

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ СВЕРХМАЛЫХ ДОЗ АНТИТЕЛ К ГАММА-ИНТЕРФЕРОНУ

О. И. Эпштейн, Ю. Л. Дугина, М. В. Качанова, С. А. Тарасов, И. А. Хейфец, М. В. Белопольская

ООО «НПФ «Материя Медика Холдинг», Москва

Antiviral Activity of Antibodies to Interferon-Gamma in Ultra-Low Doses

O. I. Epstein, J. L. Dugina, M. V. Kachanova, S. A. Tarasov, I. A. Kheyfets, M. V. Belopolskaya

ООО «NPF «Materia Medica Holding», Moscow

В исследовании обобщены данные о возможности применения сверхмалых доз антител к интерферону-гамма для модуляции противовирусной активности человека. На основе сверхмалых доз антител к интерферону-гамма созданы лекарственные препараты анаферон и анаферон детский, зарекомендовавшие себя как высокоэффективные противовирусные средства. В ходе доклинических исследований выявлена противовирусная эффективность сверхмалых доз антител к интерферону-гамма в терапии гриппа (в том числе, птичьего гриппа) и герпеса, не уступающая классическим стандартным препаратам сравнения. Противовирусная активность данных препаратов подтверждена в клинических исследованиях.

Antiviral activity of antibodies to interferon-gamma in ultra-low doses was shown and investigated in the study. Anaferon and anaferon for children contain antibodies to interferon-gamma in ultra-low doses and possess antiviral activity. Preclinical studies demonstrated the efficacy of antibodies to interferon-gamma in ultra-low doses in the treatment of influenza (including avian influenza) herpes virus that is comparable to standard reference drugs. Antiviral activity of these drugs was confirmed in clinical studies.

Вирусные инфекционные заболевания — бесспорно ведущая причина заболеваемости во всем мире. К началу XXI века открыто более 500 патогенных для человека вирусов, как РНК-содержащих вирусов (ортомиксовирусы, парамиксовирусы, коронавирусы и пикорнавирусы), так и ДНК-содержащих вирусов (аденовирусы и герпесвирусы). Причем более половины патогенных для человека вирусов относятся к числу убиквитарных болезней. Вирусы, являющиеся причиной развития острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) относят к одним из самых доминирующих, которые на протяжении многих десятилетий по числу случаев превосходят все другие инфекционные болезни. По данным ВОЗ, ежегодно ОРВИ болеет каждый третий житель планеты. В последние десятилетия в России ежегодно регистрируется десятки миллионов случаев ОРВИ. Ведущая роль в структуре ОРВИ, бесспорно, принадлежит гриппу, так как только вирусы гриппа вызывают эпидемии и пандемии, поражая людей всех возрастов.

Кроме того, в настоящее время вирус птичьего гриппа становится все более вирулентным, о чем свидетельствует необычно большое количество погибшей домашней птицы. А это увеличивает риск возможности заболевания людей.

Для противовирусной терапии в настоящее время применяются: химиопрепараты (этиотропные сред-

ства), действующие непосредственно на вирусы; иммуномодуляторы, корригирующие нарушения иммунитета, возникающие вследствие вирусных инфекций; симптоматические средства, оказывающие воздействие на общие симптомы вирусных заболеваний (температура, болевой синдром, кашель); патогенетические средства, используемые при интоксикации, обезвоживании, аллергических реакциях

К настоящему времени одними из самых перспективных в отношении вирусных инфекций препаратами являются индукторы интерферона (ИФН), обладающие универсальным спектром антивирусной активности, хорошо сочетающиеся с иммуномодуляторами и химиотерапевтическими средствами и широко используемые для профилактики и лечения многих инфекционных заболеваний.

Индукторы ИФН являются препаратами с комбинированным эффектом: этиотропным, направленным непосредственно на вирус-возбудитель, и иммуномодулирующим, то есть корригирующим нарушения системы иммунитета. Индукторы интерферонов представляют собой весьма разнородное по составу семейство высоко- и низкомолекулярных природных и синтетических соединений, объединенных способностью повышать в организме образование собственного эндогенного интерферона. Они обычно индуцируют синтез всех иммунологических классов интерферонов: α , β , γ .

