

Противовирусная активность композиционного препарата дрожжевой двуспиральной РНК и интерферона альфа на модели экспериментальной гриппозной инфекции мышей

*С. Г. ГАМАЛЕЙ, М. О. СКАРНОВИЧ, Е. В. МАКАРЕВИЧ, О. Ю. МАЗУРКОВ, Л. Н. ШИШКИНА, О. С. ИВАНОВА, Г. М. ЛЕВАГИНА, Е. Д. ДАНИЛЕНКО

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация

Antiviral Activity of Double-Stranded Ribonucleic Acid and Interferon Alpha Composition in the Model of Experimental Influenza Infection of Mice

*SVETLANA G. GAMALEY, MAXIM O. SKARNOVICH, ELENA V. MAKAREVICH, OLEG YU. MAZURKOV, LARISA N. SHISHKINA, OLGA S. IVANOVA, GALINA M. LEVAGINA, ELENA D. DANILENKO

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

Резюме

Высокий уровень изменчивости вирусов гриппа требует разработки, наряду с новыми специфическими средствами профилактики и лечения, препаратов-стимуляторов неспецифической устойчивости. Универсально широким спектром действия среди противовирусных препаратов обладают интерфероны и их индукторы. В ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора разработана технология и получены композиционные препараты, содержащие индуктор интерферона двуспиральную рибонуклеиновую кислоту из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и рекомбинантный интерферон альфа-2b человека (ИФН-альфа-2b). В культурах клеток L-68 и L-929 показано наличие специфической противовирусной активности препаратов и синергидного эффекта компонентов в составе композиций. Цель работы — изучение противовирусной активности интраназальных форм композиционных препаратов, содержащих дрожжевую дсРНК и рекомбинантный интерферон альфа-2b человека, на модели летальной гриппозной инфекции мышей. Мышей аутбредной популяции ICR (CD-1) интраназально инфицировали вирусом гриппа (ВГ) A/Aichi/2/68 (H3N2). Препараты вводили интраназально за 3 ч до заражения ВГ, через 1 и 3 сут после заражения. Дозы активных компонентов при введении композиций составляли: по дсРНК — 2,5 мг/кг, по ИФН-альфа-2b — 500 МЕ/кг, 2500 МЕ/кг или 5000 МЕ/кг. Противовирусную активность препаратов оценивали по показателю гибели и средней продолжительности жизни мышей. Показано, что трёхкратное интраназальное введение инфицированным мышам по лечебно-профилактической схеме композиции в дозе 2,5 мг/кг (по дсРНК) и 2500 МЕ (по ИФН-альфа-2b) приводило к повышению числа выживших животных и средней продолжительности их жизни, по уровню сравнимых с эффектом препарата Тамифлю. Препараты сравнения дсРНК и ИФН-альфа-2b при интраназальном введении в тех же дозах в условиях данной вирусной модели противовирусного действия не оказывали. Полученные данные подтверждают перспективность дальнейшей разработки новых лекарственных форм дсРНК и интерферонов для интраназального применения в качестве средств профилактики и лечения гриппа.

Ключевые слова: индуктор интерферона; двуспиральная рибонуклеиновая кислота; дсРНК; ИФН-альфа-2b; композиция для интраназального введения; противовирусная активность; вирус гриппа; мыши

Для цитирования: Гамалей С. Г., Скарнович М. О., Макаревич Е. В., Мазурков О. Ю., Шишкина Л. Н., Иванова О. С., Левagina Г. М., Даниленко Е. Д. Противовирусная активность композиционного препарата дрожжевой двуспиральной РНК и интерферона альфа на модели экспериментальной гриппозной инфекции мышей. *Антибиотики и химиотер.* 2023; 68: 7–8: 27–33. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-27-33>.

Abstract

High variability of influenza viruses requires the development of agents for nonspecific resistance stimulation, along with the development of new drugs for prevention and treatment. Among the antiviral drugs, interferons and their inducers are known to exhibit a universally wide spectrum of action. The Institute of Medical Biotechnology, a branch of SRC VB «Vector»,

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Новосибирская область, Россия, 630559.
E-mail: gamaley_sg@vector.nsc.ru

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, 630559 Russia. E-mail: gamaley_sg@vector.nsc.ru

