

Противовирусные свойства композиционных препаратов двуспиральных РНК и интерферона альфа-2b человека

С.Г. Гамалей, М.О. Скарнович, О.Ю. Мазурков, Л.Н. Шишкина, Е.С. Башкина, С.В. Усова, О.С. Иванова, Г.М. Левагина, Е.Д. Даниленко

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора
630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово

Резюме

Целью данной работы являлось получение и исследование противовирусных свойств лекарственного препарата для интраназального применения, содержащего дрожжевую двуспиральную РНК (дсРНК) и рекомбинантный интерферон альфа-2b (ИФН- α 2b) человека в средстве доставки (молекулярной конструкции). **Материал и методы.** Препараты молекулярных конструкций, несущих ИФН- α 2b и дсРНК, получали по оригинальной методике. В исследовании использовали образцы интраназальных лекарственных форм трех составов, содержащих в одной дозе 50 мкг дсРНК и 10, 50 или 100 МЕ ИФН- α 2b. Противовирусную активность композиционных препаратов *in vitro* определяли в культурах клеток L929 и L-68 по подавлению цитопатического действия вируса энцефаломиокардита мышей (ЕМСВ), штамм «Колумбия». Защитные свойства препаратов *in vivo* исследовали на самцах белых аутбредных мышей ICR, инфицированных интраназально 10 полулетальными дозами вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2). По показателям гибели и средней продолжительности жизни животных рассчитывали коэффициент защиты. **Результаты и их обсуждение.** Все композиционные препараты обладали способностью ингибировать деструктивное действие тест-вируса и повышать число жизнеспособных клеток в культурах L929 и L-68, при этом защитный эффект усиливался при увеличении дозы ИФН- α 2b в составе препарата. Наибольшей активностью обладал препарат, содержащий 50 мкг дсРНК и 100 МЕ ИФН- α 2b на дозу. Композиционный препарат того же состава при трехкратном интраназальном введении мышам по лечебно-профилактической схеме в дозе (2,5 мг дсРНК и 5000 МЕ ИФН- α 2b)/кг защищал от гибели 50 % животных, чего не наблюдалось после введения одной дсРНК. ИФН- α 2b в дозе, эквивалентной его содержанию в композиционном препарате, обладал аналогичным, но менее выраженным действием. **Заключение.** Результаты экспериментального исследования, проведенного *in vitro* и *in vivo*, подтверждают тот факт, что объединение ИФН и его индуктора усиливает противовирусный эффект композиционного препарата по сравнению с эффектом его компонентов. Полученные данные свидетельствуют о перспективности создания интраназальной формы лекарственных препаратов с использованием ИФН и дсРНК в составе средства доставки.

Ключевые слова: двуспиральные РНК, интерферон альфа-2b человека, молекулярная конструкция, культура клеток, вирус гриппа, противовирусная активность.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, тема ГЗ-38/21.

Автор для переписки. Гамалей С.Г., e-mail: gamaley_sg@vector.nsc.ru

Для цитирования. Гамалей С.Г., Скарнович М.О., Мазурков О.Ю., Шишкина Л.Н., Башкина Е.С., Усова С.В., Иванова О.С., Левагина Г.М., Даниленко Е.Д. Противовирусные свойства композиционных препаратов двуспиральных РНК и интерферона альфа-2b человека. *Сиб. науч. мед. ж.* 2025;45(1):67–76. doi: 10.18699/SSMJ20250107

Antiviral properties of composition drugs based on double-stranded RNA and human interferon alpha-2b

S.G. Gamaley, M.O. Skarnovich, O.Yu. Mazurkov, L.N. Shishkina, E.S. Bashkina, S.V. Usova, O.S. Ivanova, G.M. Levagina, E.D. Danilenko

State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” of Rosпотребнадзор
630559, Novosibirsk region, Koltsovo

Abstract

The aim of this work was to obtain and study antiviral properties of a drug for intranasal use containing yeast double-stranded RNA (dsRNA) and recombinant human interferon alpha-2b (IFN- α 2b) incorporated into a delivery system (molecular construct). **Material and methods.** Molecular constructs carrying IFN- α 2b and dsRNA were obtained by our original method. For present study, the samples of intranasal dosage forms of three formulations were chosen: 50 μ g of dsRNA and 10, 50 or 100 IU of IFN- α 2b per one dose. The *in vitro* antiviral activity of the composition preparations was determined by inhibition of cytopathic effect (CPE) of murine encephalomyocarditis virus (EMCV), Columbia strain, in mouse L929 and L-68 cell cultures. The *in vivo* protective properties of the preparations were studied in white outbred ICR male mice intranasally infected with 10 lethal dose, 50 %, of influenza virus strain A/Aichi/2/68 (H3N2). The protection coefficient was calculated by average life expectancy and death of animals. **Results and discussion.** All the composition preparations used in this study demonstrated the ability to inhibit the destructive effect of the test virus and increase the number of viable cells in L929 and L-68 cultures. The enhancement of the protective effect was observed with increasing IFN- α 2b content in the drug formulation. The greatest antiviral activity was shown for the preparation containing 50 μ g of dsRNA and 100 IU of IFN- α 2b per dose. A composition preparation of the same formulation, administered intranasally three times at a dose of (2.5 mg dsRNA and 5000 IU IFN- α 2b)/kg according to the therapeutic and prophylactic regimen, protected 50 % of animals from death, which was not observed in a group administered with dsRNA alone. IFN- α 2b used at a dose equivalent to its content in the composition preparation had a similar but less pronounced effect. **Conclusions.** The results of the *in vitro* and *in vivo* experiments have confirmed the fact that combining interferon and its inducer enhances the antiviral effect of the composition drug compared to that of its components used separately. The data obtained testify to the prospects for the development of intranasal forms of antiviral drugs using a combination of interferon and dsRNA incorporated in a delivery system.

