

Изучение противовирусной активности Ингавирина® в отношении «сезонного» вируса гриппа А/Н1N1 в культуре клеток MDCK

Г. А. ГАЛЕГОВ¹, В. Л. АНДРОНОВА¹, В. Е. НЕБОЛЬСИН²

¹ ГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, Москва

² ОАО «Валента Фарм», Москва

Investigation of Ingavirin® Antiviral Activity Against Season Influenza Virus A/H1N1 in MDCK Cell Culture

G. A. GALEGOV, V. L. ANDRONOVA, V. E. NEBOLSIN

D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Valenta Pharmaceutica, Moscow

Ингавирин® является малотоксичным веществом для культуры клеток MDCK. Концентрация препарата 1000 мкг/мл не достигает величины ЦД₅₀. Антигриппозная активность Ингавирина® изучалась в отношении вируса гриппа А/Н1N1 1–7 пассажей, включая вариант вируса, резистентный к Ремантадину®. Установлено, что Ингавирин® при множественности инфицирования 0,01 ЦПД₅₀/мл в концентрации 250–400 мкг/мл обеспечивает предотвращение развития вирусиндуцированного ЦПЭ. Аналогичные результаты были получены в отношении вируса гриппа А/Н1N1, резистентного к Ремантадину®. В таких же концентрациях препарат влияет на репродукцию вируса гриппа, что выразилось в подавлении образования гемагглютининов. В ходе многократного пассирования вируса при возрастающих концентрациях Ингавирина® в культуре клеток MDCK резистентных к препарату мутантов получено не было. Противогриппозная активность Ингавирина® сохраняется при его введении через 60 и даже через 90 минут после адсорбции при множественности инфицирования 0,01 ЦПД₅₀/мл.

Ключевые слова: вирус гриппа А/Н1N1, прововирусная активность, Ингавирин®.

Ingavirin® is low toxic for the MDCK cell culture. The drug concentration of 1000 mcg/ml does not reach the CD₅₀ value. The antiviral activity of Ingavirin® was studied with respect to the influenza virus A/H1N1, including the Remantadin® resistant variant, in 1–7 subcultures. In multiple contamination by 0.01 CPD₅₀/ml Ingavirin® in concentrations of 250 to 400 mcg/ml prevented development of the virus-induced CPE. Analogous results were recorded with respect to the Remantadin® resistant variant of the influenza virus A/H1N1. In the same concentrations the drug affected the virus reproduction, evident from inhibition of the hemagglutinin formation. No Ingavirin® resistant mutants were isolated after the virus repeated subcultures in the presence of the increasing drug concentrations in the MDCK cell culture. In the experiment with multiple contamination by 0.01 CPD₅₀/ml, the Ingavirin® antiviral activity was detectable when the drug was administered 60 and even 90 min after the adsorption.

Key words: influenza virus A/H1N1, Ingavirin®, antiviral activity.

Введение

Грипп является одной из самых распространённых в мире вирусной инфекцией, от которой ежегодно умирает до 500 тыс. человек [1]. За последние годы эпидемическая ситуация по гриппу осложняется вспышками заболевания, вызываемого вирусом гриппа А/Н5N1, представляющим опасность и для людей. По данным ВОЗ, к 27 ноября 2009 года было зарегистрировано 444 случая

заражения людей этим вирусом с летальностью 59% [2]. Существует опасность образования реассортантов вирусов гриппа человека и птиц, высокопатогенных для человека.

На очередном заседании ВОЗ в июне 2009 года Генеральный директор ВОЗ Маргарет Чен объявила о первой в XXI веке пандемии гриппа, вызванной вирусом гриппа А/Н1N1/2009, которой был присвоен шестой (максимальный) уровень опасности. С момента первого выделения вируса вспышки заболевания отмечены в 179 странах мира (по состоянию на 7 декабря 2009 г.), зафиксировано 1363786 случаев заражения, из которых

© Коллектив авторов, 2009

Адрес для корреспонденции: 123098 Москва, ул. Гамалеи, 16. Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН

108889 — с летальным исходом. В России подтверждено 237 случаев этого опасного заболевания. По мнению экспертов, пандемия может продолжаться по всему миру в течение двух лет и более.