Rospotrebnadzor, has developed the technology and obtained pharmaceutical compositions containing an interferon inducer — double stranded ribonucleic acid (dsRNA) from the killer strain of *Saccharomyces cerevisiae* yeast and recombinant human interferon-alpha-2b (IFN- alpha-2b). The specific antiviral activity of the preparations and synergistic effect of the components within the compositions were shown in L-68 and L-929 cell cultures. The aim of this work was to study antiviral activity of intranasal forms of the pharmaceutical compositions containing yeast dsRNA and recombinant human interferon-alpha-2b in a model of lethal influenza infection in mice. The outbred ICR/CD1 mice were intranasally infected with influenza A/Aichi/2/68 (H3N2) virus. The study compositions were intranasally administered 3 hours before infection with influenza virus, as well as 1 and 3 days post infection. The doses of active components in the administered compositions were as follows: for dsRNA — 2.5 mg/kg, for IFN-alpha-2b — 500 IU/kg, 2500 IU/kg, or 5000 IU/kg. The antiviral activity of the drugs was assessed based on the mortality rate and the average life expectancy of mice. It was shown that a three-time intranasal administration of the composition of dsRNA (2.5 mg/kg) and IFN-alpha-2b (2500 IU) into the infected mice according to therapeutic-prophylactic regimen led to an increase in the rates of survival and average life expectancy of animals, which were comparable to the effect of Tamiflu. The comparison preparations — dsRNA and IFN-alpha-2b — administered intranasally at the same doses and regimen exerted no antiviral effect in this mouse model of viral infection. The data obtained confirm the prospects for further development of new dosage forms of dsRNA and interferons for intranasal application as agents for prevention and treatment of influenza.

Keywords: *interferon inducer; double stranded ribonucleic acid; dsRNA; IFN-alpha-2b; composition for intranasal administration; antiviral activity; influenza virus; mice*

For citation: 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 Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 7–8: 27–33. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-27-33>.

Введение

В настоящее время не вызывает сомнений тот факт, что наиболее эффективным способом предотвращения вирусного заражения является вакцинация. Приобретённый иммунитет против сезонного гриппа значительно снижает заболеваемость и смертность во всех возрастных группах. Однако известно, что особенности генома и механизмов репликации вируса гриппа способствуют накоплению мутаций и, как следствие, возникновению штаммов, для которых наработанные в ходе вакцинации антитела могут быть недостаточно специфичными. Кроме того, нельзя не упомянуть о существовании в популяции лиц с иммунодефицитами разной природы, неспособных к формированию эффективного иммунного ответа на вакцину. Поэтому одним из главных способов лечения и борьбы с распространением гриппозной инфекции по-прежнему является использование химиотерапевтических средств специфического и неспецифического действия.

Для терапии гриппа в качестве основных противогриппозных лекарственных средств используются препараты адамантанового ряда (ремантадин, амантадин) — блокаторы ионных каналов, а также ингибиторы нейраминидазы вируса гриппа А, такие как занамивир (Реленза®) [1], осельтамивир (Тамифлю®, Номидес) [2], перамивир [2] и ланинамивир (Авиган®) [2]. Несомненное преимущество специфических противогриппозных средств состоит в направленности и, как следствие, высокой эффективности противовирусного действия. Недостатками является ограниченность спектра вирусных штаммов, против которых данные средства эффективны, и

формирование вирусной резистентности, особенно быстрое в условиях длительного терапевтического воздействия препаратами у лиц с ослабленной иммунной системой [2]. В связи с этим, разработка и использование в лечебной практике средств, повышающих неспецифическую резистентность организма, в частности, интерферонов и их индукторов, остаются актуальными.

Как известно, первым барьером, противостоящим развитию инфекционного процесса при гриппе, является местная защита слизистых оболочек респираторного тракта. Это объясняет интерес к разработке противовирусных препаратов для интраназального введения [3]. Среди препаратов интерферонов (ИФН) следует отметить такие препараты, как Виферон (мазь), Гриппферон (капли), Альфарон (лиофилизат для приготовления капель), Инфагель (гель), представляющие собой лекарственные формы рекомбинантного человеческого интерферона альфа-2b (ИФН-альфа-2b) для наружного (интраназального) применения. Локальное введение экзогенного ИФН-альфа-2b обеспечивает ускоренную мобилизацию факторов противовирусной защиты слизистых в месте введения, включая активацию внутриклеточных противовирусных механизмов и комплекса клеточных иммунных реакций [4, 5]. Другим представляющим интерес классом неспецифических противовирусных средств являются индукторы интерферона, среди которых можно выделить двуспиральные рибонуклеиновые кислоты (дсРНК). На основе природных дсРНК в настоящее время созданы препараты для экстренной профилактики и лечения инфекционных заболеваний — Ридостин (препарат на основе дсРНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*) и Ларифан (дсРНК из фага φ6). Двуспи-

ральные РНК благодаря сходству структуры со структурой вирусных РНК или их интермедиатов запускают каскад противовирусных реакций, одной из которых является синтез эндогенных интерферонов [6]. В настоящее время разработана интраназальная форма препарата Ридостин, обладающая противовирусной активностью в отношении вируса гриппа А (штаммы A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Bishkek/01/2009 (H1N1)pdm09) [7, 8].

