РМЖ®

МЕДИЦИНСКОЕ ОБОЗРЕНИЕ

РЕПРИНТ, 2015

Противовирусная активность Амизона: многообещающие результаты международных исследований

Е. Говоркова, Д. Больц

Противовирусная активность энисамиума (Амизона®) в отношении вирусов гриппа в дифференцированных нормальных клетках эпителия бронхов человека

Д. Больц, С. Пен, М. Муззио, П. Даш, П. Томас, Р. Мехта, В. Маргитич



ИЗБРАННЫЕ ЛЕКЦИИ ДЛЯ СЕМЕЙНЫХ ВРАЧЕЙ

НЕЗАВИСИМОЕ ИЗДАНИЕ ДЛЯ ПРАКТИКУЮЩИХ ВРАЧЕЙ

www.rmj.ru

Противовирусная активность Амизона: многообещающие результаты международных исследований

Вирусы гриппа – важные инфекционные агенты, являющиеся причиной острого респираторного заболевания, поражающего миллионы людей во всем мире. Грипп характеризуется не только большим количеством вызванных им осложнений, но и значительными экономическими убытками, которые он наносит. Кроме того, высокая переменчивость этих вирусов приводит к появлению все более опасных для жизни человека разновидностей. Гриппозная инфекция поддается достаточно эффективному контролю путем вакцинации и применения противовирусных препаратов. На данный момент для лечения гриппа утвержден только один класс вирусоспецифических препаратов – ингибиторы нейраминидазы. Вот почему существует необходимость разработки противовирусных лекарственных средств с новым механизмом действия. Одним из оригинальных противовирусных препаратов, хорошо зарекомендовавших себя в лечении гриппа и ОРВИ, является Амизон® (энисамиума йодид), который в настоящее время широко применяется в клинической практике стран СНГ.

На Третьем противовирусном конгрессе, который состоялся 12–14 октября 2014 г. в Амстердаме (Нидерланды), были впервые представлены новые многообещающие результаты международных исследований Амизона®. Новые данные, полученные в ходе исследований эффективности и профиля безопасности Амизона®, прокомментировали авторитетные ученые, принимавшие участие в данном мероприятии.



Елена Говоркова – директор лаборатории в отделе инфекционных заболеваний Детского исследовательского госпиталя им. Св. Иуды (Мемфис, штат Теннесси, США) и специалист Американского национального центра по изучению и контролю гриппа. Ее научные интересы направлены на исследование эффективности препаратов против вирусов гриппа (включая высокопатогенные штаммы), а также на изучение молекулярно-биологических и генетических свойств резистентных вирусов. Е. Говоркова – автор свыше 110 оригинальных научных публикаций в ведущих международных журналах и обладательница нескольких американских и русских патентов. Является членом ряда научных обществ, а также редакционных советов журналов «Antiviral Research», «Antimicrobial Agents and Chemotherapy», «Vaccine», «Journal of Infectious Diseases».

– Проблема лечения и профилактики гриппа и ОРВИ никогда не теряла своей актуальности, а после вспышек так называемого птичьего гриппа, пандемии свиного гриппа в 2009 г. стала еще более насущной. Это обусловлено как необходимостью поиска эффективной терапии при тяжелых случаях заболевания, так и возможностью возникновения резистентности вирусов к существующим лекарственным средствам. Например, эпидемические штаммы вируса гриппа А подтипов H1N1 и H3N2 стали нечувствительными к препарату римантадин.

Разработка противовирусных препаратов ведется по нескольким перспективным направлениям. Это и поиск препаратов с прямым действием на белки вируса гриппа (ингибиторы нейраминидазы, гемагглютинина, полимеразного комплекса). Это и препараты, защищающие клетки человека от вируса гриппа путем удаления рецепторов, к которым прикрепляется вирус. И, наконец, это лекарственные средства, способные активировать неспецифические механизмы противовирусной защиты (например, различные иммуномодуляторы).