Создание вакцины, эффективной в отношении нового циркулирующего возбудителя, требует немалого времени. Поэтому этиотропные лекарственные препараты могут быть единственным средством предотвращения распространения вирусной инфекции. До последнего времени современный арсенал химиотерапевтических противовирусных препаратов, разрешённых к применению в Российской Федерации, был представлен Ремантадином® (ингибирующим функцию белка М2), Арбидолом® (препятствующим слиянию липидной оболочки вируса с клеточными мембранами), Осельтамивиром (Тамифлю®) и Занамивиром (Реленза®) — ингибиторами нейраминидазы вируса [3, 4]. Известно, что формирование лекарственной резистентности является ограничивающим фактором для применения этиотропных лекарственных препаратов. Резистентные штаммы циркулируют в природе и представляют эпидемическую опасность [5—9]. Так, в отношении циркулирующего пандемического штамма вируса гриппа А/Н1N1/2009 не подтверждена фармакологическая активность Ремантадина®, доступного и широко используемого в России препарата. В связи с этим поиск и создание новых противовирусных препаратов, имеющих иной механизм действия и активных в отношении вариантов вируса, резистентных к действию применяемых на практике лекарственных препаратов, представляет большую практическую значимость.

В многочисленных исследованиях показана противовирусная активность нового оригинального отечественного препарата Ингавирин® (имидазолэтанамид пентандиовой кислоты) в отношении вируса гриппа А/Н3N2 в исследованиях *in vivo* [10].

Ингавирин® прошел клиническую апробацию и с 2008 г. разрешён к применению как противовирусный препарат [11].

Механизм действия Ингавирина® связан со снижением эффективности конформационного созревания нуклеокапсидного белка вируса NP и ингибированием его миграции из цитоплазмы в ядро клетки [12]. Таким образом, механизм действия Ингавирина® принципиально иной, чем у других этиотропных противовирусных лекарственных препаратов.

Целью настоящего исследования явилось изучение эффективности Ингавирина® в отношении вируса гриппа А/Н1N1/Новая Каледония/20/99 в культуре клеток MDCK и вероятность формирования резистентных штаммов к препарату.

Материал и методы

Клетки. Культуру клеток почек собаки MDCK (Madin-Darby canine kidney cell line) выращивали в 24- и 96-луночных пластиковых планшетах с использованием ростовой среды Игла (ГУ НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов, Москва), соединённой с 5% эмбриональной телячьей сывороткой (предприятие «ПанЭко», Москва) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Среда поддержки: среда Игла, содержащая 0,2% бычьего сывороточного альбумина (bovine albuminum fraction V solution 7,5%, Gibco) и 2 мкг/мл ТРСК-трипсина (tolylsulfonil phenilalanylchloromethylketone-trypsin, Sigma).

Вирус. Вирус гриппа А/Н1N1/Новая Каледония/20/99 любезно предоставлен Е. И. Исаевой (лаборатория иммунологии ГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН).

Препараты. Ингавирин® (2-(имидазол-4-ил)этанамид пентандиовой-1,5 кислоты) производства ОАО «Валента Фарм» (Российская Федерация) представляет собой низкомолекулярный пептидоамин, аналог эндогенного пептидоамин, выделенного из тканей морского моллюска *Aplysia Californica*.

Ремантадин® солянокислый (α -метил-1-адамantanметил-амин гидрохлорид) производства АО «Адамantan», Москва.

Оценка противовирусной активности препаратов с использованием метода ингибирования развития вирусиндуцированного цитопатического эффекта (ЦПЭ) выполнялась в соответствии с общепринятой методикой [13]. Монослойные культуры клеток MDCK (24 ч), выращенные в 24- и 96-луночных планшетах, дважды отмывали от ростовой среды физиологическим раствором. В 96-луночных планшетах готовили серийные разведения препарата и вносили вирусосодержащий материал.