В источниках литературы имеются данные о синергидном эффекте ИФН и их индукторов при их сочетанном введении [9, 10]. Как было показано нами ранее в экспериментах на модели летальной гриппозной инфекции у мышей, наличие ИФН-альфа-2b в составе композиции, содержащей дсРНК из фага $\phi 6$, способствовало усилению противовирусных свойств дсРНК [11].

Цель исследования — изучение противовирусной активности интраназальной формы композиционного препарата, содержащего индуктор интерферона дрожжевую дсРНК и рекомбинантный интерферон альфа-2b человека, на модели летальной гриппозной инфекции мышей.

Материал и методы

Для получения композиционных препаратов были использованы: субстанция натриевой соли двуспиральной рибонуклеиновой кислоты (Na-соль дсРНК), содержащая 21,6% двуспиральной РНК, по показателям качества соответствующая ФСП 42-0769-08 (производства ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора); интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, субстанция (АО «Вектор-Медика»); поли-этиленгликоль 400 («Рапгеас», Германия); этилендиаминтетрауксусная кислота динатриевая соль («AppliChem», Германия); диметилсульфоксид (ООО «Йодные Технологии и Маркетинг», Россия); натрия хлорид — 0,9%, ГОСТ 4233-77 (Россия).

Интраназальные формы композиций, содержащих дсРНК и ИФН, получали путём смешения субстанции Na-соль дсРНК с ИФН-альфа-2b и вспомогательными компонентами в ламинарной системе КОЧ «Ламинар «С» с соблюдением правил асептики. Лиофилизацию растворов образцов проводили в камере лиофильной сушки «FreeZone» в автоматическом режиме с опцией пневматической укупорки. Раствор разливали во флаконы по 1 мл, замораживали при температуре минус 72°C и высушивали в течение 16 часов при температуре 22±2°C.

В экспериментах использовали композиционные препараты, содержащие субстанцию дсРНК в количестве 750 мкг и ИФН-альфа-2b в трёх концентрациях: 150 МЕ, 750 МЕ и 1500 МЕ на флакон (Композиция 1, 2 или 3, соответственно). Состав вспомогательных веществ в композициях: этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) — 0,005 мг, диметилсульфоксид — 0,005 мг, полиэтиленгликоль (ПЭГ-400) — 0,005 мг, натрия хлорид — 0,002 мг.

В качестве препаратов сравнения были использованы:

- субстанция дсРНК, представляющая смесь одноцепочечных и двуспиральных РНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с содержанием дсРНК 21,6% производства ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (г. Бердск Новосибирской области);

- интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, субстанция (АО «Вектор-Медика», р. п. Кольцово Новосибирской области);

- Тамифлю (Хоффманн — Ля Рош Лтд., Швейцария).

Противовирусную активность композиционных препаратов исследовали в экспериментах на 90 мышях ICR (CD-1) аутбредной популяции. Возраст животных составлял 5 нед., масса тела 14–15 г. Мыши были получены из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово Новосибирской обл.).

Содержание мышей и эксперименты на них осуществляли в соответствии с российскими и международными требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [12].

Для воспроизведения вирусной модели использовали адаптированный к мышам вирус гриппа (ВГ) A/Aichi/2/68 (H3N2), полученный из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Мышей, анестезированных изофлураном с помощью установки для газовой анестезии SonoFlo (Kent Scientific Corporation, США), интраназально заражали ВГ в дозе 10 ЛД₅₀ в объёме 40 мкл суммарно в обе ноздри.

Для оценки противовирусной активности препаратов животных распределяли на 9 экспериментальных групп случайным образом, по 10 особей в группе.

Животным первой, второй и третьей опытных групп интраназально вводили Композицию 1, Композицию 2 или Композицию 3, соответственно. Доза дсРНК в композициях была одинаковой и составляла 2,5 мг/кг (50 мкг на мышь); доза ИФН-альфа-2b при введении в составе Композиции 1 — 500 МЕ/кг, Композиции 2 — 2500 МЕ/кг, Композиции 3 — 5000 МЕ/кг (10 МЕ; 50 МЕ или 100 МЕ на мышь, соответственно). Животные четвёртой группы (группы сравнения) получили интраназально раствор субстанции дсРНК в дозе 2,5 мг/кг. ИФН-альфа-2b вводили мышам пятой, шестой и седьмой групп сравнения в дозах 500 МЕ/кг, 2500 МЕ/кг или 5000 МЕ/кг, соответственно. Композиционные препараты и препараты сравнения вводили интраназально за 3 ч до заражения ВГ, через 1 и 3 сут после заражения в объёме 25 мкл/мышь суммарно.

Положительным контролем являлся противовирусный препарат Тамифлю (Ля Рош Лтд., Швейцария), который вводили мышам восьмой группы перорально в дозе 15 мг/кг через 1 ч после заражения ВГ и далее дважды в сутки в течение 4 сут после заражения. Животные, инфицированные ВГ и не получавшие препаратов, составляли группу отрицательного контроля (группа 9).

