

УДК 615.281.038

РАЗРАБОТКА ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ НА ОСНОВЕ ДУХЦЕПОЧЕЧНЫХ РНК И РЕКОМБИНАНТНЫХ ИНТЕРФЕРОНОВ

© 2024 г. О. С. Иванова¹ *, Г. М. Левагина¹, Ю. В. Телегина¹, С. В. Усова¹,
Е. С. Башкина¹, С. Г. Гамалей¹, Е. Д. Даниленко¹

¹Федеральное бюджетное учреждение науки “Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”” Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Кольцово, Новосибирская область, 630559 Россия

*e-mail: ivanova_os@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 28.06.2024 г.

После доработки 06.08.2024 г.

Принята к публикации 23.08.2024 г.

Препараты интраназальной формы, содержащие двухцепочечную РНК (дцРНК) и интерферон- $\alpha 2b$ (ИФН- $\alpha 2b$) в составе молекулярных конструкций, характеризуются повышенной устойчивостью к ферментативной деградации в сравнении с индивидуальными соединениями. Противовирусная активность дцРНК в культуре мышинных фибробластов L929, инфицированных вирусом энцефаломиокардита (EMCV) мышей, повышалась при введении в состав конструкции ИФН по сравнению с показателем только для субстанции дцРНК. При увеличении содержания ИФН в составе наблюдалось повышение анти-EMCV-активности препарата. Показано дозозависимое увеличение противовирусной активности ИФН в составе молекулярных конструкций в отношении EMCV в культуре эмбриональных клеток легкого человека L-68. Полученные данные подтверждают перспективность разработки новых лекарственных препаратов, в состав системы доставки которых входят ИФН и дцРНК, для интраназального применения в качестве профилактического и терапевтического средства против гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций.

Ключевые слова: двухцепочечная РНК, рекомбинантные белки, интерферон, молекулярная конструкция, интраназальная форма, устойчивость к ферментативной деградации, противовирусная активность, система доставки

DOI: 10.56304/S0234275824040033

Грипп и другие острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) относятся к наиболее массовым вирусным заболеваниям, которые нередко вызывают серьезные осложнения и приводят к значительному экономическому ущербу. В настоящее время в клинической практике, как в нашей стране, так и за рубежом, наряду со специфическими противовирусными препаратами для профилактики и лечения этих инфекций используют неспецифические лекарственные средства, такие как интерфероны (ИФН) и их индукторы [1].

Давно доказана противовирусная активность препаратов ИФН- α в отношении многих инфекци-

онных агентов, включая социально значимые инфекции, вызываемые вирусами Денге, Западного Нила и другими [2]. Препараты рекомбинантного ИФН- $\alpha 2b$ человека (Реаферон, Виферон, Гриппферон и др.) в настоящее время применяют для профилактики и лечения гриппа и ОРВИ, гепатитов В, С и D, клещевого энцефалита, герпеса, вирусно-бактериального и микоплазменного менингоэнцефалита, вирусного конъюнктивита и других инфекций. ИФН- γ , помимо прямого противовирусного действия на инфицированные клетки, относится к наиболее мощным иммуностимуляторам среди всех типов ИФН [3]. Ингарон – лекарственный препарат на основе ИФН- γ – в настоящее время зарегистрирован Минздравом России (РУ ЛС-000924 от 27.08.2010) и рекомендован для комплексной терапии гепатитов В и С, герпеса, гриппа и ОРВИ (https://www.vidal.ru/drugs/ingaron__30648).

Среди известных индукторов ИФН следует выделить двухцепочечные РНК (дцРНК) природ-

Список сокращений: EMCV (encephalomyocarditis virus) – вирус энцефаломиокардита; дцРНК – двухцепочечная РНК; ИЕ – интерфероновая единица; ИФН – интерферон(ы); ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция; ПГС-ИФН – полиглокин-спермидин-интерферон; ПЭГ-400 – полиэтиленгликоль с молекулярной массой 400 Да; ЦПД₅₀ – 50%-ная цитопатическая доза.

ного и синтетического происхождения, которые не только усиливают продукцию в организме всех типов ИФН, но и активируют другие факторы неспецифической и специфической резистентности, обеспечивающие формирование противовирусного протективного ответа [4]. Препараты на основе дцРНК оказывают защитный эффект в отношении широкого спектра вирусов (грипп, герпес, клещевой энцефалит, ВИЧ и др.), в том числе особо опасных (ортопоксвирусы) [5].

Хорошо известно, что эффективность лекарственного средства в значительной мере зависит от способа его применения. К перспективным лекарственным формам, особенно для лечения респираторных инфекций, относится интраназальная, то есть нанесение на поверхность слизистых оболочек верхних дыхательных путей. Доставка лекарственного средства во “входные ворота” патогена, распространяющегося воздушно-капельным путем, имеет несомненные преимущества перед другими лекарственными формами. Это неинвазивность введения, быстрое развитие фармакологического эффекта, возможность преодоления гематоэнцефалического барьера, снижение вероятности возникновения и спектра побочных эффектов [6]. Кроме того, наряду с местным действием, эти препараты могут оказывать и системный эффект, способствуя развитию комплексного противовирусного ответа.

