ця ж суміш при температурі 0 °С — малоефективна. Обробка тільки TNBP або лише Твін 80 не дає позитивного результату для елімінації вірусів.

Як показали наступні десятки і сотні робіт, сольвент-детергентний метод, який базується на використанні в якості сольвента три(*n*-бутил)фосфату, а в якості детергента — Тритону Х-100, Твіну-80 чи іншого, в основному поліоксиетиленового неіонного детергента, досить ефективний стосовно вірусів з ліпідною оболонкою. В той же час під час такої обробки не спостерігається істотного впливу на білкові фактори плазми крові.

Важливою проблемою залишається пошук ефективного способу відділення сольвенту і детергенту від продуктів переробки плазми крові, знаходження оптимальних місць застосування обробки в різноманітних схемах фракціонування плазми, виділення та очищення білкових препаратів крові. Застосування препаратів плазми крові, одержаних з

використанням SD-технології видалення вірусів, в трансфузійній практиці викликає певні побоювання відносно цитолітичних впливів та потенційної токсичності залишків SD-реагентів, що можуть бути присутніми в препаратах. Так, відомо [22], що триалкілфосфати володіють токсичною чи подразнюючою дією на мембрани клітин шкіри чи слизової.

На початку 90-х років питання потенційного накопичення SD-реагентів в препаратах крові було досить серйозною проблемою. Обробка розчинів сольвент-детергентним методом приводить до утворення міцелярних структур, відділити які від розчину білка було непростим завданням. Проте вже в наступні 5 років ця проблема була досить успішно вирішена за рахунок видалення SD-реагентів з білкових розчинів ефективними методами. Так для видалення SD-реагентів застосовують наступні методи: фазового розподілу, переосадження, методи фільтрації чи діалізу, різноманітні хроматографічні процедури (гідрофобна, афінна, гель-проникна).

Метод фазового розподілу був розроблений як додаток до методів інактивації вірусів сольвент-детергентом чи іншими гідрофобними сполуками (наприклад, насиченими чи ненасиченими жирними кислотами [23], бутилгідрокситолуолом [24], гексаном [25] та ін.) для їх видалення разом з компонентами вірусних мембран з водної фази у гідрофобну. Так TNBP досить швидко екстрагується олією з сої [26]. Проте для детергентів така екстракція не завжди ефективна (табл. 2).

Таблиця 2

Екстракційна здатність соєвої олії стосовно деяких детергентів

Детергент	Залишкова концентрація в водній фазі після екстрагування, %	Екстракційна здатність
Твін 80	80	погана
Тритон Х-114	19	добра
Тритон Х-45	< 2	дуже добра
n-Додецилглюкопіранозид	19	добра

Крім того, після фазової екстракції сольвент-детергенту слідові кількості невеликих олійних частинок, можливі білкові димерні молекули (наприклад, IgG) можуть забивати так звані нанофільтри [27, 28] (з порами розміром 15–45 нм), які призначені для інактивації вірусів без ліпідної оболонки.

Методи переосадження білків хоча і дозволяють одержувати білкові розчини без наявності в них SD-компонентів, з іншої сторони, часто приводять до зміни структурних і біологічних властивостей препаратів. Діаліз — ефективний, але довготривалий процес, внаслідок якого можливі часткова денатурація чи зміни активності білкових факторів плазми крові. Методи фільтрації для відділення SD-реагентів застосовуються доволі успішно, проте вимагають використання на сьогоднішній день малодоступних нанофільтрів.

Найефективнішими методами видалення SD-компонентів з білкових розчинів є хроматографічні методи. Для прикладу можна навести застосування сорбенту Amberlite XAD-7 [29] — сополімеру стиролу та дивінілбензолу, який як поліароматичний гель вибірково сорбує ліпофільні речовини. Автори показали, що даний сорбент сорбував три(n-бутил)фосфат та Тритон Х-100 з розчину імуноглобуліну. В іншій роботі [30] застосовували аніонообмінник для відділення три(n-бутил)фосфату та Твіну 80 від фактора VIII.

