

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕРОРАЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗИРОВАННОГО ИНТЕРФЕРОНА λ -1

Дмитрий Николаевич КИНСИТ^{1,2}, Павел Геннадьевич МАДОНОВ^{1,2},
Галина Вадимовна КОЧНЕВА³, Татьяна Сергеевна ТАРТЫНОВА¹,
Герман Игоревич БАЙКАЛОВ¹

¹ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

² ООО «Саентифик Фьючер Менеджмент»
630559, Новосибирская обл, р.п. Кольцово, ул. Технопарковая, 10

³ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово

Несмотря на успехи в создании противовирусных препаратов прямого действия, сохраняется актуальность применения интерферонов в повседневной клинической практике. Парентеральное введение интерферонов сопровождается системными побочными эффектами и представляет значительные неудобства для пациентов. Для эффективного лечения гепатотропных вирусов перспективным является лекарственный препарат на основе интерферона λ -1, который должен обладать высокой энтеральной биодоступностью с целью достижения высоких концентраций в печени. **Цель работы** – изучение противовирусной активности перорального лекарственного средства на основе интерферона λ -1, иммобилизованного с помощью технологии электронно-лучевого синтеза на полиэтиленгликоле-1500. **Материал и методы.** Для изучения противовирусной активности в отношении вируса гепатита С использовались ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинг и иммуногистохимический метод. **Результаты и их обсуждение.** Исследуемое средство сохраняет противовирусную активность в отношении вируса гепатита С. Полученные с помощью разных методов результаты согласуются между собой. Пятидесятипроцентная ингибирующая доза лежит в диапазоне концентраций 0,008–0,08 нг/мл. **Заключение.** Иммобилизованный на полиэтиленгликоле с помощью технологии радиационного синтеза интерферон λ -1 можно рассматривать как прототип перорального лекарственного средства для лечения вирусных гепатитов, в частности гепатита С.

Ключевые слова: интерферон λ -1, гепатотропные вирусы, вирусный гепатит С, иммобилизация, электронно-лучевая иммобилизация, иммобилизованный интерферон λ -1.

Для терапии вирусных инфекций в современной медицине широко применяются рекомбинантные интерфероны (ИФН). Несмотря на успехи в создании противовирусных препаратов прямого действия, актуальность применения ИФН в повседневной клинической практике сохраняется. Для достижения терапевтически значимой концентрации лекарственные препараты на основе ИФН, в том числе пегилированных,

вводятся парентерально, что сопровождается системными побочными эффектами и представляет значительные неудобства для пациентов.

Перспективным представляется использование третьего типа интерферонов – λ -1. Рецепторы к ИФН λ -1 представлены преимущественно в печени, соответственно, при применении ИФН λ -1 может быть достигнут максимальный ингибирующий эффект в отношении гепатотропных виру-

Кинсит Д.Н. – к.м.н., доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины, e-mail: kinsht@scpb.ru

Мадонов П.Г. – д.м.н., проф., зав. кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины

Кочнева Г.В. – д.б.н., зав. лабораторией вирусных гепатитов

Тартынова Т.С. – клинический ординатор кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины

Байкалов Г.И. – студент 6-го курса лечебного факультета

сов. По этой же причине ИФН λ -1 будет иметь меньше побочных эффектов, свойственных наиболее распространенным лекарственным средствам на основе ИФН α . Таким образом, совершенно очевидно, что для эффективного лечения гепатотропных вирусов необходим лекарственный препарат на основе ИФН λ -1, который должен обладать высокой энтеральной биодоступностью с целью достижения высоких концентраций в печени.

В Российской Федерации разработана технология радиационного синтеза, обеспечивающая энтеральную биодоступность белковых молекул, иммобилизованных на инертном полимере – электронно-лучевая иммобилизация [1]. Эта технология реализуется с помощью воздействия ионизирующего облучения на раствор, содержащий исходный белок и полимер. Полимер защищает белок от агрессивной среды желудочно-кишечного тракта, повышает гидрофильность и, как следствие, обеспечивает высокую биодоступность белковых молекул. Однако фармакологические свойства иммобилизованных на полимере белков могут существенно изменяться, что диктует необходимость проведения полного комплекса доклинических исследований [5].