Важнейшим свойством индукторов ИФН является их универсальное противовирусное действие. Адекватная индукция эндогенных интерферонов в ответ на внедрение вируса в большинстве случаев обеспечивает легкое и/или abortивное течение вирусной инфекции. Кроме того, вирусные инфекции часто служат причиной или протекают на фоне вторичных иммунодефицитных состояний, поэтому желательным компонентом лечения и профилактики, например, ОРВИ, особенно у детей, являются средства иммунореабилитации (иммуномодуляторы).

Одним из индукторов интерферонов является препарат на основе антител к интерферону гамма человека в сверхмалых дозах — анаферон (лекарственная форма для детей — анаферон детский), производства ООО «НПФ «Материя Медика Холдинг» (Россия) [1]. Препараты на основе сверхмалых доз антител относятся к инновационным препаратам, открывающим новые возможности для эффективной и безопасной фармакотерапии заболеваний. Анаферон характеризуется высоким иммунофармакологическим потенциалом, широким спектром действия и удобной схемой применения. Иммуномодулирующее и противовирусное действие сверхмалых доз антител к интерферону — гамма основано на индукции эндогенных ИФН-гамма и ИФН α/β и влиянии на экспрессию функционально сопряженных с ними цитокинов, в том числе, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 [2].

В связи с этим представляется актуальным более детальное изучение противовирусной активности сверхмалых доз антител к интерферону — гамма (СМД АТ) при профилактическом, лечебном и лечебно-профилактическом пероральном введении в условиях экспериментального заражения животных РНК — (гриппозная инфекция на мышах и курах — первая и вторая серии исследований) и ДНК- (герпетическая инфекция на мышах и генитальный герпес у морских свинок — 3 и 4 серии исследований) содержащими вирусами.

В первой серии экспериментов в первой части разнополых белых беспородных мышей ($n=120$) аэрозольно заражали вирусом гриппа (штамм A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 50-100 АИД50 (аэрогенная инфицирующая доза). СМД АТ к ИФН-гамма вводили внутримышечно в дозе 0,2 мл/мышь 1 раз в сутки: при изучении профилактического действия — в течение 5 дней начиная за 5 суток до заражения, при изучении лечебного действия — в течение 5 дней, начиная с момента заражения. Мыши групп сравнения получали дистиллированную воду по таким же схемам. Профилактический и лечебный эффекты препарата оценивали по снижению титра вируса гриппа в легких инфицированных мышей на 2, 3, 4, 5-е сутки после заражения по сравнению с контрольной группой. Во второй части первой серии экспериментов мышьяк-самок Balb/c (массой 18—20 г) интраназально заражали ЛД90 вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2). СМД АТ к ИФН-гамма и дистиллированную воду вводили внутри-

желудочно 2 раза в день в дозе 0,2 мл/мышь, начиная за 5 дней до заражения вирусом гриппа и в течение 15 дней после заражения. В каждой группе было по 40 мышей. Эффективность тестируемых препаратов оценивали по выживаемости мышей.

Во второй серии для изучения эффективности СМД АТ к ИФН-гамма в условиях гриппозной инфекции кур породы Леггорн ($n=260$) массой 800—1000 г респираторно заражали ЛД75 и ЛД90 вируса птичьего гриппа A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 (H5N1). СМД АТ к ИФН-гамма и дистиллированную воду вводили внутримышечно в течение 2 сут до и 7 сут после заражения ЛД75 вируса гриппа в свободном доступе в поилках вместо воды. После заражения вирусом птичьего гриппа в дозе ЛД90 СМД АТ к ИФН-гамма и дистиллированную воду вводили в течение 7 суток до и (в свободном доступе в сочетании с интрагастральным введением 2 раза в сутки по 10 мл/курица) в течение 10 суток после заражения. Препарат сравнения тамифлю вводили внутримышечно в дозе 4 мг/кг интрагастрально дважды в день за 2 суток до заражения и в течение 5 суток после заражения кур вирусом гриппа в дозе ЛД90. Эффективность препаратов оценивали по числу погибших кур и на основании этих данных рассчитывали долю погибших животных и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) для каждой группы.