Key words: double-stranded RNAs, human interferon alpha-2b, molecular construct, cell culture, influenza virus, antiviral activity.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The study was conducted with the financial support of the State Assignment of the State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, GZ-38/21.

Correspondence author: Gamaley S.G., e-mail: gamaley_sg@vector.nsc.ru

Citation. Gamaley S.G., Skarnovich M.O., Mazurkov O.Yu., Shishkina L.N., Bashkina E.S., Usova S.V., Ivanova O.S., Levagina G.M., Danilenko E.D. Antiviral properties of composition drugs based on double-stranded RNA and human interferon alpha-2b. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal* = *Siberian Scientific Medical Journal*. 2025;45(1):67–76. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20250107

Введение

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) представляют собой наиболее распространенные инфекционные заболевания человека. К патогенным агентам, способным вызывать ОРВИ, относятся вирусы гриппа (ВГ), парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус, адено- и коронавирусы и ряд других вирусов. Один из самых опасных возбудителей респираторных инфекций – ВГ, быстрая эволюция которого приводит к появлению новых вирусных штаммов, способных «ускользнуть» от иммунного надзора организма. Результатом этого, согласно данным Института гриппа, является развитие ежегодных эпидемий, затрагивающих от 5 до 20 % населения, либо, при значительном изменении свойств вируса, – пандемий, в ходе которых заболевает каждый второй человек в популяции. Наибольшей опасности заражения подвержены представители группы риска: дети, пожилые люди, беременные женщины, лица с различными имму-

нодефицитами [1]. В случае тяжелых форм гриппа наблюдается развитие вторичных осложнений: присоединение бактериальной инфекции, развитие цитокинового шторма, внутренних геморрагий, которые в отдельных случаях способны приводить к летальному исходу [2].

Основным способом контроля быстро эволюционирующих вирусов служит вакцинация, обеспечивающая наиболее надежную защиту от заражения при совпадении характеристик вакцинного штамма и штамма-возбудителя инфекции. Однако высокая изменчивость вируса нередко приводит к появлению вариантов, по антигенным характеристикам не соответствующих антителам, выработанным в ходе вакцинации. Кроме того, мировой опыт иммунопрофилактики показывает, что в любой популяции встречаются люди с противопоказаниями к вакцинации [1], а среди вакцинированных всегда имеется группа лиц, не отвечающих на вакцину или слабо реагирующих на нее [3]. Поэтому нередко един-

ственным способом предотвращения развития заболевания и борьбы с ним является химиотерапия. К несомненным достоинствам применения химиотерапевтических средств специфического действия относится направленность воздействия и, как следствие, выраженность клинического эффекта. В то же время следует отметить и ряд недостатков специфической терапии, таких как развитие побочных эффектов, быстрое формирование устойчивости к препаратам вирусных агентов, особенно на фоне длительного применения у лиц с ослабленной иммунной системой [4]. В связи с этим понятен интерес к неспецифическим средствам противовирусной защиты, в частности интерферонам (ИФН) и их индукторам.

Двуспиральные РНК (дсРНК) принадлежат к особому классу индукторов ИФН, обладающих широким спектром биологического действия. Первичный каскад ответных реакций организма на вирусное заражение и введение экзогенной дсРНК (узнавание, инициация внутриклеточных сигнальных путей) имеет много общего, что позволяет рассматривать эти соединения как естественные регуляторы противовирусных реакций [5, 6]. Препараты дсРНК оказывают защитный эффект в отношении широкого спектра вирусов, таких как вирусы гриппа, герпеса, клещевого энцефалита, ВИЧ и т.д. [7–9]. Другим классом противовирусных лекарственных средств, интерес к которым не угасает уже несколько десятилетий, являются ИФН, прежде всего ИФН- α . В настоящее время накоплен большой объем данных, свидетельствующих о выраженной активности ИФН данного типа в отношении вирусов разных семейств (вирусы гепатита В и С, поксвирусы, флавивирусы) [10–12], причем эффекты ИФН могут усиливаться при их одновременном применении с индукторами [13, 14]. Эти данные позволяют предположить, что сочетание в одном препарате ИФН и его индуктора способно привести к повышению эффективности противовирусного средства.

Одной из проблем применения белковых и нуклеиновых препаратов в клинической практике является их быстрая деградация под действием ферментов биологических жидкостей. Среди методических приемов, которые используются для решения данной проблемы, можно выделить разработку средств доставки – транспортных форм, способных обеспечить защиту биологически активных компонентов, пролонгацию и, в определенных случаях, усиление их биологической активности. Работы по созданию транспортных форм цитокинов (в виде неорганических наночастиц, синтетических полимеров, липосом) ведутся во многих странах мира. Накоплен довольно

внушительный экспериментальный материал, свидетельствующий о том, что использование этих транспортных систем позволяет обеспечить стабилизацию и повысить активность белков [15–17].

В ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии (ГНЦ ВБ) «Вектор» Роспотребнадзора разработана модель молекулярной конструкции для депонирования белков и нуклеиновых кислот с целью их защиты от ферментов и транспортировки к клеткам-мишеням. Конструкция представляет собой наночастицу, которая содержит в центральной части дрожжевую дсРНК, покрытую оболочкой из спермидина и полиглобулина, удерживаемой за счет ионного взаимодействия между положительно заряженным спермидином и отрицательно заряженной дсРНК, а на поверхности – молекулы рекомбинантных белков [18]. Данный методический подход использован нами для получения композиционного препарата, содержащего в своем составе дсРНК и ИФН- $\alpha 2b$ человека.

Поскольку «входными воротами» респираторных инфекций являются слизистые оболочки, очевидно, что для лечения данных заболеваний предпочтителен трансмукозальный (интраназальный) способ доставки лекарственных препаратов. Целью настоящей работы являлось получение и исследование противовирусных свойств лекарственного препарата для интраназального применения, содержащего индуктор ИФН, дрожжевую дсРНК, и рекомбинантный ИФН- $\alpha 2b$ человека в составе молекулярной конструкции.