При этом желательно, чтобы препараты имели дополнительные свойства, которые могут повлиять на процесс патогенеза вирусной инфекции. В частности, важна их противовоспалительная активность, поскольку воспаление играет значительную роль в развитии инфекционного процесса при гриппе и ОРВИ. Избыточные воспалительные реакции могут стать пусковым механизмом для развития осложнений и тяжелых форм этих заболеваний.

Безусловно, вакцинация доказала свою противоэпидемическую эффективность. Но и гриппозные вакцины имеют ряд недостатков: возможное несоответствие штаммового состава вакцины и актуальной разновидности вируса, а также значительный период, необходимый для разработки клинически доступной вакцины против нового вирусного штамма. Поэтому наряду с вакцинацией необходимо иметь возможность применения эффективных противовирусных средств для немедленного лечения инфекции.

На данный момент только один класс вирусоспецифических препаратов (а именно: ингибиторы нейраминидазы осельтамивир и занамивир) рекомендован для профилактики и лечения гриппа у взрослых и детей. Появление вирусов гриппа, резистентных к ингибиторам нейраминидазы, стало значительной проблемой системы здравоохранения. Высокая распространенность вирусов H1N1 с мутацией H275Y, которая обусловливает резистентность к ингибиторам нейраминидазы, была зафиксирована во всем мире во время сезонных эпидемий гриппа в 2007–2009 гг.

Другим моментом, ограничивающим применение ингибиторов нейраминидазы, является широкая циркуляция вирусной микст-инфекции, поскольку в этом случае необходимы препараты, которые эффективно действуют не только на вирусы гриппа, но и на другие вирусы, поражающие респираторный тракт. Кроме того, понятно, что следует разрабатывать и внедрять лекарственные средства с разными механизмами противогриппозного действия, а не только ингибиторы нейраминидазной активности. Тогда появится возможность применения комбиниро-

ванной терапии и, потенциально, значительного снижения частоты осложнений при гриппозной инфекции.

Разработка и изучение нового лекарственного средства – сложный и многоступенчатый процесс. Потому, отвечая на данный вопрос, необходимо разделить доклиническую и клиническую стадии исследования. Доклиническая стадия проводится с использованием культуры клеток и на лабораторных животных. При проведении этих исследований следует оценить не только эффективность и профиль безопасности препарата, но и понять возможный механизм его действия. В культуре клеток определяют подавление специфической вирусной активности и снижение вирусных титров с установлением дозозависимого эффекта. В экспериментах на животных оценивают степень оказанной препаратом защиты от гриппозной инфекции.

На клинической стадии исследований наиболее важными остаются критерии оценки состояния пациента: выраженность основных клинических симптомов, продолжительность заболевания, наличие осложнений. Вместе с тем необходимо использовать и вирусологические критерии, которые позволяют оценивать уровень снижения репликации вируса в верхних дыхательных путях человека.

Ряд высокотехнологичных современных подходов применяется для установления механизма действия исследуемых препаратов. К ним относятся разные молекулярно-генетические методы, скрининг рецепторов, определение уровня цитокинов и хемокинов, а также анализ клеточных факторов.

Одним из многообещающих противовирусных препаратов для лечения гриппа и ОРВИ является Амизон®, который представляет собой оригинальное химическое соединение, относящееся к производным изоникотиновой кислоты. На Третьем противовирусном конгрессе, который состоялся 12–14 октября 2014 г. в Амстердаме (Нидерланды), Д. Больцем были представлены убедительные результаты противовирусной эффективности Амизона® в отношении вирусов гриппа и некоторых других РНК-содержащих респираторных вирусов. По результатам проведенных клинических исследований в НИИ гриппа в Санкт-Петербурге (РФ), препарат обнаруживает выраженный клинический эффект при гриппе и ОРВИ.

Таким образом, Амизон® – это оригинальный препарат, и до сих пор ни на рынке США, ни на рынках других экономически развитых стран химико-фармацевтических аналогов данного препарата нет.



Дэйвид Больц – научный сотрудник отдела микробиологии и молекулярной биологии НИИ Иллинойского технологического института (Чикаго, штат Иллинойс, США). Вот уже более 10 лет занимается вопросами патогенеза вирусных заболеваний, доклиническими исследованиями антивирусной активности вакцин и химиотерапевтических препаратов. Является членом Американского общества вирусологов (American Society for Virology).