При использовании 24-луночных планшетов монослойную культуру клеток заражали вирусом и после часовой адсорбции вносили среду поддержки. В опыте среда поддержки содержала препараты в известной концентрации, которые вносили сразу после адсорбции, либо через 60 и 90 мин.

Множественность инфицирования клеточных культур составила от 1 до 0,001 ЦПД₅₀/кл. Ежедневно осуществлялся мониторинг наличия вирусиндуцированного ЦПЭ, результаты учитывались, когда в контроле вируса развивался 95—100% ЦПЭ.

Оценка противовирусной активности препаратов с использованием реакции гемагглютинации. Монослойные культуры клеток MDCK выращивали в 24-луночных пластиковых планшетах. Множественность инфицирования составила 0,01 ЦПД₅₀/мл. Через 72 ч монослой инфицированной культуры клеток собирали. Наличие гемагглютинирующей активности определяли с использованием эритроцитов человека 1 (0) группы в 96-луночных круглодонных планшетах. Представлены результаты двух независимых опытов.

Схема пассирования вируса с целью получения резистентного варианта. Пассирование вируса проводили в присутствии Ингавирина® в концентрации 300 мкг/мл, являющуюся минимально активной при множественности инфицирования 0,01 ЦПД₅₀/мл. В первом пассаже множественность инфицирования составляла 0,1 ЦПД₅₀/мл. В последующих пассажах использовали множественность инфицирования в 10 раз меньшую — 0,01 ЦПД₅₀/мл. Определяли чувствительность к Ингавирину® материала каждого пассажа с использованием метода ингибирования развития вирусиндуцированного ЦПЭ.

Вариант вируса, резистентного к Ремантадину®, получали путём проведения серийного пассирования вируса в градиенте концентраций Ремантадина® от 0,5 мкг/мл в первом пассаже до 5 мкг/мл с последующим клонированием полученной популяции. Множественность инфицирования — от 1 ЦПД₅₀/мл в первом пассаже до 0,01 ЦПД₅₀/мл в последующих пассажах. Материал четвертого пассажа был полностью резистентен к Ремантадину® в концентрации 5 мкг/мл.

Оценка цитотоксичности Ингавирина® проводилась с использованием метода окрашивания клеток трипановым голубым после 72 ч инкубирования клеток MDCK в присутствии

Таблица 1. Влияние Ингавирина® на развитие вирусиндуцированного ЦПД в культуре клеток MDCK, инфицированных вирусом гриппа А/Н1N1

Вирус	МИ, ЦПД ₅₀ /кл	К/К	К/В	Концентрация Ингавирина®, мкг/мл				Концентрация Ремантадина®, мкг/мл		
				125	250	400	500	1,25	2,5	5,0
Rem ^s	1	—	+	+	+	+	+	+	±	—
	0,1	—	+	+	+	+	+	+	—	—
	0,01	—	+	+	±	—	—	—	—	—
	0,001	—	±	±	—	—	—	—	—	—
Rem ^r	1	—	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,1	—	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,01	—	+	+	±	—	—	+	+	+
	0,001	—	±	±	—	—	—	+	+	+

Примечание. Rem^s — вирус гриппа А/Н1N1, чувствительный к Ремантадину®; Rem^r — вирус гриппа А/Н1N1, резистентный к Ремантадину®; МИ — множественность инфицирования; К/К — контроль клеток; К/В — контроль вируса; «+» — наличие ЦПЭ; «—» — отсутствие ЦПЭ; «±» — незначительное изменение морфологии клеток. Использовали 96-луночные пластиковые планшеты. Представлены результаты двух независимых опытов.

известной концентрации препарата в среде поддержки. Разведения препарата готовили в 96-луночных пластиковых планшетах со сформировавшимся 24-часовым клеточным монослоем. После 72-часового инкубирования проводили окрашивание клеток трипановым голубым и вычисляли количество живых клеток в процентах к общему количеству клеток в лунке. Приведены результаты двух независимых опытов.