Звичайно, застосування методів афінної хроматографії як найспецифічніших та найефективніших для виділення та очищення білкових факторів, виглядає найпривабливішим і для відділення сольвента та детергента.

Одержані результати переконують в тому, що метод хроматографії з використанням макропористих кремнеземних сорбентів дозволяє одержувати препарати білкових факторів без присутності в них Тритону Х-100 та три(n-бутил)фосфату [31–34].

Висновки

Для солюбілізації мембран вірусів застосовують детергенти та органічні розчинники різноманітної структури та походження.

При одержанні білкових препаратів з біологічної сировини вибір детергента обумовлюється ефективністю солюбілізації мембран вірусів та мінімальним впливом на структуру та функцію білка.

Сольвент-детергентний метод з використанням обробки Тритоном Х-100 та три(n-бутил)фосфатом на сьогоднішній день є найбільш поширеним та ефективним у технології вірусної інактивації білкових продуктів переробки плазми крові.

Хроматографічні методи є найбільш придатними для відділення хімічних антивірусних агентів від білкових продуктів.

Метод афінної хроматографії з використанням макропористих кремнеземних сорбентів дозволяє одержувати препаративні кількості білків з плазми крові без присутності в них Тритону Х-100 та три(n-бутил)фосфату.

Перспективи подальших досліджень. Застосування сольвент-детергентної обробки плазми крові та субпродуктів її переробки одночасно з термоінактивацією чи нанофільтрацією або іншою процедурою видалення (інактивації) у поєднанні з сучасними хроматографічними методами виділення та очищення препаратів — найбільш ефективні процедури на сьогоднішній день при одержанні терапевтичних та діагностичних біопрепаратів. Перспективними є пошук та дослідження властивостей нових біоспецифічних сорбентів, придатних для видалення вірусінактивуючих хімічних агентів з біопродуктів. Застосування макропористих кремнеземних носіїв з різноманітними лігандами, для яких характерні надзвичайна жорсткість, хімічна стійкість, здатність витримувати термічну стерилізацію та динамічні режими хроматографічного процесу є особливо привабливими.

T. V. Danysh

DEVELOPMENT OF METHODS OF SOLYUBILIZATION OF VIRUSES MEMBRANES AND THEIR APPLICATION AT MAKING OF BLOOD PREPARATIONS

S u m m a r y

Basic theoretical and practical approaches in relation to a selection and use of detergents and organic solvents for the inactivation of lipid-enveloped membrane viruses at the receipt of pharmaceutical and veterinary preparations, their advantage, and failings are considered. The examples of application of chemical agents for effective inactivation of viruses of hepatitis B and C, and also HIV are resulted. The methods of separation of inactivation substances from protein preparations are described. The solvent-detergent method of viral inactivation is described. It is shown, that the method of chromatography with the using of macroporous silica sorbents allows to obtain protein preparations from plasma of blood with high efficiency and productivity without presence Triton X-100 and tri(n-butyl)phosphate — potential toxic agents in its composition.

Т. В. Даныш

СОЗДАНИЕ МЕТОДОВ СОЛЮБИЛИЗАЦИИ МЕМБРАН ВИРУСОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ПРОЗВОДСТВЕ ПРЕПАРАТОВ КРОВИ

А н н о т а ц и я

Рассмотрены основные теоретические и практические подходы к отбору и использованию детергентов и органических растворителей для удаления вирусов с липидной оболочкой при получении фармацевтических и ветеринарных препаратов, их преимущества и недостатки. Приведены примеры применения химических агентов для эффективной инактивации вирусов гепатитов В и С, а также иммунодефицита человека. Охарактеризованы методы отделения инактивирующих веществ от белковых препаратов. Описан сольвент-детергентный метод вирусной инактивации. Продемонстрировано, что

метод хроматографии с использованием макропористых кремнеземных сорбентов позволяет с высокой эффективностью и производительностью получать белковые препараты из плазмы крови без присутствия в них Тритона Х-100 и три(n-бутил)фосфата — потенциальных токсичных агентов.