В третьей серии белых беспородных мышьяк обоого пола массой 18—20 г. ($n=60$) внутримышечно инфицировали вирусом герпеса II типа (HSV 2) в дозе 5 LD50. СМД АТ к ИФН-гамма вводили внутримышечно по 0,2 мл/мышь ежедневно в течение 5 сут. — профилактически до заражения. Эффект оценивали по концентрации вируса в мозге животных (2, 4, 6, 9, 12-е сутки после заражения) и по выживаемости мышьяк на 12 сутки после заражения.

И, наконец, в четвертой серии, выполненной на 60 морских свинок-самок породы «Агути гладкошерстная» (400—420 г), животных заражали вирусом генитального герпеса II типа (ВПГ-2, штамм ЕС). Препараты вводили свинкам интрагастрально в течение 15 дней, начиная с дня заражения: 1) контроль ($n=15$, дистиллированная вода 2 раза в день по 5 мл/кг); 2) ацикловир ($n=15$, по 50 мг/кг 2 раза в день); 3) СМД АТ к ИФН-гамма ($n=15$, по 5 мл/кг 2 раза в день). Еще одну группу составляли 15 свинок, которые получали СМД АТ к ИФН-гамма 20 дней (по 5 мл/кг 2 раза в день) начиная за 5 дней до инфицирования и в течение 15 дней после инфицирования. Оценивали местные симптомы генитального герпеса, общее состояние животных, титр вируса в вагинальных мазках.

Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами для биологических исследований [3, 4], а также с помощью пакета компьютерных программ анализа данных Microsoft Excel по t -критерию Стьюдента и «Statistica 6.0» с помощью критерия Фишера с поправкой Йетца [StatSoft Inc. 1984—2001].

Таблица 1. Влияние препарата СМД Ат к ИФН-гамма на выживаемость кур при заражении ВГП в дозе АД75

Группы животных	% выживших кур	
	8 сут	
СМД Ат к ИФН-гамма	55*	
Контрольная группа	25	

Примечание. * — отличия от контроля достоверны, $p=0,05$.

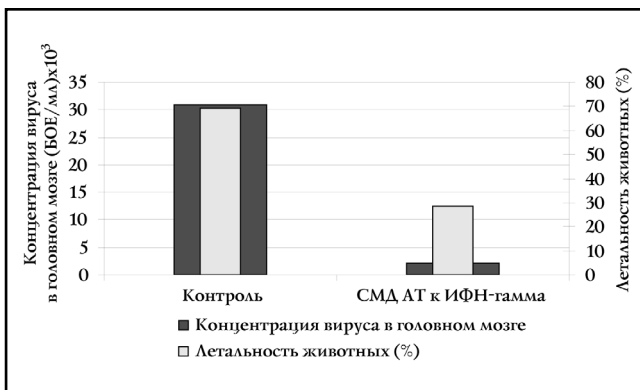


Рис. 1. Влияние введения СМД Ат к ИФН-гамма на летальность животных и суммарную концентрацию вируса простого герпеса в головном мозге мышей.

Результаты и их обсуждение

1. Изучение эффективности СМД Ат к ИФН-гамма в условиях гриппозной инфекции у мышей.

При инфицировании мышей вирусом гриппа в дозе АД50 профилактическое и лечебное пероральное введение СМД Ат к ИФН-гамма оказывало противовирусное действие в условиях аэрогенной вирусной инфекции у мышей. Титр вируса гриппа в легких животных снижался: при профилактическом введении СМД Ат к ИФН-гамма — в 3,7 раза (на 2-е сутки инфекции), при лечебном введении — в 7,6 раза (на 4-е сутки инфекции) по сравнению с контролем ($p<0,05$) [5].