– Мы исследовали противовирусную активность Амизона®, точнее его активного вещества энисамиума йодида, против гриппа и респираторно-синцитиального вируса *in vitro*. Используя дифференцированные нормальные бронхоэпителиальные клетки человека (normal human bronchial epithelial cells – NHBE), мы продемонстрировали, что энисамиум (Амизон®) эффективно угнетает (более чем 100-кратно) репликацию разных подтипов вирусов гриппа типа А (H1N1, H1N1pdm09 и H3N2), а также гриппа типа В. Кроме того, энисамиум (Амизон®) угнетает репликацию резистентного к осельтамивиру вируса гриппа А (H1N1) с мутацией H275Y. В дополнительных экспериментах, в которых энисамиум (Амизон®) добавляли к клеткам NHBE через разные промежутки времени, влияя на разные стадии цикла репликации вируса гриппа, отмечено значительное снижение вирусных титров ($p<0,05$) в течение 8 ч после инфицирования клеток. При добавлении энисамиума (Амизон®) в течение первых 4 ч после инфицирования зафиксировано снижение титра вируса более чем в 100 раз, что свидетельствует о его влиянии на начальной стадии репликации вируса гриппа.

Также установлено, что энисамиум (Амизон®) эффективно угнетает репликацию респираторно-синцитиального вируса в клетках NHBE (более чем 100-кратно), что коррелирует со значительным снижением внутриклеточного уровня вирусной РНК.

Таким образом, энисамиум (Амизон®) проявляет противовирусную активность в отношении вирусов гриппа А и В *in vitro*, а также против респираторно-синцитиального вируса. На данный момент получены предварительные результаты, свидетельствующие о высокой противовирусной эффективности препарата также в отношении адено- и коронавирусов. Можно сделать вывод о том, что энисамиум (Амизон®) – противовирусное средство широкого спектра действия, что может оказаться особо ценным в лечении гриппа и ОРВИ.

Послесловие

На Третьем противовирусном конгрессе (12–14 октября 2014 г., Амстердам, Нидерланды) американскими учеными были впервые представлены доказательства того, что Амизон® проявляет противовирусную активность не только в отношении вирусов гриппа А и В, но также и респираторно-синцитиального вируса, который обусловливает тяжелые острые респираторные заболевания у детей. В рандомизированных плацебо-контролируемых клинических исследованиях, проведенных в НИИ гриппа в Санкт-Петербурге, было убедительно продемонстрировано, что Амизон® имеет выраженную клиническую и противовирусную эффективность в отношении вирусов гриппа А (H1N1, H3N2) и В, парагриппа, аденовируса, респираторно-синцитиального вируса и отличается благоприятным профилем безопасности.

Вышеприведенные факты позволяют утверждать, что Амизон® является эффективным противовирусным лекарственным средством с благоприятным профилем безопасности, показанным для применения при гриппе и ОРВИ.

Противовирусная активность энисамиума (Амизона®) в отношении вирусов гриппа в дифференцированных нормальных клетках эпителия бронхов человека*

Д. Больц[1], С. Пен[1], М. Муззио[1], П. Даш[2], П. Томас[2], Р. Мехта[1], В. Маргитич[3]

[1] НИИ Иллинойского технологического института, Чикаго, Иллинойс, США
[2] Детский исследовательский госпиталь имени святого Иуды, Мемфис, Теннесси, США
[3] ПАО «Фармак», Киев, Украина

Экскурс в проблему

Грипп – это острое респираторное заболевание, вызываемое вирусами гриппа А и В, которые приводят к развитию ежегодных эпидемий с высоким уровнем заболеваемости и смертности, а иногда и пандемий. Хотя вакцины для профилактики гриппа доказали свою эффективность в уменьшении выраженности симптомов заболевания во время эпидемий гриппа, однако в связи с возможным антигенным несоответствием вакцины и относительно продолжительным процессом разработки клинически доступной вакцины против нового штамма вируса создание эффективных противовирусных препаратов для угнетения инфекционного процесса при гриппе является актуальной задачей. На данный момент только один класс противовирусных препаратов (ингибиторы нейраминидазы, такие как осельтамивир и занамивир) рекомендован для использования с целью профилактики и лечения гриппа у взрослых и детей во всем мире.