1. *Robertson B. H.* Non-enveloped viruses transmitted by blood and blood products / B. H. Robertson, D. D. Erdman // Dev. Biol. Stand. — 2000. — V. 102. — P. 29–35.

2. *Vermylen J.* Review of the hepatitis A epidemics in hemophiliacs in Europe / J. Vermylen, K. Peerlinck // Vox Sang. — 1994. — V. 67, Suppl 4. — P. 8–11; discussion 24–26.

3. *Cohn E. G.* Chemical, clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation.I. The characterization of the protein fractions of human plasma / E. G. Cohn, J. L. Oncley, L. E. Strong et al. // J. Clin. Invest. — 1944. — V. 23, No. 4. — P. 417–432.

4. *Cohn E. J.* Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. System for separation into fractions of protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids / E. J. Cohn, L. E. Strong et al. // J. Amer. Chem. Soc. — 1946. — V. 68. — P. 459–475.

5. *Oncley J. L.* Separation of the antibodies, isoagglutinins, prothrombin, plasminogen and b1-lipoprotein into subfraction of human plasma / J. L. Oncley, M. Melin, D. A. Richert et al. // J. Amer. Chem. Soc. — 1949. — V. 71, No. 2. — P. 541–550.

6. *Fanou Ayi.* Metal-chelate affinity chromatography as a separation tool / Ayi Fanou, M. Vijayalakshmi // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1983. — V. 78. — P. 413, 300.

7. *Смородин Е. П.* Выделение α_2-макроглобулина плазмы крови человека комбинацией методов псевдолигандной аффинной хроматографии и гель-фильтрации / Е. П. Смородин, Х. Э. Арукаэву // Вопр. мед. химии. — 1989. — Т. 35, № 5. — С. 83–86.

8. *Manchalter Ch.* Purificatin of plasma protein / Ch. Manchalter // Haemostasis. — 1987. — No. 1, suppl.18. — P. 115–119.

9. *Hey Y.* Dyes — a colourful addition to protein purification / Y. Hey, P. D. G. Dean // Chem. And Ind. — 1981. — No. 20. — P. 726–732.

10. *Fatiadi A. J.* Affinity chromatography and metal-chelate affinity chromatography / A. J. Fatiadi // CRC Crit. Rev. Anal. Chem. — 1987. — V. 18, No. 1. — P. 1–44.

11. *Eketorp R.* Affinity chromatography in industrial blood plasma fractionation. Affinity chromatography and related Techn. : Theor. Aspects Ind. and Biomed. Appl / R. Eketorp // Proc. Int. Symp., Veldhoven, June 22–26, 1981 Amsterdam e.a. — 1982. — P. 263–273.

12. *Nothias J. C.* Produits sanguinis: le CNTS dans la course / J. C. Nothias // Biofutur. — 1988. — No. 70. — P. 20–21.

13. Биохимическое исследование мембран / Под ред. Э. Меддию. — М. : Мир, 1979. — 460 с.

14. A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry // Calbiochem® Biochemicals. — 1988. — 64 p.

15. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. — М. : Мир, 1991. — 543 с.

16. Pat. 4314997 US, A61K 035/14, 037/00. Purification of plasma protein products / E. Shanbrom. — Publ. 9.02.1982.

17. Pat. 4315919 US, A61K 035/14, 037/00. Depyrogenation process / E. Shanbrom. — Publ. 16.02.1982.

18. Pat. 5466725 US, A01N 25/08, 25/34, C08L 27/06. Anti-viral materials / J. Kersten, Y. Delmotte. — Publ. 14.11.1995.

19. Pat. 3962421 US, A61K 039/18, 039/29. Method for the disruption of lipid-containing viruses / A. R. Neurath. — Publ. 8.06.1976.