Ранее нами показано, что иммобилизованный на полиэтиленгликоле-1500 с помощью технологии электронно-лучевого синтеза ИФН α -2b сохраняет противовирусную активность и обладает высокой биодоступностью при пероральном приеме [1].

Целью данной работы является изучение противовирусной активности перорального лекарственного средства на основе иммобилизованного ИФН λ -1 (ЛС имм-ИФН λ -1). Для изучения противовирусной активности использован вирус гепатита С.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

ЛС имм-ИФН λ -1 был произведен в АО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии» (г. Новосибирск) из собственного штамма-производителя и иммобилизован на полиэтиленгликоле-1500 по электронно-лучевой технологии, описанной в патенте РФ 2409669 [3]. Для оценки антивирусной активности использовалась модель JFH1 клон/Huh-7.5 клетки, являющаяся в настоящее время общепризнанной системой для оценки антивирусной активности противовирусных средств, включая интерфероны. Линеаризованная ДНК плазмиды рJFH1 рUC была использована в качестве матрицы для транскрипции полноразмерной инфекционной РНК вируса гепатита С с помощью набора реагентов

TranscriptAid™ для высокоэффективной транскрипции с Т7 РНК-полимеразой («Fermentas», Латвия).

Культуральный вирус гепатита С (JFH1) был получен в результате трансфекции синтезированной РНК в клетки гепатомы человека Huh7.5 с использованием набора для трансфекции РНК Mirus Bio MIR 2250 («Mirus», США). Максимальный выход вируса в культуральную среду был зарегистрирован через восемь пассажей трансфицированных клеток и достигал $1,37 \times 10^6$ копий РНК/мл по результатам ПЦР в реальном времени (тест-система «АмплиСенс® HCV-Монитор-FL», ИЛС, Москва). Далее вирусосодержащую культуральную жидкость концентрировали центрифугированием в ячейке с отсекающим фильтром Amicon Ultra-15 centrifugal filter unit (100 кДа) («Millipore», США) и проводили еще четыре субпассажа на клетках Huh7.5 для получения вирусного стока JFH1. Сток титровали на монослой клеток Huh7.5 методом иммуногистохимического определения фокусов инфекционности. С этой целью монослой клеток инфицировали 10-кратными разведениями вируса и через трое суток инкубирования при 37 °С выполняли иммуногистохимическое исследование с использованием в качестве первичных антител моноклональные антитела к белку Core 6G7, а вторичных – конъюгат с пероксидазой хрена. В качестве субстрата использовали хромоген АЕС (3-амино-9-этилкарбазол, «Sigma»), который окисляется пероксидазой с образованием нерастворимого осадка красного цвета. Титр составил около 2×10^4 фокусов инфекционности/мл. Сток фасовали по аликвотам 1,5 мкл и хранили при –80 °С до использования.

Для оценки антивирусной активности лекарственного средства вируса гепатита С монослой клеток Huh7.5, выращенный на 24-луночных планшетах, инкубировали с 10-кратными разведениями исследуемого средства в диапазоне 0,008–800 нг/мл в культуральной среде в течение 12 ч при 37 °С. Затем среду с ИФН удаляли и клетки инфицировали одинаковой дозой вируса JFH1 из расфасованного замороженного стока $4,37 \times 10^6$ копий РНК/лунку (кроме контроля клеток) по три лунки на одну дозу ИФН. Адсорбцию вируса проводили 2 ч при 37 °С без ЛС имм-ИФН λ -1, затем вирус удаляли и в лунки вновь добавляли среду с соответствующими разведениями исследуемого средства. Планшеты инкубировали двое суток при 37 °С в CO₂-инкубаторе, затем готовили лизаты инфицированных и контрольных клеток: монослой клеток трижды промывали TBS-буфером (150 мМ NaCl, 50 мМ Трис, рН 7,6); обрабатывали лизирующим буфером

100 мкл/лунка (150 мМ NaCl, 50 мМ Трис, pH 7,6, 1 % Тритон X-100) + смесь ингибиторов протеаз (AEBSF, апротинин, бестатин, E-64, EDTA, леупептин) («Sigma», США), переносили в центрифужные микропробирки, выдерживали во льду 10 мин, замораживали; лизаты трижды замораживали-оттаивали, обрабатывали ультразвуком трижды во льду до полного разбиения осадка; центрифугировали 14000 об/мин в течение 30 мин при 4 °С; супернатант расфасовывали по 100 мкл.