Материал и методы

Для получения молекулярных конструкций, содержащих дсРНК и рекомбинантный ИФН- $\alpha 2b$, использовали натриевую соль дсРНК (субстанция) с содержанием дсРНК 21,96 % (производство Института медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия) и ИФН- $\alpha 2b$ человека (субстанция) (АО «Вектор-Медика», Россия) с активностью $6,6 \times 10^6$ МЕ/мл. Процесс получения конструкций включал две стадии: синтез конъюгата ИФН- $\alpha 2b$ с полиглобулином и спермидином и сборку молекулярной конструкции. На первой стадии декстран 40000 Да (AppliChem, США) окисляли периодатом натрия (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 1:40 (моль/моль) в течение 1 ч с последующей очисткой от непрореагировавших компонентов гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25 (Pharmacia, Швеция). В раствор активированного декстрана вносили последовательно, с интервалом в 2 ч, ИФН- $\alpha 2b$ в соот-

ношении 1:1 (моль декстрана/моль периодата) и спермидин (Sigma-Aldrich) в соотношении 1:10 (моль декстрана/моль спермидина). После 2 ч инкубирования реакцию останавливали боргидридом натрия (Sigma-Aldrich) в соотношении 1:80 (моль декстрана/моль боргидрида). Раствор выдерживали 2 ч, после чего проводили очистку синтезированного конъюгата от исходных компонентов гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25. Все процессы на данной стадии велись при комнатной температуре. Молекулярную конструкцию на второй стадии процесса получали смешиванием дсРНК и конъюгата в соотношении $5 \times 10^6:1$; $1 \times 10^6:1$; $5 \times 10^5:1$ (по массе и мкг/мкг соответственно, состав 1, 2 и 3). Реакционную смесь выдерживали в течение 1 ч при 2–8 °С, продукт очищали от непрореагировавших компонентов гель-фильтрацией на сефарозе-6В (Pharmacia).

Интраназальную форму препарата получали путем смешивания раствора молекулярной конструкции со вспомогательными компонентами: динатриевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (AppliChem, Германия), диметилсульфоксидом (ООО «Йодные Технологии и Маркетинг», Россия), полиэтиленгликолем 400 (Panreac, Германия) и хлоридом натрия в условиях асептики с последующей лиофилизацией. Конечная концентрация каждого вспомогательного компонента в составе интраназальной формы препарата составляла 0,5 мг/мл. Процесс лиофилизации вели в камере лиофильной сушки с опцией пневматической укупорки в автоматическом режиме с заморозкой образцов до $-(70 \pm 2)$ °С в течение 6 ч и сублимацией в течение 16 ч при температуре 22 ± 2 °С.

Препараты анализировали методом электрофореза в 1%-м геле агарозы (Serva, Германия) с последующим окрашиванием бромистым этидином (Sigma-Aldrich) в камере для электрофореза SE-1 с источником питания «Эльф-4» («ДНК-технологии», Россия). О подлинности препарата судили по наличию индивидуальных (L- и M-) форм дсРНК. Гели документировали с помощью системы GI-2 («Хеликон», Россия) с трансиллюминатором ECX-20.M (VilberLourmat, Франция). Содержание белка в образцах определяли методом Лоури.

Противовирусную активность препаратов *in vitro* определяли микрометодом в 96-луночных планшетах по подавлению цитопатического действия тест-вируса в культуре клеток в соответствии с [19]. Оценку противовирусной активности дсРНК проводили в культуре мышинных фибробластов L929, клон линии клеток L; ИФН- $\alpha 2b$ – на линии диплоидных клеток эмбриона легкого человека L-68, полученных из коллекции культур

клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Перед проведением анализа на культуре клеток L929 исследуемые препараты и препарат сравнения (субстанция дсРНК) вводили белым аутбредным самцам мышей ICR с массой тела 18–20 г (2,5 мг/кг по дсРНК, внутривенно), через 6 ч после введения забирали образцы крови и готовили сыворотки для определения противовирусной активности. Для титрования на культуре L-68 готовили двукратные последовательные разведения исследуемых препаратов, после чего проводили анализ в соответствии с [19]. В качестве тест-вируса использовали вирус энцефаломиокардита мышей (EMCV), штамм «Колумбия», полученный из Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Препаратами сравнения служили препараты субстанции дсРНК и ИФН- $\alpha 2b$. Противовирусную активность оценивали по титру ИФН, который определяли как величину, обратную разведению сыворотки крови мышей либо препаратов, защищавшему 50 % клеток от цитопатического действия EMCV в дозе 100 ЦПД₅₀ (50%-я цитопатическая доза), и выражали в двоичных логарифмах 50%-х интерфероновых единиц в миллиметрах ($\log_2$ ИЕ₅₀/мл).

Результаты исследования в культуре клеток обрабатывали с помощью пакета программ Statgraphics, Vers.5.0 (Statistical Graphics Corp., США). Для оценки межгрупповых различий применяли непараметрический Н-критерий Краскела – Уоллиса и U-критерий Манна – Уитни. Критический уровень статистической значимости (p) для множественных сравнений принимали равным 0,05. При обнаружении статистически значимых различий проводили апостериорные сравнения с помощью двухвыборочного критерия Манна – Уитни, при этом скорректированный критический уровень значимости (p) для шести попарных сравнений принимали равным 0,0085 (при $p = 95$ %).

Противовирусную активность препаратов в системе *in vivo* исследовали на белых аутбредных самцах мышей ICR 5-недельного возраста с массой тела 14–17 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Содержание мышей и эксперименты на них осуществляли в соответствии с российскими и международными требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях (Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза

по охране животных, используемых в научных целях).