20. Pat. 4540573 US, A61K 39/00, 35/14, 37/00, C07G 7/00, C07C 103/52. Undenaturated virus-free biologically active protein derivatives / A. R. Neurath, B. Horowitz. — Publ. 10.09.1985.

21. *Prince A. M.* Evaluation of the effect of betapropiolactone/ultraviolet irradiation (BPL/UV) treatment of source plasma on hepatitis transmission by factor IX complex in Chimpanzees / A. M. Prince, W. Stephen, B. Brotman, M. C. van de Ende // Thromb. and Haemost. — 1980. — 44. — P. 138–142.

22. Pat. 6034073 US, A01N 57/26, 43/16, 43/08. Solvent detergent emulsions having antiviral activity / D. C. Wright. — Publ. 7.03.2000.

23. Pat. 4613501 US, A61K 39/18, 39/29. Inactivation of viruses in labioe blood derivatives / B. Horowitz. — Publ. 23.09.1986.

24. Pat. 4350707 US, A61K 031/05. Inactivation of lipid containing viruses with butylated hydroxytoluene / A. D. Keith, W. Sniper. — Publ. 21.09.1982.

25. *Danihelková H.* Disruption of influenza virus A by diethylether-Tween and tri-N-butyl phosphate-Tween mixtures / H. Danihelková, H. Závadová // Acta Virol. — 1984. — V. 28, No. 1. — P. 26–32.

26. Pat. 4789545 US, A61K 35/14, 39/12; A01N 1/02; C12N 7/06. Removal of lipid soluble process chemicals from biological materials by extraction with naturally occurring oils or synthetic substitutes thereof / K. R. Woods, T. W. Orme. — Publ. 6.12.1988.

27. *Hamamoto Y.* A novel method for removal of human immunodeficiency virus: filtration with porous polymeric membranes / Y. Hamamoto, S. Harada, S. Kobayashi et al. // Vox. Sang. — 1989. — V. 56. — P. 230–236.

28. Pat. 6468733 US, A01N 001/02. Method of the inactivation of viruses by a solvent-deregent combinationand nanofiltration / I. Nur, L. Bar. — Publ. 22.10.2002.

29. *Trescec A.* Removal of detergent and solvent from solvent-detergent-treated immunoglobulins / A. Trescec, M. Simić, K. Branović et al. // J. Chromatography A. — 1999. — V. 852, No. 1. — P. 87–91.

30. *Josic D.* Purification of factor VIII and von Willebrand factor from human plasma by anion-exchange chromatography / D. Josic, H. Schwinn, M. Stadler, A. Strancar // J. Chromatography B Biomed. Appl. — 1994. — V. 662, No. 2. — P. 181–190.

31. *Даниш Т. В.* Синтез кремнеземних сорбентів із лігандами — активними барвниками тріазинового ряду / Т. В. Даниш, М. І. Вороняк, Н. А. Дульцева, Н. О. Шурко // Вісник Львівського університету. — 2008. — Вип. 47. — С. 63–69. — (Серія біологічна.)

32. *Новак В. Л.* Зменшення інфекційного ризику препаратів плазми крові: специфічні превентивні стратегії / В. Л. Новак, Т. В. Даниш // Український журнал гематології та трансфузіології. — 2008. — № 5. — С. 41–43.

33. *Новак В. Л.* Вірусна безпека при виготовленні препаратів плазми крові — сучасні тенденції / В. Л. Новак, Т. В. Даниш // Журнал академії медичних наук. — 2009. — Т. 15, № 1 — С. 165–174.

34. *Даниш Т.* Одержання барвник-лігандних афінних сорбентів, придатних для виділення та очищення факторів згортання крові / Т. Даниш // Біологія тварин. — 2009. — Т. 11, № 1–2. — С. 356–360.

Рецензент: доктор біологічних наук, с. н. с. Інституту біології клітини НАН України Ю. Я. Кіт.