Антивирусный эффект с помощью вестерн-блоттинга оценивали по индикации белка Core вируса гепатита С в соответствующих лизатах клеток с помощью моноклональных антител 6G7 (любезно предоставлены Marian Major, FDA, США). Использовали 13%-й ПААГ, белки переносили на мембрану Immun-Blot™PVDF 0,2 мкм. Уровень белковой нагрузки контролировали по β-актину, который визуализировали с помощью кроличьих поликлональных антител к β-актину («Cell Signaling», США). Для проявления использовали соответствующие конъюгаты с фосфатазой, субстрат BCIP (5-бromo-4-хлоро-3-индолилфосфат) и нитросиний тетразолий. Останавливали реакцию промыванием мембраны в дистиллированной воде.

Проводили предварительный эксперимент для оценки цитотоксичности исследуемого лекарственного средства. Цитотоксическую активность ЛС имм-ИФН λ-1 изучали на культуре клеток гепатомы человека Huh7.5 в диапазоне концентраций предполагаемой антивирусной активности 0,08–8000 нг/мл [4] микрометодом на 96-луночных планшетах («Greiner», Австрия) с использованием 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфо-фенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксанилида (реагент ХТТ, «Sigma-Aldrich», США). Метод основан на способности митохондриальных дегидрогеназ конвертировать водорастворимый ХТТ в формазан, который кристаллизуется внутри клетки. Перевод формазана в раствор с помощью фенозинметасульфата и последующая фотометрия позволяют точно соотнести изменение оптической плотности раствора с изменением количества жизнеспособных клеток. Оценивалась специфическая гибель обработанных разными концентрациями белков клеток по отношению к необработанным (контроль, 100 % жизнеспособности). Выявлено, что исследуемое средство не оказывало токсического воздействия на культуру клеток гепатомы человека Huh7.5 во всем диапазоне используемых концентраций.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из результатов оценки антивирусной активности лекарственного средства на основе иммобилизованного ИФН λ-1 методом ПЦР в реальном времени, представленных в таблице, ЛС имм-ИФН λ-1 в концентрации 0,008 нг/мл ингибирует репродукцию вируса гепатита С до 56 % от контроля, а в следующей исследуемой концентрации (0,08 нг/мл) – уже до 18 %. Таким образом, 50%-я ингибирующая доза лежит в диапазоне концентраций ЛС имм-ИФН λ-1 0,008–0,08 нг/мл.

Результаты анализа лизатов клеток с помощью вестерн-блоттинга приведены на рис. 1. Из представленных данных видно, что белок Core HCV вируса JFH1 четко детектируется в лизатах клеток, обработанных ЛС имм-ИФН λ-1 в концентрации 0,008 нг/мл, однако практически не обнаруживается при концентрации ЛС 0,08 нг/мл и выше.

Проведена оценка антивирусной активности ЛС имм-ИФН λ-1 иммуногистохимическим мето-

Таблица

Антивирусная активность лекарственного средства на основе иммобилизованного ИФН λ-1 (ПЦР в реальном времени)