Для воспроизведения вирусной модели использовали адаптированный к мышам ВГ A/Aichi/2/68 (H3N2) из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Мышей, анестезированных изофлураном с помощью установки для газовой анестезии SomnoFlo (Kent Scientific Corporation, США), интраназально заражали ВГ в дозе 10 ЛД₅₀ (полуетальная доза) в объеме 40 мкл суммарно в обе ноздри. Для оценки противовирусной активности препаратов животных распределяли на девять экспериментальных групп случайным образом, по 10 особей в группе. Мышам опытных групп интраназально вводили препараты трех составов. Доза дсРНК во всех вариантах составляла 2,5 мг/кг (50 мкг на мышь), доза ИФН- α 2b при введении препарата состава 1 – 500 МЕ/кг, состава 2 – 2500 МЕ/кг, состава 3 – 5000 МЕ/кг (10, 50 или 100 МЕ на мышь соответственно). Животные групп сравнения получали интраназально раствор субстанции дсРНК либо ИФН- α 2b в дозах, эквивалентных введенным мышам опытных групп. Композиционные препараты и препараты сравнения вводили интраназально за 3 ч до заражения ВГ, через 1 и 3 сут после заражения в объеме 25 мкл/мышь суммарно. Положительным контролем являлся противовирусный препарат тамифлю (F. Hoffmann–La Roche, Швейцария), который вводили мышам восьмой группы перорально через 1 ч после заражения ВГ и далее дважды в сутки в течение 4 сут после заражения в разовой дозе 15 мг/кг (суточная доза 30 мг/кг). Животные, инфицированные ВГ и не получавшие препаратов, составляли группу отрицательного контроля.

Противовирусную активность препаратов оценивали по показателю гибели животных в течение 16 суток наблюдения после заражения ВГ, рассчитывали коэффициент защиты как разницу между долей выживших опытных и контрольных мышей, определяли среднюю продолжительность их жизни (СПЖ). За максимальное значение продолжительности жизни для выживших животных принимали 16 суток после заражения ВГ, т.е. гарантированное время прекращения гибели инфицированных мышей.

Статистическую обработку и сравнение данных, полученных при изучении противовирусной активности препаратов, осуществляли с помощью пакета компьютерных программ анализа данных Statistica 12 (StatSoft, США). Для проверки статистических гипотез о виде распределения показателей применяли критерий Колмогорова – Смирнова при вероятности ошибки $p > 0,10$. СПЖ представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее

арифметическое значение, m – ошибка среднего. Сравнение СПЖ мышей в разных группах проводили с использованием U-критерия Манна – Уитни. Для оценки межгрупповых различий доли выживших животных использовали критерий χ^2 с учетом поправки Йейтса для малых выборок. Различия показателей выживаемости животных оценивали с помощью кривых Каплана – Майера по логранговому критерию. Отличия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Ранее в ходе экспериментов на культурах клеток и мышах, инфицированных вирусом гриппа, показано, что композиции, содержащие природные дсРНК, выделенные из различных источников (дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, фаг ф6), и рекомбинантные ИФН- α и ИФН- γ человека обладают более высокой иммуномодулирующей и противовирусной активностью по сравнению с индивидуальными препаратами [20, 21]. Синергидный эффект компонентов в композициях отмечен при соотношении: дсРНК – 50 мкг на дозу (0,2 мл) восстановленного раствора, ИФН – от 10 до 100 МЕ. Аналогичный диапазон доз использован при получении препаратов, содержащих дсРНК и ИФН- α 2b в составе молекулярных конструкций: препарат состава 1 – дсРНК 50 мкг, ИФН- α 2b 10 МЕ/дозу; состав 2 – дсРНК 50 мкг, ИФН- α 2b 50 МЕ/дозу; состав 3 – дсРНК 50 мкг, ИФН- α 2b 100 МЕ/дозу. Интраназальные формы содержали, помимо активных компонентов, вспомогательные вещества – этилендиаминетрауксусную кислоту (антиоксидант, хелатообразователь), диметилсульфоксид (активатор всасывания), полиэтиленгликоль 400 (неионогенное поверхностно-активное вещество) и хлорид натрия (стабилизатор, обеспечивающий изотоничность восстановленного раствора). Исследование на культурах клеток показало, что все препараты дсРНК – ИФН- α 2b проявляют противовирусные свойства, различающиеся по степени выраженности.

В соответствии с дизайном эксперимента противовирусную активность дсРНК оценивали по способности повышать синтез ИФН у мышей, активность которого определяли на фибробластах. Защитный эффект сывороток крови мышей, которым вводили препараты дсРНК в конструкциях, в культуре клеток L929, инфицированной EMCV, усиливался при введении в состав препарата ИФН- α 2b; противовирусная активность препарата, содержащего дсРНК (50 мкг/дозу) и ИФН- α 2b (100 МЕ/дозу), статистически значимо больше, чем препарата сравнения дсРНК и ком-

Таблица 1. Противовирусная активность препаратов, содержащих дсРНК и ИФН- α 2b, определенная в культурах клеток L929 и L-68**Table 1.** Antiviral activity of drugs containing dsRNA and IFN- α 2b, determined in L929 and L-68 cell cultures

Клеточная линия	Титр ИФН ($\log_2$ ИЕ ₅₀ /мл) в композиционных препаратах (L-68) и сыворотке крови получавших их мышей (L929), содержащих ИФН- α 2b в количестве			
	0	10 МЕ / доза	50 МЕ / доза	100 МЕ / доза
L929	10,07 $\pm$ 0,32 (20)	9,87 $\pm$ 0,27 (20)	10,47 $\pm$ 0,36 (20)	11,97 $\pm$ 0,36 (20) * $p = 0,0005$; # $p = 0,0001$; ^ $p = 0,0064$
L-68	12,32 $\pm$ 0 (4)	11,65 $\pm$ 0,33 (4)	11,99 $\pm$ 0,88 (4)	13,07 $\pm$ 0,22 (4)

Примечание. В скобках указан объем выборки; обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей группы с содержанием ИФН- α 2b: * – 0, # – 10 МЕ / доза, ^ – 50 МЕ / доза.