Результаты и обсуждение

Полученные данные показали, что препарат Ингавирин® оказался малотоксичным для культуры клеток MDCK. Максимальная использованная в дальнейших исследованиях концентрация препарата 600 мкг/мл является нецитотоксичной: количество инактивированных клеток после 72 часов инкубирования неинфицированной клеточной культуры в присутствии препарата не достигало величины ЦД₅₀ (25,4%). Соответствующий показатель для контроля клеток, инкубированных в тех же условиях, но без препарата в среде поддержки, составлял 5,9%. В присутствии препарата в концентрации 1000 мкг/мл гибель клеток не превышала 34,6%.

При изучении влияния Ингавирина® на развитие вирусиндуцированного ЦПЭ в культуре клеток MDCK использовали вирус гриппа А/Н1N1/Новая Каледония/20/99, чувствительный к Ремантадину®, а также его вариант, резистентный к Ремантадину® (ИД₅₀>5 мкг/мл). В табл. 1 приведены результаты изучения противогриппозной активности Ингавирина® при его введении в экспериментальную систему непосредственно после адсорбции вируса.

Как видно из приведённых данных, при использовании множественности инфицирования 0,01 и 0,001 ЦПД₅₀/кл обнаруживается противовирусная активность Ингавирина®. При этом Ингавирин® при той же множественности инфицирования одинаково эффективен в отношении как ремантадиночувствительного, так и ремантадинорезистентного вариантов вируса: величины ИД₅₀ равны 250 и 250 мкг/мл соответственно. Как следует из таблицы 1, препарат в нецитотоксич-

ной концентрации 400 мкг/мл (множественность инфицирования 0,01 и 0,001 ЦПД₅₀/кл) обеспечивал полное подавление развития вирусиндуцированного ЦПЭ (ИД₉₅).

В следующей серии экспериментов клеточные культуры, выращенные в 96-луночных пластиковых планшетах, инфицировали с множественностью 0,01 ЦПД₅₀/кл. Ингавирин® вносился через 60 и 90 мин после адсорбции. В таких условиях противовирусная активность Ингавирина® не снижалась: наблюдалось 50 и 95—100% ингибирование развития вирусиндуцированного ЦПЭ в тех же концентрациях (250 и 400 мкг/мл соответственно), что и при введении Ингавирина® непосредственно после адсорбции.

Способность Ингавирина® ингибировать репродукцию вируса гриппа А/Н1N1 изучалась путём определения гемагглютинирующей активности вирусосодержащего материала. Для этого культуру клеток, выращенную в 24-луночных планшетах, инфицировали (множественность инфицирования 0,01 ЦПД₅₀/кл) и инкубировали в присутствии препарата в известной концентрации. Исследовали диапазон концентраций Ингавирина® от 125 до 500 мкг/мл. Через 72 ч, когда в контроле вируса развивался 100% ЦПЭ, определяли гемагглютинирующую активность полученного материала. Титр гемагглютинина в контроле вируса составлял 1:32. Минимальная концентрация препарата, в присутствии которой гемагглютинирующая активность вируса не обнаруживалась, составляла 400 мкг/мл.

При введении Ингавирина® по лечебно-профилактической схеме неинфицированную клеточную культуру инкубировали в присутствии 500 мкг/мл препарата в течение 90 мин. Затем клетки инфицировали с множественностью 0,01 ЦПД₅₀/кл и инкубировали в присутствии препарата в известной концентрации. В этих условиях концентрация Ингавирина®, в присутствии которой не обнаруживалась гемагглютинирующая активность, снижалась до 250 мкг/мл.

Таблица 2. Оценка чувствительности к Ингавирину® материала каждого пассажира вируса гриппа А/Н1N1/Новая Каледония/20/99 в процессе пассирования в присутствии Ингавирина® (множественность инфицирования 0,01 ЦПД₅₀/мл)

Пассаж, №	К/К	К/В	Концентрация Ингавирина®, мкг/мл			
			150	300	450	600
Исходный вирус	—	+	+	±	—	—
1	—	+	+	±	—	—
2	—	+	+	±	—	—
3	—	+	+	±	—	—
4	—	+	+	±	—	—
5	—	+	+	±	—	—
6	—	+	+	±	—	—
7	—	+	+	±	—	—

Примечание. К/К — контроль клеток; К/В — контроль вируса; «+» — наличие ЦПЭ через 72 ч; «—» — отсутствие ЦПЭ через 72 ч; «±» — незначительное изменение морфологии клеток. Использовали 96-луночные пластиковые планшеты.