Образец (лизаты клеток)	Концентрация вируса в образце	
	МЕ/мл	копий РНК/мл
Неинфицированные клетки Huh7.5 (отрицательный контроль)	$5,40 \times 10^2$	$1,08 \times 10^3$
Инфицированные клетки Huh7.5 + ЛС имм-ИФН λ-1 800 нг/мл	$2,34 \times 10^6$	$4,68 \times 10^6$
Инфицированные клетки Huh7.5 + ЛС имм-ИФН λ-1 80 нг/мл	$2,26 \times 10^6$	$4,52 \times 10^6$
Инфицированные клетки Huh7.5 + ЛС имм-ИФН λ-1 8 нг/мл	$1,80 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$
Инфицированные клетки Huh7.5 + ЛС имм-ИФН λ-1 0,8 нг/мл	$3,41 \times 10^6$	$6,82 \times 10^6$
Инфицированные клетки Huh7.5 + ЛС имм-ИФН λ-1 0,08 нг/мл	$9,37 \times 10^6$	$1,87 \times 10^7$
Инфицированные клетки Huh7.5 + ЛС имм-ИФН λ-1 0,008 нг/мл	$2,86 \times 10^7$	$5,72 \times 10^7$
Инфицированные клетки Huh7.5, не обработанные ЛС имм-ИФН λ-1 (положительный контроль)	$5,13 \times 10^7$	$1,03 \times 10^8$

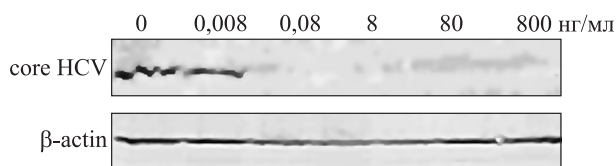


Рис. 1. Вестерн-блоттинг лизатов клеток Huh7.5, инфицированных стоком JFH1 и обработанных различными концентрациями лекарственного средства на основе иммобилизованного ИФН λ -1

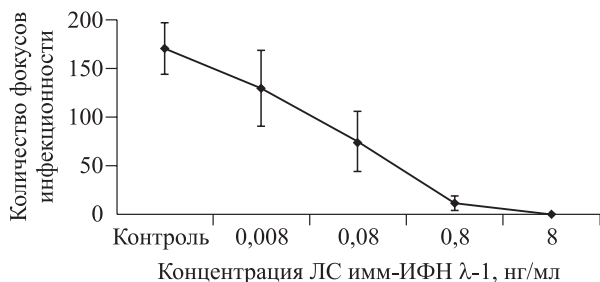


Рис. 2. Ингибирование репродукции вируса гепатита С, клон JFH1, в клетках гепатомы человека Huh.7.5, обработанных различными концентрациями лекарственного средства на основе интерферона λ -1

дом подсчета фокусов инфекционности вируса на монослое клеток Huh 7.5. Результаты титрования представлены на рис. 2. Выявлено, что 50%-я ингибирующая доза исследуемого ЛС лежит в диапазоне концентраций 0,008–0,08 нг/мл, что согласуется с данными, полученными методом ПЦР в реальном времени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучена противовирусная активность перорального лекарственного средства на основе иммобилизованного ИФН λ -1, полученного с помощью электронно-лучевой технологии. Для оценки антивирусной активности использовалась модель JFH1 клон/Huh-7.5 клетки. Оценка антивирусной активности ЛС имм-ИФН λ -1 проводилась методами ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинга и иммуногистохимическим методом подсчета фокусов инфекционности вируса на монослое клеток Huh 7.5.

При исследовании антивирусной активности ЛС имм-ИФН λ -1 с помощью ПЦР в реальном времени определено, что концентрация исследуемого лекарственного средства 0,008 нг/мл ингибирует репродукцию вируса гепатита С до 56 % от контроля, а следующая исследуемая концентрация лекарственного средства, 0,08 нг/мл, – до 18 %. Таким образом, установлено, что 50%-я ингибирующая доза лежит в диапазоне концен-

траций ЛС имм-ИФН λ -1 0,008–0,08 нг/мл. Использование вестерн-блоттинга показало схожие результаты: детекция белка Core вируса гепатита С происходила при обработке клеток исследуемым средством в концентрации 0,008 нг/мл, а при концентрациях 0,08 нг/мл и выше белок Core не детектировался. При подсчете фокусов инфекционности на монослое клеток Huh 7.5 (иммуногистохимический метод) обнаружено, что 50%-я ингибирующая доза исследуемого ЛС имм-ИФН λ -1 лежит в диапазоне концентраций 0,008–0,08 нг/мл, что согласуется с данными, полученными методом ПЦР в реальном времени.