позиционных препаратов с меньшим содержанием ИФН (табл. 1). Противовирусную активность человеческого ИФН- α 2b, как компонента конструкции, оценивали в культуре эмбриональных клеток легкого человека L-68. Достоверных отличий в титрах ИФН в этом случае не наблюдали, однако следует отметить тенденцию к увеличению значений показателя под действием препарата, содержащего ИФН в максимальной дозе (100 МЕ/дозу) (см. табл. 1).

Исследование противовирусной активности конструкций, содержащих дсРНК и ИФН- α 2b, *in vivo* проведено на экспериментальной модели гриппозной инфекции, вызванной введением вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2), в сравнении с тамифлю. Показано, что введение тамифлю в течение 5 суток после заражения летальной дозой вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) (группа 8) защищало от гибели 60 % инфицированных мышей (табл. 2). СПЖ мышей этой группы значительно превышала показатели контрольных животных (более чем на 5 суток). Эти данные подтверждают адекватность использованной вирусной модели в экспериментах на мышах и ее чувствительность к противовирусным препаратам. Введение препарата состава 3 по лечебно-профилактической схеме (группа 3) обеспечивало защиту 50 % инфицированных животных при достоверном отличии доли выживших и незначительном увеличении СПЖ на 3,8 суток ($p = 0,2$) по сравнению с контрольной группой (см. табл. 2). Доля выживших и СПЖ мышей, которым вводили препарат состава 3, статистически значимо не отличались от показателей животных группы препарата сравнения тамифлю ($1,0 \geq p \geq 0,4$).

Выраженная тенденция к увеличению защитного действия отмечена в группе 7, которой вводили ИФН- α 2b в дозе 5000 МЕ/кг: препарат защищал от гибели 40 % животных, а СПЖ увеличилась на 3,2 дня ($p = 0,1$) относительно

группы контроля (см. табл. 2). Обращает на себя внимание отсутствие отличий по показателям выживаемости мышей групп 3 и 7 от животных группы тамифлю. В группах мышей 1 и 6, которым вводили исследуемый препарат состава 1 или препарат сравнения ИФН- α 2b в дозе 2500 МЕ/кг, к концу срока наблюдения выжило 20 % инфицированных животных, а СПЖ практически не изменилась (см. табл. 2). В группе 2, животным которой вводили препарат состава 2, отмечена выживаемость одной мыши из 10, что соответствует показателям контроля (см. табл. 2). Препарат сравнения ИФН- α 2b в дозе 500 МЕ/кг (группа 5) не обеспечивал защиты инфицированных мышей, погибли все животные (см. табл. 2).

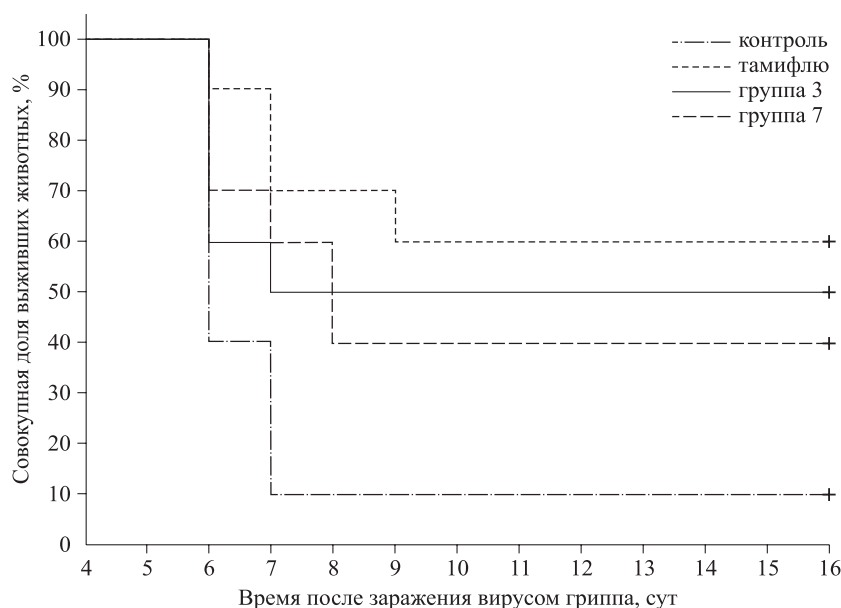
Анализ графиков выживаемости, построенных по методу Каплана – Майера (рисунок), выявил значимые отличия между контрольной группой мышей, инфицированных штаммом ВГ A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 10 ЛД₅₀, и группой инфицированных животных, получавших тамифлю ($p = 0,01$). В группах мышей, которым вводили препарат состава 3 (группа 3) и препарат сравнения ИФН- α 2b в дозе 5000 МЕ/кг (группа 7), продемонстрирована выраженная тенденция к повышению выживаемости относительно контроля ($p = 0,08$ и $p = 0,07$ соответственно). При этом отличий выживаемости инфицированных ВГ мышей в группах при введении тамифлю, состава 3 (группа 3) и ИФН- α 2b в дозе 5000 МЕ/кг (группа 7) не обнаружено ($p = 0,52$). Не наблюдалось различий выживаемости инфицированных ВГ мышей при введении состава 1 и 2, а также препаратов сравнения дсРНК (группа 4) и ИФН- α 2b в дозах 500, 2500 (группы 5, 6) (на графиках не представлены) от контрольной группы инфицированных ВГ мышей ($p > 0,05$).