Сегодня значительные усилия сосредоточены на разработке новых способов лечения и выборе мишеней для действия лекарственных средств, которые дали бы возможность устранить патогенные свойства вируса гриппа. В этом контексте привлекают внимание некоторые препараты, которые на данный момент находятся на рынке стран СНГ и обнаруживают противовирусную активность в отношении вирусов гриппа А и В. Одним из таких препаратов является ***энисамиум йодид*** (рис. 1), который зарегистрирован и маркетируется под торговым названием ***Амизон®*** в России, Украине, Белоруссии, Казахстане и Узбекистане как противовирусное средство против гриппа.

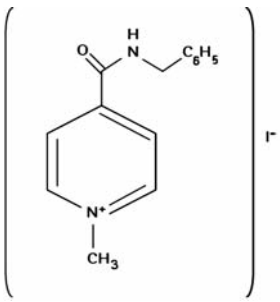


Рис. 1. Химическая структура энисамиума йодида

Клинические исследования, проведенные в России, продемонстрировали высокую эффективность препарата против вирусов гриппа А и В, что позволило говорить о энисамиуме как о перспективном средстве, предназначенном для лечения гриппа. Однако имеющихся экспериментальных данных об эффективности этой производной изоникотиновой кислоты как противовирусного агента, действенного в отношении гриппа, недостаточно. Поэтому целью данного исследования было оценить ожидаемую противовирусную активность энисамиума в отношении вирусов гриппа *in vitro*. Пилотные исследования на MDCK- и A549-клетках продемонстрировали низкую проницаемость энисамиума – на уровне 0,08 и 0,87% соответственно, а также отсутствие противовирусного эффекта. Поглощение энисамиума дифференцированными нормальными бронхоэпителиальными клетками человека (normal human bronchial epithelial – NHBE) было лучшим в сравнении с клетками A549 и MDCK и варьировало в пределах 1,7–2,1%. Поэтому именно культуры клеток NHBE были избраны для оценки эффективности и наличия противовирусного эффекта энисамиума в отношении вирусов гриппа.

Материалы и методы

Культура клеток: в исследовании были использованы дифференцированные клетки NHBE EpiAirway System компании «MatTek» (Ашланд, Массачусетс, США). Клетки от одного донора были использованы для анализа однородности. Апикальную поверхность клеток подвергали влиянию влажного 95% воздуха / 5% CO_2, а также меняли среду и отмывали муцин каждые 24–48 ч.

Исследуемые материалы: исследованный продукт – энисамиум (Амизон®) был предоставлен ПАО «Фармак». Препарат для положительного контроля – осельтамивира карбоксилат, полученный от Toronto Research Chemicals, TRC (Торонто, Канада).

Вирусный агент: в NHBE-клетки были инокулированы вирусы гриппа А через апикальную поверхность. После инкубации в течение 1 ч вирусный инокулят удаляли из клеток, апикальную поверхность клеток промывали натрий-фосфатным буферным раствором (Phosphate Buffered Saline – PBS).

Введение исследуемого материала: для проведения положительного контроля (использование осельтамивира карбоксилата) культура клеток NHBE инкубирова-

* Перевод постера, представленного на Третьем противовирусном конгрессе, который состоялся 12–14 октября 2014 г. в Амстердаме (Нидерланды).

лась с базальной стороны с осельтамивиром в течение 60 мин до заражения вирусом. Энисамиум или контроль добавлялся к базальному компартменту культуры клеток до или после инокуляции и инкубировался в течение определенного условиями эксперимента периода.