Противовирусную активность препаратов оценивали по показателю гибели животных в течение 16 сут наблюдения после заражения ВГ, рассчитывали коэффициент защиты (КЗ) и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) мышей. За максимальное значение продолжительности жизни для выживших животных принимали 16 сут после заражения ВГ, то есть 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». Для проверки статистических гипотез о виде распределения показателей применяли критерий Колмогорова–Смирнова при вероятности ошибки $p > 0,10$. СПЖ представлены в виде $M \pm Sm$, где M — среднее арифметическое значение и Sm — стандартное отклонение. 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 учётом поправки Йетса для малых выборок. Различия показателей выживаемости животных оценивали с помощью кривых Каплана–Мейера по логранговому критерию в компьютерной программе анализа данных «Statistica 12». Отличия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Введение препарата Тамифлю в течение 5 сут после заражения летальной дозой вируса гриппа

A/Aichi/2/68 (H3N2) защищало от гибели 70% инфицированных мышей (таблица). Средняя продолжительность жизни мышей этой группы значительно превышала показатели контрольных животных (более, чем на 7 дней). Эти данные подтверждают адекватность использованной вирусной модели в экспериментах на мышах и её чувствительность к противовирусным препаратам.

Введение мышам Композиции 2 по лечебно-профилактической схеме обеспечивало защиту 50% инфицированных животных при увеличении средней продолжительности жизни в 2 раза по сравнению с контрольной группой (см. таблицу). Показатели выживаемости мышей, которым вво-

дили Композицию 2, статистически не отличались от показателей животных группы сравнения «Тамифлю».

Число выживших животных, которым вводили Композицию 1, значимо не отличалось от показателей мышей с введением Тамифлю, однако средняя продолжительность жизни мышей этой группы была в 1,58 раза меньше, чем в группе «Тамифлю» (различия статистически значимы, $p \leq 0,05$) (см. таблицу).

В группах мышей, которым вводили Композицию 3 или ИФН-альфа-2b в дозах 2500 МЕ/кг или 5000 МЕ/кг, к концу срока наблюдения выжило всего по 1 животному из 10.

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

№ группы	Препарат	Доза/схема введения препарата	Число (доля) выживших животных	КЗ (%)	СПЖ (сут), $M \pm Sm$
1	Композиция 1 (n=10)	дсРНК — 2,5 мг/кг, ИФН-альфа-2b — 500 МЕ/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	3 (30 %)	30	8,5±5,23 [#]
2	Композиция 2 (n=10)	дсРНК — 2,5 мг/кг, ИФН-альфа-2b — 2500 МЕ/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	5* (50 %)	50	11,6±4,74 ^{**}
3	Композиция 3 (n=10)	дсРНК — 2,5 мг/кг, ИФН-альфа-2b — 5000 МЕ/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	1 [#] (10 %)	10	7,1±3,41 [#]
4	Субстанция дсРНК	2,5 мг/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	0 [#] (0 %)	0	6,0±0,67 [#]
5	ИФН-альфа-2b, 10 МЕ/мышь (n=10)	500 МЕ/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	0 [#] (0 %)	0	6,7±1,06 [#]
6	ИФН-альфа-2b, 50 МЕ/мышь (n=10)	2500 МЕ/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	1 [#] (10 %)	10	6,5±3,44 [#]
7	ИФН-альфа-2b, 100 МЕ/мышь (n=10)	5000 МЕ/кг и/н, за 3 ч д/з; через 1 и 3 сут п/з	1 [#] (10 %)	10	6,6±3,37 [#]
8	Тамифлю (n=10)	15 мг/кг 2 раза в сутки, п/о через 1 ч п/з ВГ и далее в течение 4-х сут п/з	7* (70 %)	70	13,4±4,20 ^{**}
9	Контроль ВГ (n=10)	н/в	0 (0 %)	н/о	5,7±1,34

Примечание. n — число животных в каждой группе; и/н — интраназально; п/о — перорально; д/з — до заражения; п/з — после заражения; н/в — препараты не вводили; н/о — показатель не определяют; КЗ — коэффициент защиты (рассчитывали по формуле: КЗ = % гибели в контроле — % гибели в опыте); СПЖ — средняя продолжительность жизни (за максимальный срок жизни выживших животных принимали 16 сут, эмпирически установленное, гарантированное время прекращения гибели инфицированных ВГ мышей); * — отличие от контроля по критерию χ^2 при $p \leq 0,05$; # — отличие от Тамифлю по критерию χ^2 при $p \leq 0,05$; ** — отличие от контроля по U-критерию Манна-Уитни при $p \leq 0,05$; ## — отличие от Тамифлю по U-критерию Манна-Уитни при $p \leq 0,05$; M — среднее арифметическое значение; Sm — стандартное отклонение.