Таким образом, данные, полученные в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, подтверждают тот факт, что объединение ИФН и его индуктора уси-

Таблица 2. Показатели выживаемости мышей, инфицированных вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 10 ЛД₅₀ при введении препаратов дсРНК и ИФН-α2b и в контроле**Table 2.** Survival rates of mice infected with 10 LD₅₀ of influenza A/Aichi/2/68 (H3N2) virus in groups received dsRNA and IFN-α2b preparations and in control

№ группы	Препарат	Доза и схема введения препарата	Выжившие животные, n (%)	Коэффициент защиты, %	СПЖ, сут
1	Состав 1 (n = 10)	дсРНК – 2,5 мг/кг, ИФН-α2b – 500 МЕ/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	2 [#] (20)	10	8,3 ± 4,1 [#]
2	Состав 2 (n = 10)	дсРНК – 2,5 мг/кг, ИФН-α2b – 2500 МЕ/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	1 [#] (10)	0	7,8 ± 3,0 [#]
3	Состав 3 (n = 10)	дсРНК – 2,5 мг/кг, ИФН-α2b – 5000 МЕ/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	5* (50)	40	11,1 ± 5,2
4	Субстанция дсРНК	2,5 мг/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	2 [#] (20)	10	8,4 ± 4,1 [#]
5	ИФН-α2b, 10 МЕ/мышь (n = 10)	500 МЕ/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	0 [#] (0)	(–10)	6,4 ± 0,5 [#]
6	ИФН-α2b, 50 МЕ/мышь (n = 10)	2500 МЕ/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	2 [#] (20)	10	8,6 ± 3,9 [#]
7	ИФН-α2b, 100 МЕ/мышь (n = 10)	5000 МЕ/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	4 (40)	30	10,5 ± 4,8
8	Тамифлю (n = 10)	По 15 мг/кг 2 раза в сутки, п/о через 1 ч п/з ВГ и далее в течение 4-х сут п/з	6* (60)	50	12,5 ± 4,6*
9	Контроль ВГ (n = 10)	н/в	1 [#] (10)	н/о	7,3 ± 3,1 [#]

Примечание. И/н – интраназально; п/о – перорально; д/з – до заражения; п/з – после заражения; н/в – препараты не вводили; н/о – показатель не определяют; обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – группы контроля, ^ – группы тамифлю.



Графики выживаемости животных, построенные по методу Каплана – Мейера, при заражении штаммом ВГ A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 10 ЛД₅₀ в группах контроля и тамифлю и при введении препаратов в группах 3 и 7; «+» – окончание срока наблюдения (эмпирически установленное, гарантированное время прекращения гибели мышей, инфицированных ВГ)

Kaplan – Meier survival curves of mice infected with influenza virus strain A/Aichi/2/68 (H3N2) at a dose of 10 LD₅₀ in control and tamiflu groups, and in groups 3 and 7 administered with composition drugs; “+” – end of observation period (an empirically established, guaranteed death termination time of influenza virus-infected mice)

ливают эффект композиционного препарата по сравнению с эффектом его компонентов, что ранее мы уже наблюдали на примере композиций того же состава [20, 21]. Отсутствие существенных различий между показателями мышей, которым вводили препарат состава 3 и ИФН- $\alpha 2b$ в эквивалентной дозе, свидетельствует о значимом вкладе в реализацию противовирусного эффекта данного компонента конструкции. Как известно, один из ключевых механизмов противовирусного действия ИФН, синтез которых в клетке усиливают дсРНК, связан с экспрессией двух типов ферментов: генов 2'-5'-олигоаденилатсинтетазы/РНКазы L (OAS/RNase L), продукты которых вызывают деградацию вновь синтезированной в клетке матричной РНК, в том числе вирусной [22], а также гена протеинкиназы R (PKR), ингибирующей синтез белка [23, 24]. При этом установлено, что оба фермента являются дсРНК-зависимыми и переходят в активное состояние лишь в присутствии дсРНК [25, 26]. Данный факт свидетельствует о том, что дсРНК являются не только индукторами ИФН, но и модуляторами ИФН-индуцированных внутриклеточных противовирусных реакций. Можно предположить, что именно это взаимодействие лежит в основе синергидного эффекта, наблюдавшегося в наших экспериментах, хотя не исключена взаимная модуляция и на уровне клеток и систем организма.

Заключение

В экспериментах на культурах клеток L929 и L-68 показано, что препарат, содержащий дсРНК и ИФН- $\alpha 2b$ в составе молекулярной конструкции, оказывает более выраженный противовирусный эффект по сравнению с компонентами конструкции, препятствуя деструктивному действию вируса EMCV. Отмечено дозозависимое усиление эффекта при увеличении в препарате содержания ИФН- $\alpha 2b$. На экспериментальной модели гриппозной инфекции мышей установлено, что препарат, содержащий ИФН- $\alpha 2b$ и индуктор ИФН дсРНК, при трехкратном интраназальном введении в дозе (2,5 мг дсРНК и 5000 МЕ ИФН- $\alpha 2b$)/кг проявляет противовирусную активность в отношении ВГ А/Aichi/2/68 (H3N2), чего не наблюдалось после введения дсРНК. Препараты сравнения ИФН- $\alpha 2b$ в дозе, эквивалентной его содержанию в конструкции, обладали аналогичным, но менее выраженным действием. Полученные данные свидетельствуют о перспективности создания интраназальной формы лекарственных препаратов с использованием ИФН и дсРНК в составе средства доставки.