При инфицировании мышей вирусом гриппа в дозе АД90 в контрольной группе к концу эксперимента выжило 15% мышей, в группе СМД Ат к ИФН-гамма — 42,5% мышей. Таким образом, СМД Ат к ИФН-гамма снижали смертность мышей в 3 раза по сравнению с контролем ($p<0,001$ и $p<0,01$, соответственно).

2. Изучение эффективности СМД Ат к ИФН-гамма в условиях гриппозной инфекции у кур.

В первой серии экспериментов при инфицировании кур АД75 вируса гриппа было показано, что количество и доля (%) выживших инфицированных вирусом гриппа птиц (ВГП) на фоне получения в свободном доступе препарата СМД Ат к ИФН-гамма были более чем в 2 раза выше, чем в контроле (табл. 1).

Во второй серии экспериментов было показано, что тамифлю замедлял гибель кур на одни сутки — если в контрольной группе и группе, получавшей препарат

Таблица 2. Доля (%) выживших и средняя продолжительность жизни (СПЖ) в исследованных группах кур при заражении вирусом гриппа птиц в дозе АД90

Показатели	СМД Ат к ИФН-гамма		
	Контрольная группа	СМД Ат к ИФН-гамма	Тамифлю
% выживших	8	10	10
СПЖ (сут)	4,37±0,2	4,69±0,2	4,9±0,1*

Примечание. * — отличия от контроля достоверны при $p=0,05$.

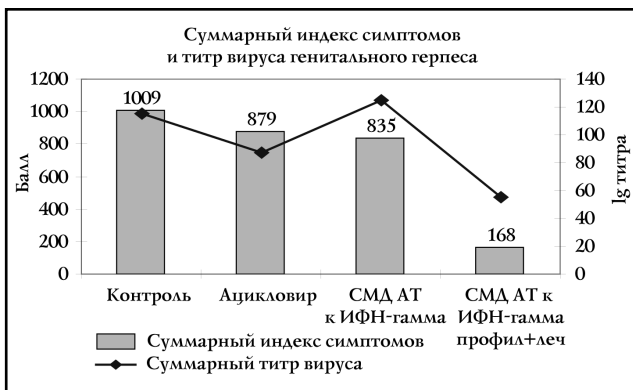


Рис. 2. Динамика титра вируса в вагинальных мазках и суммарный индекс симптомов у животных экспериментальных групп.

СМД Ат к ИФН-гамма, куры начинали гибнуть на 3 день после заражения их вирусом птичьего гриппа, то в группе тамифлю падеж кур начинался только на 4 день после заражения. Препарат СМД Ат к ИФН-гамма также несколько уменьшал падеж кур на 4 день исследования, количество выживших кур было выше, чем в группе, получавшей дистиллированную воду (табл. 2).

3. Изучение эффективности СМД Ат к ИФН-гамма в условиях герпесвирусной инфекции у мышей.

Профилактическое введение СМД Ат к ИФН-гамма при герпесвирусной инфекции достоверно подавляло накопление вируса герпеса в головном мозге животных, инфицированных летальной дозой (в 10 раз, $p<0,05$). Гибель животных в контрольной и опытной группах составила 69,2% и 28,6% соответственно (рис. 1), средняя продолжительность жизни павших животных увеличивалась на 3,3 суток ($p<0,05$) по сравнению с контрольной группой [6].

Таким образом, СМД Ат к ИФН-гамма подавляли накопление вируса герпеса в головном мозге животных, снижали гибель животных, увеличивали среднюю продолжительность жизни павших животных.

4. Изучение противовирусного действия СМД Ат к ИФН-гамма на модели генитального герпеса у морских свинок.