Результаты

Дифференцированные NHBE-клетки были инфицированы вирусом гриппа A/Brisbane/59/2007 (H1N1) с показателями множественности инфекции (multiplicity of infection MOI), равными 0,01 PFU/клетку (A) (PFU – plaque-forming unit, бляшкообразующая единица – отдельная инфекционная вирусная доля в суспензии вирусов, которую обнаруживают по образованию бляшки), 0,001 PFU/клетку (B) и 0,0001 PFU/клетку (C). Энисамиум (1000; 500; 100; 50 и 10 μM) добавляли к базальному компартменту через 1 ч после инокуляции вируса (табл. 1, 2). Смывы с апикальной поверхности клеток собирали через 24 ч (черные кружки) и 48 ч (черные квадраты) после заражения и титровали с помощью TCID50-анализа (рис. 2). Межевое значение, которое определяли в ходе анализа, составило 0,75 $\log_{10}TCID_{50}$/мл.

Неинфицированные NHBE-клетки обрабатывали 1000 μM энисамиума, затем клетки отбирали через 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 и 24 ч после контакта с исследуемым веществом. Представлены концентрации энисамиума в клетках (рис. 3).

Дифференцированные NHBE-клетки были инфицированы вирусом гриппа A/Brisbane/59/2007 (H1N1) в количестве MOI=1,0 PFU/клетку и экспонировались с энисамиумом 2000 μM. Энисамиум добавляли в базальный

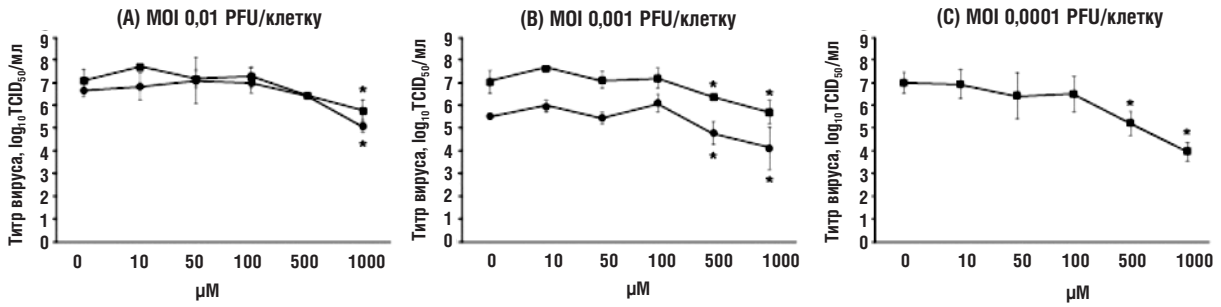


Рис. 2. Ингибиторная активность энисамиума в отношении разных MOI вируса гриппа A/Brisbane/59/2007 (H1N1)

Таблица 1. Противовирусная активность энисамиума в отношении вирусов гриппа A и B в культуре дифференцированных NHBE-клеток

Доза препарата (μM)[a]	Титры вируса гриппа, $\log_{10}TCID_{50}$/мл±SD				
	A/GA/20/06(H1N1) H275Y	A/Brisbane/59/07(H1N1)	A/TN/1-560/09(H1N1)	A/Perth/16/09(H3N2)	B/Texas/06/11
0	6,9±0,4	5,58±0,1	7,58±0,7	6,7±0,5	6,8±0,4
Осельтамивир[b] Энисамиум	6,0±0,4 (-0,9)	3,08±0,6 (-2,5)[c]	3,75±0,4 (-3,8)	3,0±0,4 (-3,2)	4,9±0,3 (-1,8)
40	6,5±0,0 (-0,4)	5,67±0,1 (ND)	6,50±0,3 (-1,1)	6,2±0,9 (-0,5)	6,2±0,6 (-0,6)
200	6,2±0,6 (-0,8)	5,50±0,3 (-0,1)	6,75±0,0 (0,8)	6,3±0,1 (-0,3)	5,8±0,5 (-1,0)
600	5,1±0,3 (-1,8)	4,33±1,0 (-1,25)	5,67±0,1 (-1,9)	4,8±0,4 (-1,8)	4,8±0,4 (-1,9)
1000	4,8±0,5 (-2,1)	3,25±0,5 (-2,3)[c]	4,83±0,1 (-2,8)	4,1±0,7 (-2,6)	4,6±0,1 (-2,2)

Примечания. [a] NHBE-клетки инокулированы вирусами гриппа в таком количестве, что MOI составлял 0,01 PFU/клетку. После адсорбции в течение 1 ч энисамиум добавлялся к базальному компартменту в указанной дозе и инкубировался в течение 24 ч при 37°C в среде с содержанием CO_2 на уровне 5%. Вирусы, высвобождавшиеся с апикальной стороны NHBE-клеток, собирали через 24 ч после инокуляции.