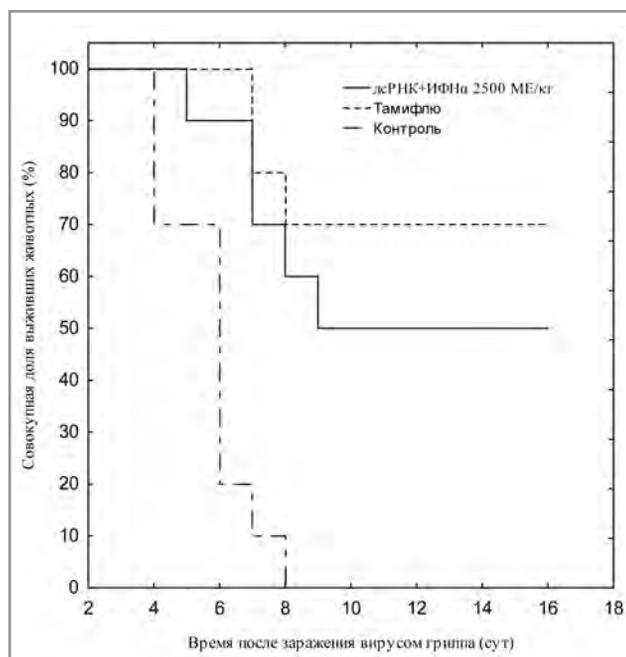
Note. n — number of animals in each group; и/н — intranasally; п/о — per os; д/з — before infection; п/з — post infection; н/в — drugs non-administered; н/о — indicator non-determined; КЗ (PC) — protection coefficient (calculated according to the formula: PC = % death in the control — % death in the experiment); СПЖ — average life expectancy (a maximum life span of surviving animals was taken as a 16-day period, empirically established, guaranteed time of when the mortality in mice infected with influenza virus has stopped in mice infected with influenza virus); * — difference from the control group according to the χ^2 criterion, $P \leq 0.05$; # — difference from Tamiflu according to the χ^2 criterion, $P \leq 0.05$; ** — difference from the control according to the Mann-Whitney U-test, $P \leq 0.05$; ## — difference from Tamiflu according to the Mann-Whitney U-test, $P \leq 0.05$; M — arithmetic mean; Sm — standard deviation.

Введение субстанции дсРНК в дозе 2,5 мг/кг или ИФН-альфа-2b в дозе 500 МЕ/кг не обеспечило защиты инфицированных мышей: в этих группах, как и в контроле, была отмечена 100% гибель животных (см. таблицу).

Анализ графиков выживаемости, построенных по методу Каплана–Мейера, представленных на рисунке, выявляет значимые отличия между контрольной группой мышей, инфицированных штаммом ВГ A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 10 ЛД₅₀, и группами инфицированных мышей, получавших Тамифлю ($p=0,00039$) и Композицию 2 ($p=0,00326$) (рисунок). При этом отличий по выживаемости инфицированных ВГ мышей при введении Тамифлю и Композиции 2 не обнаружено ($p=0,36430$). Следует отметить, что отличий в выживаемости по логранговому критерию инфицированных ВГ мышей при введении Композиций 1 и 3, а также препаратов сравнения дсРНК (субстанция) и ИФН-альфа-2b в дозах 500, 2500 и 5000 МЕ/кг (на графиках не представлены) от контрольной группы инфицированных ВГ мышей не обнаружено ($p>0,05$).

Таким образом, в результате экспериментального изучения на мышах показано, что Композиция 2, содержащая ИФН-альфа-2b и индуктор интерферона дсРНК, при трёхкратном интраназальном применении в дозе (2,5 мг дсРНК и 2500 МЕ ИФН-альфа-2b)/кг проявляет противовирусную активность в отношении ВГ A/Aichi/2/68 (H3N2), чего не наблюдается после введения компонентов композиции.

Полученные данные относительно усиления противовирусного ответа при совместном использовании интерферона и индуктора интерферона согласуются с результатами других исследователей и собственными экспериментальными данными. Так, авторы статьи [9] в экспериментах на первичных макрофагах, выделенных из брюшной полости мышей, чувствительных к флавивирусам человека (штамм WN), а также трёх линиях мышей с резистентностью к флавивирусам показали, что примирование макрофагов ИФН-альфа/бета либо синтетической двухцепочечной РНК polyI:polyC приводило к преходящему снижению репликации флавивируса в макрофагах восприимчивых мышей, в отличие от устойчивых. При этом предварительная обработка клеток ИФН-альфа/бета в сочетании с polyI:polyC обеспечивала выраженный противовирусный ответ, который полностью предотвращал репликацию флавивируса в макрофагах мышей данного типа. Кроме того, показано, что для развития эффективного противовирусного ответа против вируса Западного Нила макрофагов, выделенных из крови здоровых доноров-людей, в качестве кофактора для реализации эффекта ИФН необходима дсРНК. Эти результаты свидетельствуют о том, что ис-



Графики выживаемости животных, построенные по методу Каплана–Мейера, при заражении штаммом ВГ A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 10 ЛД₅₀ в контрольной группе и при введении препаратов дсРНК+ИФН-альфа-2b (2500 МЕ/кг) и Тамифлю.