Список литературы / References

1. Зарубаев В.В., Гаршинина А.В., Слита А.В., Белявская С.В., Лаврентьева И.Н. Противовирусная активность Кагоцела на модели экспериментальной летальной гриппозной инфекции. *Антибиотики и химиотерапия*. 2020;65(1-2):15–20. doi: 10.37489/0235-2990-2020-65-1-2-15-20
2. Zarubaev V.V., Garshinina A.V., Slita A.V., Belyavskaya S.V., Lavrentieva I.N. Antiviral activity of Kagocel® on the model of experimental lethal influenza infection. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*. 2020;65(1-2):15–20. [In Russian]. doi: 10.37489/0235-2990-2020-65-1-2-15-20
3. Khanna M., Kumar P., Choudhary K., Kumar B., Vijayan V.K. Emerging influenza virus: a global threat. *J. Biosci.* 2008;33(4):475–482. doi: 10.1007/s12038-008-0066-z
4. Omel'chenko N.D., Ivanova I.A., Besspalova I.A., Filippenko A.V. Иммуномодуляторы и специфическая профилактики инфекционных заболеваний. *Пробл. особо опас. инфекций*. 2017;(3):21–26. doi: 10.21055/0370-1069-2017-3-21-26
5. Omel'chenko N.D., Ivanova I.A., Besspalova I.A., Filippenko A.V. Immunomodulators and specific prophylaxis of infectious diseases. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017;(3):21–26. [In Russian]. doi: 10.21055/0370-1069-2017-3-21-26
6. Kossyvakis A., Mentis A.A., Tryfinopoulou K., Pogka V., Kalliaropoulos A., Antalis E., Lytras T., Meijer A., Tsiodras S., Karaktis P., Mentis A.F. Antiviral susceptibility profile of influenza A viruses: keep an eye on immunocompromised patients under prolonged treatment. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2017;36(2):361–371. doi: 10.1007/s10096-016-2809-3
7. Даниленко Е.Д., Белкина А.О., Сысоева Г.М. Создание лекарственных препаратов на основе высокополимерных двуспиральных РНК для противовирусной и противоопухолевой терапии. *Биомед. химия*. 2019;65(4):277–293. doi: 10.18097/PBMC20196504277
8. Danilenko E.D., Belkina A.O., Sysoeva G.M. Development of drugs based on high-polymeric double-stranded RNA for antiviral and antitumor therapy. *Biochemistry (Moscow), Suppl. Ser. B*. 2019;13(4):308–323. doi: 10.1134/S1990750819040036
9. Semple S.L., Au S.K.W., Jacob R.A., Mossman K.L., DeWitte-Orr S.J. Discovery and use of long dsRNA mediated RNA interference to stimulate antiviral protection in interferon competent mammalian cells. *Front. Immunol.* 2022;(13):859749. doi: 10.3389/fimmu.2022.859749
10. Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н. Использование индукторов интерферона при вирусных инфекциях. *Вопр. вирусол.* 2015;60(2):5–10.

- Ershov F.I., Narovlyansky A.N. Usage of interferon inducers during viral infections. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 2015;60(2):5–10. [In Russian].
8. Полосков В.В., Ершов Ф.И. Активаторы синтеза интерферонов (обзор). *Разработ. и регистрац. лекарств. средств*. 2017;(1):188–192.
- Poloskov V.V., Ershov F.I. Activation of synthesis of endogenous interferon (Review). *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development and Registration*. 2017;(1):188–192. [In Russian].
9. Wong J.P., Nagata L.P., Christopher M.E., Salazar A.M., Dale R.M. Prophylaxis of acute respiratory virus infections using nucleic acid-based drugs. *Vaccine*. 2005;23(17-18):2266–2268. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.01.037
10. de Clercq E. Interferon and its inducers – a never-ending story: “old” and “new” data in a new perspective. *J. Infect. Dis.* 2006;194(Suppl 1):19–26. doi: 10.1086/505351
11. Pierson T.C., Diamond M.S. The continued emerging threat of flaviviruses. *Nat. Microbiol.* 2020;5(6):796–812. doi: 10.1038/s41564-020-0714-0
12. Мясников А.Л., Бернс С.А., Талызин П.А., Ершов Ф.И. Интерферон гамма в терапии пациентов с COVID-19 среднетяжелого течения. *Вопр. вирусол.* 2021;66(1):47–54. doi: 10.36233/0507-4088-24
- Myasnikov A.L., Berns S.A., Talyzin P.A., Ershov F.I. Interferon gamma in the treatment of patients with moderate COVID-19. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 2021;66(1):47–54. [In Russian]. doi: 10.36233/0507-4088-24
13. Pantelic L., Sivakumaran H., Urosevic N. Differential induction of antiviral effects against West Nile virus in primary mouse macrophages derived from flavivirus-susceptible and congenic resistant mice by alpha/beta interferon and poly(I-C). *J. Virol.* 2005;79(3):1753–1764. doi: 10.1128/JVI.79.3.1753-1764.2005
14. Morrey J.D., Day C.W., Julander J.G., Blatt L.M., Smee D.F., Sidwell R.W. Effect of interferon-alpha and interferon-inducers on West Nile virus in mouse and hamster animal models. *Antivir. Chem. Chemother.* 2004;15(2):101–109. doi: 10.1177/095632020401500202
15. Farma J.M., Puhlmann M., Soriano P.A., Cox D., Paciotti G.F., Tamarkin L., Alexander H.R. Direct evidence for rapid and selective induction of tumor neovascular permeability by tumor necrosis factor and a novel derivative, colloidal gold bound tumor necrosis factor. *Int. J. Cancer*. 2007;120(11):2474–2480. doi: 10.1002/ijc.22270
16. Messerschmidt S.K., Musyanovych A., Altvater M., Scheurich P., Pfizenmaier K., Landfester K., Kontermann R.E. Targeted lipid-coated nanoparticles: delivery of tumor necrosis factor-functionalized particles to tumor cells. *J. Control. Release*. 2009;137(1):69–77. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.03.010
17. Johnson M.B., Chandler M., Afonin K.A. Nucleic acid nanoparticles (NANPs) as molecular tools to direct desirable and avoid undesirable immunological effects. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2021;(173):427–438. doi: 10.1016/j.addr.2021.04.011
18. Масычева В.И., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д., Сысоева Г.М., Гамалей С.Г. Противоопухолевое средство на основе наночастиц, несущих рекомбинантный фактор некроза опухоли альфа человека. Пат. 2386447 РФ; опублик. 20.04.2010.
- Masycheva V.I., Lebedev L.R., Danilenko E.D., Sysoeva G.M., Gamaley S.G. Anticancer drug based on nanoparticles bearing recombinant human tumour necrosis factor alpha. Patent 2386447 RF; published 20.04.2010. [In Russian].
19. ОФС.1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток. *Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV издание*, 2018, 2, 2740–2749. Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0002-15-biologicheskie-metody-ispytaniya-preparatov-interferona-s-ispolzovaniem-kultur-kletok/>
- OFS.1.7.2.0002.15. Cell-Culture Bioassays for Interferon Products. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*, XIV edition, 2018, 2, 2740–2749. Available at: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0002-15-biologicheskie-metody-ispytaniya-preparatov-interferona-s-ispolzovaniem-kultur-kletok/> [In Russian].
20. Гамалей С.Г., Скарнович М.О., Макаревич Е.В., Мазурков О.Ю., Шишкина Л.Н., Иванова О.С., Левагина Г.М., Даниленко Е.Д. Противовирусная активность композиционного препарата дрожжевой двуспиральной РНК и интерферона альфа на модели экспериментальной гриппозной инфекции мышей. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023;68(7–8):27–33. doi: 10.10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-27-33
- Gamaley S.G., Skarnovich M.O., Makarevich E.V., Mazurkov O.Yu., Shishkina L.N., Ivanova O.S., Levagina G.M., Danilenko E.D. Antiviral activity of double-stranded ribonucleic acid and interferon alpha composition in the model of experimental influenza infection of mice. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023;68(7–8):27–33. [In Russian]. doi: 10.10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-27-33
21. Иванова О.С., Левагина Г.М., Башкина Е.С., Усова С.В., Телегина Ю.В., Гамалей С.Г., Ломзов А.А., Даниленко Е.Д. Лекарственные средства для интраназального применения на основе интерферонов и их индуктора: получение и исследование свойств. *Биофармац. ж.* 2023;15(4):14–20. doi: 10.30906/2073-8099-2023-15-4-14-20
- Ivanova O.S., Levagina G.M., Bashkina E.S., Usova S.V., Telegina Yu.V., Gamaley S.G., Lomzov A.A., Danilenko E.D. Drugs for intranasal use based on interferons and their inductor: obtaining and investigation