Резюмируя результаты проведенных исследований можно утверждать, что иммобилизованный с помощью электронно-лучевой технологии ИФН λ -1 сохраняет противовирусную активность, что продемонстрировано на примере ингибирования вируса гепатита С. Таким образом, иммобилизованный с помощью технологии радиационного синтеза ИФН λ -1 можно рассматривать как прототип перорального лекарственного средства для лечения вирусных гепатитов, в частности гепатита С.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа проведена в рамках исполнения Государственного контракта от 16 ноября 2015 г. № 14.N08.12.0066, ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (шифр темы проекта «2015-14-N08-0067»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кинит Д.Н., Мадонов П.Г., Святченко В.А., Терновой В.А. Экспериментальное обоснование применения пероральной формы пегилированного интерферона α 2-b для терапии энтеровирусной инфекции // Сиб. науч. мед. журн. 2017. 37. (3). 11–16.
2. Мадонов П.Г., Ершов К.И., Дубровин А.В., Заполоцкий Е.Н., Мирошников П.Н., Шилова М.А., Кинит Д.Н. Электронно-лучевая модификация препаратов белковой природы для улучшения их фармакологических свойств // Мед. и образ. в Сибири. 2013. (4). Режим доступа: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1115. Дата обращения: 08.11.2017.
3. Пат. 2409669 РФ. Способ иммобилизации биологически активных веществ на полимерных носителях (варианты) и конъюгаты, полученные данным способом / А.В. Артамонов, А.А. Бекарев, Е.И. Верецагин; Опубл. 20.01.2011.
4. Marcello T., Grakoui A., Barba-Spaeth G., Machlin E.S., Kotenko S.V., MacDonald M.R., Rice C.M.

Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics // *Gastroenterology*. 2006. 131. 1887–1898.

5. Veronese F.M., Pasut G. Protein PEGylation // Long acting injections and implants / Eds. J.C. Wright, D.J. Burgess. N.Y.; Dordrecht; Heidelberg; L.: Springer, 2012. 295–314.

INVESTIGATION OF THE ANTIVIRAL ACTIVITY OF AN ORAL DRUG PREPARATION BASED ON IMMOBILIZED INTERFERON λ -1

Dmitriy Nikolaevich KINSHT^{1,2}, **Pavel Gennad'evich MADONOV**^{1,2},
Galina Vadimovna KOCHNEVA³, **Tatyana Sergeevna TARTYNOVA**¹,
German Igorevich BAYKALOV¹

¹ *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia*
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52

² *«Scientific Future Management» company*
630559, Novosibirsk region, settlement Koltsovo, Tchnoparkovaya str., 10

³ *State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector»*
630559, Novosibirsk region, settlement Koltsovo

Despite the success in developing direct-acting antiviral drugs, in routine clinical practice the use of interferons remains relevant. Parenteral administration of interferons is accompanied by systemic side effects and presents significant inconveniences for patients. A drug based on interferon λ -1, which has high enteric bioavailability and ensures its high concentration in the liver, is promising for the effective treatment of hepatotropic viruses. The aim of the investigation was to study the antiviral activity of an oral medicine based on interferon λ -1 immobilized on polyethylene glycol-1500 by electron-beam synthesis technology. **Materials and methods:** Real time PCR, Western blot and immunohistochemical method were used to study antiviral activity of tested medicine against hepatitis C virus. **Results and discussion:** The tested medicine retains antiviral activity against hepatitis C virus. All obtained results are consistent with each other. A 50 % inhibitory dose is in the range of 0.008–0.08 ng/ml. **Conclusion:** IFN λ -1 immobilized on polyethylene glycol with the help of radiation synthesis technology can be considered as a prototype of an oral drug for the treatment of viral hepatitis, in particular hepatitis C.

Key words: interferon λ -1, hepatotropic viruses, hepatitis C virus, immobilization, electron-beam immobilization, immobilized interferon λ -1.

Kinsht D.N. – candidate of medical sciences, associate professor of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine, e-mail: kinsht@scpb.ru

Madonov P.G. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine

Kochneva G.V. – doctor of biological sciences, head of the laboratory of viral hepatitis

Tartynova T.S. – clinical resident of the chair for pharmacology, clinical pharmacology and evidentiary medicine

Baikalov G.I. – student