Примечание. «+» — окончание срока наблюдения, т. е. эмпирически установленное, гарантированное время прекращения гибели мышей, инфицированных ВГ.

Kaplan-Meier animal survival graphs, post infection of mice with influenza A/Aichi/2/68 (H3N2) virus at a dose of 10 LD₅₀ in the control group and in the groups receiving dsRNA + IFN-alpha-2b (2500 IU/kg) and Tamiflu.

Note. «+» — end of the observation period, i. e. empirically established, guaranteed time of death cessation in mice infected with influenza virus.

пользование ИФН-альфа/бета в сочетании с дсРНК способствует усилению противовирусного эффекта против флавивирусов, что приводит к полной эрадикации вируса из клеток [9].

Аналогичные данные были получены нами ранее в экспериментах по изучению противовирусных свойств композиций природных дсРНК и рекомбинантных ИФН. Было показано, что композиция дсРНК фага $\phi 6$ и рекомбинантного ИФН-альфа-2b человека в дозе 2,5 мг/кг (по дсРНК) и 500 МЕ/кг (по ИФН), в отличие от компонентов композиции, обладала способностью защищать инфицированных мышей от летальной дозы вируса гриппа A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) как при внутрибрюшинном, так и интраназальном применении по лечебно-профилактической схеме [11].

Заключение

На модели гриппозной инфекции показано, что интраназальная форма композиционного

препарата дсРНК и ИФН-альфа-2b в дозе 2,5 мг/кг по дсРНК и 2500 МЕ/кг по ИФН-альфа-2b при лечебно-профилактической схеме применения повышает выживаемость и среднюю продолжительность жизни мышей, инфицированных летальной дозой вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2). Защитный эффект препарата был сравним с эффектом препарата Тамифлю. Снижение дозы ИФН-альфа-2b в составе композиции ослабляло противовирусные свойства препарата, повышение дозы ИФН-альфа-2b нивелировало эффект.

Полученные данные подтверждают перспективность и обоснованность продолжения работ по завершению разработки новой лекарственной формы препарата для интраназального применения, содержащего в своём составе дсРНК и ИФН, в качестве средства профилактики и лечения гриппа и других острых респираторных вирусных заболеваний.

Литература/References

1. Дерыбин П.Г., Галегов Г.А., Ботиков А.Г., Бурцева В.И., Мишин Д.В., Щелканов М.Ю. Действие субстанции занамивир на инфекцию, вызванную высокопатогенным вирусом гриппа птиц A/H5N1 в культурах клеток. Вопросы вирусологии. 2011; 56 (1): 21–24. [Deryabin P.G., Galegov G.A., Botikov A.G., Burtseva V.I., Mishin D.V., Shchelkanov M.Yu. Effect of zanamivir substance on infection induced by highly pathogenic avian influenza A/H5N1 in cell cultures. *Voprosy Virusologii*. 2011; 56 (1): 21–24 (in Russian)]
2. Бурцева Е.И., Бреслав Н.В., Кириллова Е.С., Колобухина Л.В., Прилипов А.Г., Мальшев Н.А., и др. Ингибиторы нейраминидазы вирусов гриппа: эффективность в постпандемический период. Эффективная фармакотерапия. 2017; (3): 28–32. <https://nomides.ru/files/ingibitory-nejraminidazy-virusov-grippa.-jeffektivnost-v-postpandemicheskij-period.pdf> [Burtseva Ye.I., Breslav N.V., Kirillova Ye.S., Kolobukhina L.V., Prilipov A.G., Malyshev N.A. et al. Influenza virus neuraminidase inhibitors: efficacy during post-pandemic period. *Effektivnaya Farmakoterapiya*. 2017; (3): 28–32. <https://nomides.ru/files/ingibitory-nejraminidazy-virusov-grippa.-jeffektivnost-v-postpandemicheskij-period.pdf> (in Russian)]
3. Рязанцев С.В., Хмельницкая Н.М., Тырнова Е.В. Роль слизистой оболочки в защите ЛОР органов от потенциально патогенных для организма антигенных факторов. Вестник отоларингологии. 2000; (3): 60–63. [Ryazantsev S.V., Khmel'nitskaya N.M., Tyrnova Ye.V. Rol' slizistoy obolochki v zashchite LOR organov ot potentsial'no patogennykh dlya organizma antigennykh faktorov. *Vestnik Otolaringologii*. 2000; (3): 60–63. (in Russian)]
4. Oslund K.L., Zhou X., Lee B., Zhu L., Duong T., Shih R. et al. Synergistic up-regulation of CXCL10 by virus and IFN- γ in human airway epithelial cells. *PLoS One*. 2014; 9 (7): e100978. doi: 10.1371/journal.pone.0100978.
5. Осидак Л.В., Афанасьева О.И., Головачева Е.Г., Гончар В.В., Писарева М.М., Дондурей Е.А., и др. Рекомбинантный интерферон α -2b (Гриппферон) в терапии и профилактике ОРВИ. Фарматека. 2020; 27 (1): 80–91. doi: <https://doi.org/10.18565/pharmateca.2020.1.80-91>. [Osidak L.V., Afanas'yeva O.I., Golovacheva E.G., Gonchar V.V., Pisareva M.M., Dondurey E.A. et al. Recombinant interferon α -2b (Grippferon) in the treatment and prevention of acute respiratory viral infections. *Pharmateka*; 27 (1): 80–91. doi: <https://doi.org/10.18565/pharmateca.2020.1.80-91>. (in Russian)]
6. Даниленко Е.Д., Белкина А.О., Сысоева Г.М. Создание лекарственных препаратов на основе высокополимерных дуспиральных РНК для противовирусной и противопухоловой терапии. Биомедицинская химия. 2019; 65 (4): 277–293. doi: <https://doi.org/10.18097/PBMC20196504277>. [Danilenko E.D., Belkina A.O., Sysoeva G.M. Development of drugs on the basis of high-polymeric double-stranded RNA for antiviral and antitumor therapy. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2019; 65 (4): 277–293. doi: <https://doi.org/10.18097/PBMC20196504277>. (in Russian)]
7. Иванова О.С., Левагина Г.М., Скарнович М.О., Скарнович М.А., Шишкина Л.Н., Гамалей С.Г., Даниленко Е.Д. Получение и характеристика