of properties. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2023;15(4):32–44. [In Russian]. doi: 10.30906/2073-8099-2023-15-4-14-20

22. Silverman R.H. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J. Virol.* 2007;81(23):12720–12729. doi: 10.1128/JVI.01471-07

23. García M.A., Gil J., Ventoso I., Guerra S., Dominguez E., Rivas C., Esteban M. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006;70(4):1032–1060. doi: 10.1128/MMBR.00027-06

24. Zhang P., Samuel C.E. Protein kinase PKR Plays a stimulus- and virus-dependent role in apoptotic death and virus multiplication in human cells. *J. Virol.* 2007;81(15):8192–8200. doi: 10.1128/JVI.00426-07

25. Cole J.L. Activation of PKR: An open and shut case? *Trends Biochem. Sci.* 2007;32(2):57–62. doi: 10.1016/j.tibs.2006.12.003

26. Calderon B.M., Conn G.L. A human cellular noncoding RNA activates the antiviral protein 2'-5'-oligoadenylate synthetase 1. *J. Biol. Chem.* 2018;293(41):16115–16124. doi: 10.1074/jbc.RA118.004747

Сведения об авторах:

Гамалей Светлана Георгиевна, ORCID: 0000-0002-7441-333X, e-mail: gamaley_sg@vector.nsc.ru

Скарнович Максим Олегович, ORCID: 0000-0001-7096-5754, e-mail: skarnovich@vector.nsc.ru

Мазурков Олег Юрьевич, к.б.н., ORCID: 0000-0001-8164-4091, e-mail: mazurkov_oyu@vector.nsc.ru

Шишкина Лариса Николаевна, д.м.н., ORCID: 0000-0002-8264-0217, e-mail: shish@vector.nsc.ru

Башкина Елена Сергеевна, ORCID: 0009-0004-4134-2303, e-mail: bashkina_es@vector.nsc.ru

Усова Светлана Владимировна, к.м.н., ORCID: 0000-0001-5059-2778, e-mail: usova_sv@vector.nsc.ru

Иванова Ольга Сергеевна, к.б.н., ORCID: 0000-0002-4243-3600, e-mail: ivanova_os@vector.nsc.ru

Левагина Галина Михайловна, к.б.н., ORCID: 0000-0002-6749-5074, e-mail: levagina_gm@vector.nsc.ru

Даниленко Елена Дмитриевна, к.б.н., ORCID: 0000-0001-5026-1602, e-mail: danilenko_ed@vector.nsc.ru

Information about the authors:

Svetlana G. Gamaley, ORCID: 0000-0002-7441-333X, e-mail: gamaley_sg@vector.nsc.ru

Maxim O. Skarnovich, ORCID: 0000-0001-7096-5754, e-mail: skarnovich@vector.nsc.ru

Oleg Yu. Mazurkov, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0001-8164-4091, e-mail: mazurkov_oyu@vector.nsc.ru

Larisa N. Shishkina, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-8264-0217, e-mail: shish@vector.nsc.ru

Elena S. Bashkina, ORCID: 0009-0004-4134-2303, e-mail: bashkina_es@vector.nsc.ru

Svetlana V. Usova, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-5059-2778, e-mail: usova_sv@vector.nsc.ru

Olga S. Ivanova, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-4243-3600, e-mail: ivanova_os@vector.nsc.ru

Galina M. Levagina, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-6749-5074, e-mail: levagina_gm@vector.nsc.ru

Elena D. Danilenko, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0001-5026-1602, e-mail: danilenko_ed@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 25.09.2024

После доработки 01.11.2024

Принята к публикации 10.01.2025

Received 25.09.2024

Revision received 01.11.2024

Accepted 10.01.2025