Показано, что лечебное, а еще в большей степени — лечебно-профилактическое применение СМД Ат к ИФН-гамма значительно уменьшало тяжесть и длительность общих и местных симптомов герпетической инфекции, а также значительно снижало вирусыведение (рис. 2). Не-

обходимо отметить, что СМД АТ к ИФН-гамма при лечебно-профилактическом введении был эффективнее, чем препарат сравнения ацикловир, снижая длительность клинических симптомов по сравнению с контролем на 2,8 дня, а также полностью подавляя поражение слизистой. Индекс лечебного действия СМД АТ к ИФН-гамма при лечебно-профилактическом введении был в 6,5 раз ($p < 0,05$) выше, чем ацикловира [7, 8].

Таким образом, в эксперименте показано, что максимальный терапевтический эффект в отношении генитального герпеса у морских свинок отмечался при использовании СМД АТ к ИФН-гамма при комбинированной (профилактической и лечебной) схеме введения. При этом отмечались минимальные клинические проявления герпесвирусной инфекции и минимальные титры вируса в мазках. По всем исследованным показателям СМД АТ к ИФН-гамма при комбинированном (профилактическом и лечебном) режиме введения превосходили препарат сравнения ацикловир.

Полученные экспериментальные данные на четырех биологических видах животных и при различных способах инфицирования позволяют сделать вывод, что СМД АТ к ИФН-гамма при курсовом профилактическом и/или лечебном пероральном введении, обладают выраженной противовирусной активностью как в отношении РНК-, так и ДНК-содержащих вирусов, снижая титр вирусов в пораженных тканях и повышая выживаемость животных.

Литература

1. Учайкин В. Ф., Эштейн О. И., Сергеева С. А. и др. Анаферон детский отечественный иммунокорректор с противовирусной активностью. // Пособие для врачей-педиатров, инфекционистов (ред. Главный детский инфекционист МЗ РФ академик РАН В. Ф. Учайкин). М., 2003. 31.
2. Мартюшев-Поклад А. В. Механизмы противовирусных и иммуномодулирующих эффектов сверхмалых доз антител к гамма-интерферону. // Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Томск, 2003. 119.
3. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Мед. лит., 1962. 161.
4. Лакан Г. Ф. Биометрия. Москва: «Высшая школа», 1980. 293.
5. Сергеев А. Н., Пьянков О. В., Шишкина А. Н. и др. Противовирусная активность сверхмалых доз антител к гамма-интерферону при пероральном введении: экспериментальное исследование гриппозной инфекции у мышей // Антибиотики и химиотерапия. 2004. Т. 49, №11. 7—11.
6. Суслопаров М. А., Махова Н. М., Носкова Н. В. и др. Изучение эффективности лечебно-профилактического действия сверхмалых доз антител к гамма-интерферону на экспериментальной мышшиной модели герпесвирусной инфекции // Антибиотики и химиотерапия. 2004. Т. 49, №10. 3—6.
7. Щербенко В. Э., Мезенцева М. В., Сургучева И. М. Экспериментальное изучение терапевтической эффективности анаферона на модели генитального герпеса у морских свинок в сравнении с ацикловиром // Тез. докл. XIV Российского Национального Конгресса «Человек и лекарство». М., 2007. 899.
8. Мезенцева М. В., Щербенко В. Э., Сургучева И. М. Экспериментальное изучение противовирусного действия анаферона детского на модели генитального герпеса у морских свинок в сравнении с ацикловиром // Тез. докл. XIV Российского Национального Конгресса «Человек и лекарство». М., 2007. 847.
9. Шерстобоев Е. Ю., Масная Н. В., Чуринов А. А. и др. Иммунотропные свойства гомеопатических доз антител к интерферону- γ человека // Бюлл. эксперим. биол. 2001. 37—39.
10. Эштейн О. И., Бельский Ю. П., Шерстобоев Е. Ю. и др. Механизмы иммунотропных свойств потенцированных антител к человеческому интерферону- γ // Бюлл. эксперим. биол. 2001. Приложение 3. 34—36.

Заключение

В ранее проведенных исследованиях было показано, что СМД АТ к ИФН-гамма стимулируют реакции клеточного и гуморального иммунитета, влияют на равновесие регуляторного звена иммунной системы (Тх1 и Тх2), повышают активность специфических (антителопродукция, клеточная цитотоксичность) и неспецифических (фагоцитоз, активность NK клеток, система интерферонов) эффекторных механизмов иммунитета [9, 10, 11, 12].