[b] Концентрация осельтамивира карбоксилата составляла 1 μM.

[c] Титры вирусов определялись в MDCK-клетках при помощи $TCID_{50}$ анализа и выражались в $\log_{10}TCID_{50}$/мл. Разность средних титров вируса (выраженных как $\log_{10}TCID_{50}$/мл) между инфицированными вирусом необработанными препаратами и обработанными энисамиумом NHBE-клетками указана в круглых скобках

Таблица 2. Проницаемость энисамиума в дифференцированные клетки NHBE

Доза препарата, μM[a]	n[b]	Концентрация в NHBE клетках, среднее значение ±SD, нг[c]	Проницаемость, %
10	3	36,8±3,8	1,4
50	3	213±34	1,6
100	3	410±77	1,6
500	3	1727±108	1,3
1000	3	3009±132	1,1

Примечания. [a] Энисамиум в указанных дозах инкубировали с дифференцированными NHBE-клетками при 37°C в атмосфере с содержанием CO_2 на уровне 5% в течение 24 ч в среде для роста бронхиальных эпителиальных клеток, не содержащей сыворотку (serum-free Bronchial Epithelial Cell Growth Medium).

[b] Количество повторений эксперимента.

[c] Клеточные экстракты собирали и определяли концентрацию энисамиума при помощи LC-MS-MS. Концентрация выражалась в нг на 10^6 клеток

компартмент через -1, 0, 2, 4, 6, 8 и 10 ч после инокуляции вируса и оставляли в течение 24 ч. Время инокуляции вируса указывается как 0 ч. Супернатанты собирали через 24 ч после заражения с верхнего отсека и титровали при помощи TCID50-анализа (A). Экспрессия матричного гена (Matrix gene – M gene) связана с контролем уровня вируса, экспрессия гена была нормирована по уровню мРНК β-актина в соответствующем образце (B) (рис. 4).

Дифференцированные NHBE-клетки были предварительно обработаны энисамиумом 1000, 500, 100 μM за 24 ч до инокуляции. Через 24 ч к NHBE-клеткам был инокулирован вирус гриппа A/Brisbane/59/2007 (H1N1) в количестве MOI=0,001 PFU/клетку; энисамиум находился в культуральной среде с базальной стороны в течение всего эксперимента. Осельтамивира карбоксилат (1 μM) был добавлен к базальному компартменту за 1 ч до инокуляции вируса, он находился там в течение всего эксперимента. Время инокуляции вируса указывается как 0 ч. Супернатанты собирали через 24 ч (черные столбики) и 48 ч (белые столбики) после инфицирования (рис. 5).

Заключение

• Энисамиум дозозависимо снижает репликацию всех исследуемых вирусов гриппа, в т. ч. сезонного H1N1, который имел мутацию H275Y NA, и таким образом обнаруживает эффективность против осельтамивир-резистентного вируса.

• Противовирусная эффективность энисамиума является дозозависимой, а эффект лучше выражен при более низких инфекционных дозах.

• Максимальная эффективность энисамиума обнаружена при его добавлении в течение 8 ч после заражения.

• Внутриклеточная концентрация энисамиума, достигаемая при его добавлении в количестве 1000 μM во время инфицирования, коррелирует с противовирусной эффективностью энисамиума.

Выявлена противовирусная активность противогриппозного соединения – энисамиума, которая подтверждает данные о его клинической эффективности. Хотя молекулярный механизм действия энисамиума до сих пор до конца не идентифицирован, данные, представленные выше, указывают на то, что препарат влияет на вирусную репликацию вирусов гриппа. В случае, когда энисамиум добавляли перед или вскоре после инфицирования, снижение экспрессии матричного гена и вирусных титров указывает на то, что он ингибирует синтез вирусной РНК. Интересно, что вирусные титры продолжали повышаться в присутствии энисамиума. Поэтому можно сделать вывод, что препарат угнетает репликацию вируса гриппа, но не блокирует ее полностью. Необходимы дальнейшие исследования для обеспечения лучшего понимания механизма действия энисамиума.