Дополнительная информация

Финансирование. Исследование проведено в рамках работ по выполнению государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, тема ГЗ-38/21.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Участие авторов. Гамалей С. Г. — интерпретация результатов, написание статьи; Скарнович М. О., Макаревич Е. В., Мазурков О. Ю. — оценка противовирусных свойств препаратов; Шишкина Л. Н. — анализ и интерпретация данных о противовирусной активности препаратов; Иванова О. С. — получение и характеристика интраназальной формы препаратов дсРНК и ИФН-альфа-2b; Левагина Г. М. — выбор рецептуры интраназальной формы препарата дсРНК и ИФН-альфа-2b; Даниленко Е. Д. — постановка задачи, окончательное редактирование статьи.

- препарата дуспиральной РНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для интраназального применения. *Биофармацевтический журнал*. 2019; 11 (4): 29–33. [Ivanova O.S., Levagina G.M., Skarnovich M.O., Skarnovich M.A., Shishkina L.N., Gamaley S.G., Danilenko E.D. Obtaining and characterization of double stranded RNA preparation from *Saccharomyces cerevisiae* yeast for intranasal application. *Biofarmatsevticheskii Zhurnal*. 2019; 11 (4): 29–33. (in Russian)]
8. Гамалей С. Г., Шимица Г. Г., Цыпленкова Е. С., Симакова О. В., Скарнович М. О., Скарнович М. А. и др. Изучение противовирусной активности и фармакологической безопасности интраназальной формы дуспиральной рибонуклеиновой кислоты. *Антибиотики и химиотерапия*. 2022; 67 (9–10): 42–48. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-42-48>. [Gamaley S.G., Shimina G.G., Tsyplenkova E.S., Simakova O.V., Skarnovich M.O., Skarnovich M.A. et al. Study on antiviral activity and pharmacological safety of double-stranded ribonucleic acid for intranasal administration. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67 (9–10): 42–48. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-42-48>. (in Russian)]
 9. Pantelic L., Sivakumaran H., Urosecvic 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): 1753–64. doi: 10.1128/JVI.79.3.1753-1764.2005.
 10. Marcus P.L., Sekellick M.J. Combined sequential treatment with interferon and dsRNA abrogates virus resistance to interferon action. *J Interferon Cytokine Res*. 2001; 21 (6): 423–9. doi: 10.1089/107999001750277907.
 11. Сысоева Г.М., Батенева А.В., Гамалей С.Г., Скарнович М.О., Скарнович М.А., Шишкина Л.Н. и др. Иммуномодулирующие и противовирусные свойства композиционного препарата дуспиральной РНК и интерферона альфа. Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения и защиты прав потребителей: Сб. статей, посвящённых 95-летию службы. Новосибирск: ООО «Альфа-Порте». 2017; 201–207. [Sysoyeva G.M., Bateneva A.V., Gamaley S.G., Skarnovich M.O., Skarnovich M.A., Shishkina L.N. et al. Immunomodulatory and antiviral properties of a composition of double-stranded RNA and interferon α . In: *Aktual'nyye voprosy obespecheniya sanitarno-epidemiologicheskogo potrebleniya naseleniya i zashchity prav potrebiteley: Sbornik statey, posvyashchennykh 95-letiyu sluzhby*. Novosibirsk: ООО «Al'fa-Porte». 2017; 201–207. (in Russian)]
 12. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Пер. с англ. RusLasa. С-ПБ; 2012. Доступно по: https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf. Ссылка активна на 31.05.2023. [Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Translated by RusLasa. S-PB; 2012.] Dostupno po: https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf. Ssylka aktivna na 31.05.2023.