В клинических исследованиях применение СМД АТ к ИФН-гамма приводило к индукции ИФН-гамма, а также интерферонов α/β и функционально сопряженных с ними цитокинов; нормализации субпопуляционного состава лимфоцитов; увеличению иммунорегуляторного индекса [13]. Кроме того, в ходе клинических исследований было показано положительное влияние СМД анти-ИФН-гамма на местный иммунитет, выражавшееся в увеличении содержания sIgA в носовых смывах пациентов с ОРВИ.

Противовирусная активность препаратов СМД анти-ИФН- γ в отношении вируса гриппа и герпесвирусов (ветряная оспа, инфекционный мононуклеоз, генитальный герпес) была подтверждена и в клинических исследованиях [14, 15, 16, 17, 18, 19]. Как и в эксперименте, применение СМД АТ к ИФН-гамма приводило к сокращению сроков заболевания и снижению выраженности симптомов. Кроме того, в клинических исследованиях была доказана эффективность СМД анти-ИФН-гамма при ротавирусной, коронавирусной, калицивирусной, аденовирусной, респираторно-синцитиальной инфекциях [13, 20].

11. Шерстобоев Е. Ю., Масная Н. В., Чуринов А. А., Борсук О. С. и др. Сверхмалые дозы антидиотипических антител к интерферону-гамма человека: изучение иммунотропных свойств // Бюлл. эксперим. биол., 2002. 4. 76—78.
12. Шерстобоев Е. Ю., Масная И. В., Чуринов А. А. и др. Иммунотропные эффекты потенцированных антител к интерферону-гамма человека // Бюлл. эксперим. биол., 2002. 79—82.
13. Головачева Е. Г. Клинико-лабораторное обоснование применения иммунокорректирующей терапии при респираторно-синцитиальной вирусной инфекции у детей. Автореф. дисс. канд. мед. наук. С.-Пб., 2003. 130.
14. Журавлева А. А., Чуйкова К. И., Галактионова О. И. и др. Опыт применения анаферона детского в комплексной терапии инфекционного мононуклеоза у детей // Материалы II национального научно-медицинского конгресса «Здоровье человека». Ереван, 2003. 147—148.
15. Кудин М. В. Анаферон детский в лечении ветряной оспы у детей. // Тез. докл. Пятой международной конференции «Клинические исследования лекарственных средств». М., 2005. 101—103.
16. Кудин М. В., Майоров Р. Н., Сергеева С. А. Клинические особенности течения ветряной оспы на фоне лечения анафероном детским // Вопросы современной педиатрии. 2005. 4. 320 (Материалы X съезда педиатров России «Пути повышения эффективности медицинской помощи детям». М., 2005).
17. Хаманова Ю. Б., Тункина Е. Е., Шамакова Е. А. и др. Клинико-иммунологическая оценка анаферона детского при инфекционном мононуклеозе, энтеровирусном и менингококковом менингитах. // Тез. докл. XII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». М., 2005. 577.
18. Чуйкова К. И., Журавлева А. А., Шваб И. А. и др. Противовирусная терапия инфекционного мононуклеоза у детей // Тез. докл. четвертой международной конференции «Клинические исследования лекарственных средств». М., 2004. 269—270.
19. Martyshev-Poklad A. V., Kudin M. V., Dyldina N. V. et al. A novel therapeutic for treatment of varicella: peroral anti-interferon gamma antibodies // 4th World congress of the World society for pediatric infectious diseases — ESPID, Warsaw, Poland, 2005. Book of abstracts. 144.
20. Симованьян Э. Н., Колодяжная Н. М. Эффективность применения анаферона детского при лечении ротавирусной инфекции у детей. // Тез. докл. Третьего конгресса педиатров-инфекционистов России «Актуальные вопросы инфекционной патологии у детей. Инфекция и иммунитет». М., 2004. 208—209.