Благодарность. *Данная работа финансировалась ПАО «Фармак». Мы выражаем глубокую благодарность доктору Дж. Морри (John Morrey), Д. Сми (Donald Smee) и Е. Говорковой (Elena A. Govorkova) за ценные советы и полезные обсуждения в ходе этих исследований.*

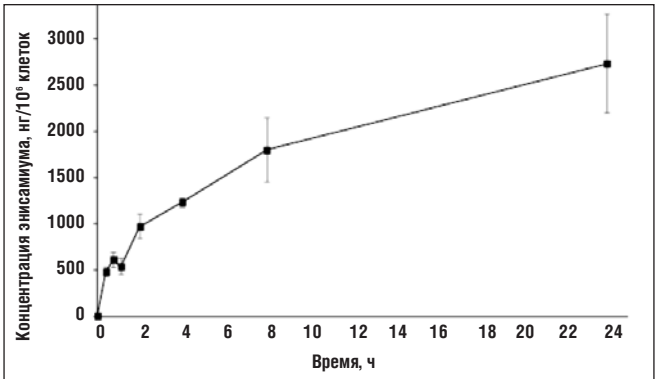


Рис. 3. Кинетика внутриклеточного поглощения энисамиума

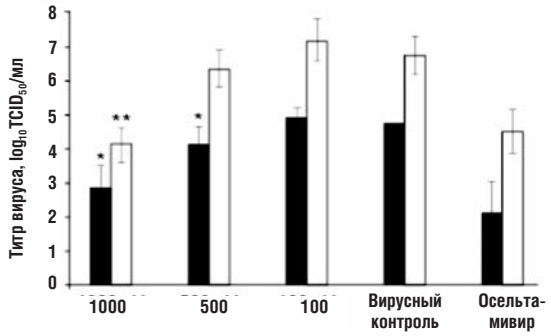


Рис. 5. Эффект предварительной инкубации NHBE-клеток с энисамиумом перед инокуляцией вируса

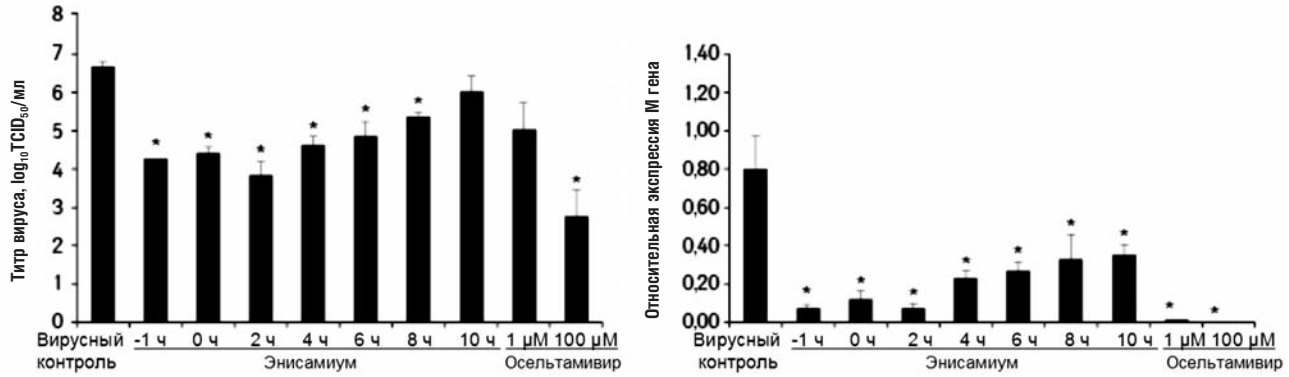


Рис. 4. Эффективность ингибирования репликации вируса гриппа в NHBE-клетках энисамиумом в зависимости от времени его добавления