Информация об авторах

Гамалей Светлана Георгиевна — зав. отделом биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Российская Федерация. ORCID-ID: 0000-0002-7441-333X. ResearcherID: B-7418-2014. eLIBRARY SPIN-код: 6593-3420. Scopus Author ID: 6504003751

Скарнович Максим Олегович — старший научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация. eLIBRARY SPIN-код: 8405-5175. Scopus Author ID: 57189059427

Макаревич Елена Викторовна — научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация. eLIBRARY SPIN-код: 7291-6594. Scopus Author ID: 56624524300

Мазурков Олег Юрьевич — к. б. н., научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация. eLIBRARY SPIN-код: 3512-3621. Scopus Author ID: 57189054216

Шшишкина Лариса Николаевна — д. б. н., зав. отделом профилактики и лечения особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация. ORCID ID: 0000-0002-8264-0217. ResearcherID: B-2263-2014. eLIBRARY SPIN-код: 7165-4367. Scopus Author ID: 35316454500

Иванова Ольга Сергеевна — к. б. н., научный сотрудник отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Российская Федерация. eLIBRARY SPIN-код: 4165-6310

Левагина Галина Михайловна — к. б. н., зав. отделом разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Российская Федерация. ORCID ID: 0000-0002-0394-9698. ResearcherID: C-7590-2014. eLIBRARY SPIN-код: 6837-4940. Scopus Author ID: 6506245503

Даниленко Елена Дмитриевна — к. б. н., директор Института медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Российская Федерация. ORCID ID: 0000-0001-5026-1602. ResearcherID: A-7083-2014. eLIBRARY SPIN-код: 1388-4127. Scopus Author ID: 7004245682

About the authors

Svetlana G. Gamaley — Head of the Department of Biological Studies, SRC VB «Vector» of Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk region, Russia. ORCID-ID: 0000-0002-7441-333X. ResearcherID: B-7418-2014. eLIBRARY SPIN-код: 6593-3420. Scopus Author ID: 6504003751

Maxim O. Skarnovich — Senior researcher, Department of Extremely Hazardous Virus Infections Prevention and Treatment, SRC VB «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. eLIBRARY SPIN-код: 8405-5175. Scopus Author ID: 57189059427

Elena V. Makarevich — Researcher, Department of Extremely Hazardous Virus Infections Prevention and Treatment, SRC VB «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. eLIBRARY SPIN-код: 7291-6594. Scopus Author ID: 56624524300

Oleg Yu. Mazurkov — Ph. D. in Biology, Researcher, Department of Extremely Hazardous Virus Infections Prevention and Treatment, SRC VB «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. eLIBRARY SPIN-код: 3512-3621. Scopus Author ID: 57189054216

Larisa N. Shishkina — D. Sc. in Biology, Head of the Department of Extremely Hazardous Virus Infections Prevention and Treatment, SRC VB «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. ORCID ID: 0000-0002-8264-0217. ResearcherID: B-2263-2014. eLIBRARY SPIN-код: 7165-4367. Scopus Author ID: 35316454500

Olga S. Ivanova — Ph. D. in Biology, Researcher, Department of Technology Development and Pilot Production of Biologicals, SRC VB «Vector» of Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk region, Russia. ORCID ID: 0000-0002-4243-3600. eLIBRARY SPIN-код: 4165-6310. Scopus Author ID: 55893895600

Galina M. Levagina — Ph. D. in Biology, Head of the Department of Technology Development and Pilot Production of Biologicals, SRC VB «Vector» of Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk region, Russia. ORCID ID: 0000-0002-0394-9698. ResearcherID: C-7590-2014. eLIBRARY SPIN-код: 6837-4940. Scopus Author ID: 6506245503

Elena D. Danilenko — Ph. D. in Biology, Director of the Institute of Medical Biotechnology, SRC VB «Vector» of Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk region, Russia. ORCID ID: 0000-0001-5026-1602. ResearcherID: A-7083-2014. eLIBRARY SPIN-код: 1388-4127. Scopus Author ID: 7004245682