В следующей серии экспериментов попытались получить популяцию вируса гриппа А/Н1N1, резистентную к Ингавирину®, путём проведения серийного пассирования вируса в его присутствии, как описано выше в разделе «Материал и методы». В табл. 2 представлены результаты изучения чувствительности материала каждого пассажира к Ингавирину®. Максимальная использованная концентрация Ингавирина® не превышала 600 мкг/мл.

Как следует из приводимых данных (см. табл. 2), пассирование вируса гриппа А/Н1N1/Новая Каледония/20/99 в присутствии 300 мкг/мл Ингавирина® (7 пассажей) не привело к снижению чувствительности вируса к высоким концентрациям

препарата (см. табл. 1). Выявляемая активность препарата соответствует полученным ранее данным об антивирусной активности Ингавирина® на этой вирусной модели. К Ремантадину® формируется резистентность (снижение чувствительности) уже после четвёртого пассажира вируса гриппа А в культуре клеток MDCK. С таким вариантом вируса проводились исследования, представленные в табл. 1.

Таким образом, результаты исследования *in vitro* свидетельствуют о высокой эффективности Ингавирина® в отношении изучаемого штамма вируса гриппа А/Н1N1/Новая Каледония/20/99 1—7 пассажей, в том числе ремантадиноустойчивого варианта вируса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гендон Ю. З. Вакцины и химиопрепараты для профилактики гриппа. *Вопр вирусол* 2007; 1: 4—10.
2. http://ecdc.europa.eu/en/files/pdf/Health_topics/Situation_Report_090725_1700hrs.pdf.
3. Галегов Г. А., Андропова В. Л. Химиотерапия вирусных инфекций / Львов Д. К., ред. Медицинская вирусология. Руководство. М.: 2008; 87—92.
4. Gubareva L. V., Kaiser L., Hayden F. G. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet* 2000; 355: 627—835.
5. Иванова В. Т., Курочкина Я. Е., Бурцева Е. И. и др. Распространение и биологические свойства эпидемических штаммов вирусов гриппа А и В, циркулирующих в сезоне 2006—2007 гг. в России. *Вопр вирусол* 2008; 5: 19—23.
6. Bright R. A., Medina M. J., Xu X. et al. Incidence of amantadine resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* 2005; 366: 1175—1181.
7. Bright R. A., Shay D. K., Shay B. et al. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005—2006 influenza season in the United States. *JAMA* 2006; 295: 8: 891—894.
8. Laceyby A., Hungnes O., Dudman S. G. et al. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe. *Eurosurveillance* 2008; 13: Issue 5: 8026.
9. Leneva I. et al. The mechanism of action of arbidol against influenza virus — selection and characterization of arbidol-resistant mutants. 12th International Congress of Virology. Paris, 2002; 1077: Abstr.
10. Логинова С. Я., Борисевич С. В., Максимов В. А. и др. Изучение лечебной эффективности нового отечественного препарата Ингавирин® в отношении возбудителя гриппа А (H3N2). *Антибиотики и химиотер* 2008; 53: 7—8: 27—30.
11. Колобужина Л. В., Мальшиев Н. А., Меркулова Л. Н. и др. Изучение эффективности и безопасности нового противовирусного препарата Ингавирин при лечении больных гриппом. *Русс мед журн* 2008; 16: 23: 1—5.
12. Небольсин В. Е., Новиков Ф. Н., Семенова Н. П. и др. Поиск терапевтических мишеней и исследование механизма противогриппозной активности нового препарата Ингавирин®. *Мат. тез. докл. IV Российского научного симпозиума «Белки и пептиды»*, 23—27 июня 2009г. г. Казань. Казань, 2009; 103.
13. Kaverin N. V., Webster R. G. Impairment of multicycle influenza virus growth in Ver (WHO) cells by loss of trypsin activity. *J Virol* 1995; 69: 4: 2700—2703.