Например, показано, что препараты синтетической дцРНК PolyI:PolyC при интраназальном применении вызывают индукцию ИФН и обеспечивают защиту мышей от вируса гриппа А(H5N1) [7]. Во многих работах продемонстрирована иммуномодулирующая и противовирусная активность интраназальных форм ИФН [8]. Разработанная нами ранее интраназальная форма дрожжевой дцРНК повышала выживаемость мышей, инфицированных вирусами гриппа А: Aichi/2/68 (H3N2) и Bishkek/01/2009 (H1N1)pdm09 [9]. Кроме того, нами продемонстрирована возможность усиления противовирусной активности дцРНК в присутствии рекомбинантных форм ИФН- α или ИФН- γ [10].

К важным показателям качества лекарственного препарата относится стабильность его компонентов как в процессе производства и хранения, так и при введении в организм. Известно, что эффективные системы доставки продлевают действие и повышают биодоступность активного вещества, обеспечивают защиту от деградирующих факторов среды, улучшают его проникновение в клетки и, как следствие, снижают побочные эффекты.

В настоящее время в клинической практике нашли применение препараты ИФН- α 2b, заключенного в липосомы (Реаферон-ЕС-липид, АО “Вектор-Медика”, Россия), пегилированного ИФН- α 2b (ПегАльтевир, “Фармстандарт”, Россия; PegIntron,

Schering-Plough, США; Pegasys, Roche, Швейцария). Использование фотосшитого биодеградируемого эластомера poly(ϵ -caprolactone-co-*D,L*-lactide) в качестве средства депонирования и доставки ИФН- γ обеспечивало длительное, в течение 21 сут, высвобождение биологически активного пептида из полимера с постоянной скоростью [11]. Такие модификации белков направлены на снижение иммуногенности, увеличение периода полужизни и, в конечном итоге, на повышение качества жизни пациента в процессе лечения [12].

Аналогичные подходы используют и при создании препаратов на основе нуклеиновых кислот. Например, показано, что препараты, содержащие в качестве активного компонента индуктор ИФН – натриевую соль дцРНК киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* – и полимерные носители (поливинилпирролидон, полиглиокин), обладали пролонгированным ИФН-индуцирующим действием и обеспечивали достоверный противовирусный эффект [13].

Известны примеры использования дцРНК как компонентов системы доставки цитокинов – вирусоподобных частиц (ВПЧ) [14–17]. Целевые белки, экспонированные на поверхности этих частиц, проявляли повышенную иммуностимулирующую активность по сравнению с индивидуальным белком [17]. Аналог ИФН- γ человека – препарат Дельтаферон (производства ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор”, Россия) – в составе ВПЧ отличался повышенной стабильностью при хранении, устойчивостью к протеолиту и высокой противовирусной активностью в культуре клеток L-68 [16]. Этот методический подход был использован нами в данной работе для стабилизации компонентов композиционно-го препарата на основе дцРНК и ИФН.

Целью исследования было получение и исследование свойств интраназальной формы препарата для профилактики и лечения гриппа и ОРВИ, содержащего в составе молекулярной конструкции дцРНК и рекомбинантный ИФН человека.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материалы

Для выполнения работы были использованы следующие материалы: натриевая соль дцРНК (субстанция) с содержанием дцРНК 21.96% (ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, Россия); ИФН- α 2b (субстанция) (АО “Вектор-Медика”, Россия) с активностью 7.4×10^7 МЕ/мл; рекомбинантный ИФН- γ человека (ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора) с активностью 8.7×10^6 МЕ/мл; декстран 40 000 Да (AppliChem, Германия); боргидрид натрия, натрия периодат и спермидин (Sigma, США); сефадекс G-25 и сефароза-6В (Pharmacia, Швеция); ЭДТА

(AppliChem); ДМСО (ООО “Йодные Технологии и Маркетинг”, Россия); полиэтиленгликоль 400 (ПЭГ-400; Panreac, Германия); этидия бромид (Sigma); натрия хлорид, 0.9%, ГОСТ 4233-77 (Россия); РНКазы из поджелудочной железы быка, аморфная лиофилизированная, 9000 У/мг (“Биолот”, Россия); агароза (Serva, Германия); ДНК-маркеры 1 Kb (НПО “СибЭнзим”, Россия).

В работе использовали следующие культуры клеток: L-68 – диплоидная культура клеток легкого эмбриона человека (концентрация 2×10^5 клеток/мл); L929 – фибробласты подкожной соединительной ткани мыши, клон линии L (концентрация 1×10^5 клеток/мл). Клетки получены из лаборатории коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора.

Вирус энцефаломиокардита мышей (EMCV) получен из Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России.

Получение молекулярных конструкций, содержащих дцРНК и ИФН в составе конъюгата с полиглобулином (декстраном) и спермидином (ПГС-ИФН) и их интраназальных форм

Молекулярные конструкции, содержащие дцРНК и ИФН в составе конъюгата с полиглобулином (декстраном) и спермидином (ПГС-ИФН), получали по описанной ранее методике [15].

Процесс состоял из двух стадий: получения конъюгата и сборки молекулярной конструкции. Активацию декстрана для синтеза конъюгата проводили окислением периодатом натрия в соотношении 1 : 40 (моль декстрана/моль периодата) в течение 1 ч с последующей очисткой активированного декстрана от непрореагировавших компонентов гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25. В раствор активированного декстрана сначала вносили белок (ИФН- α либо ИФН- γ) в соотношении 1 : 1 (моль декстрана/моль ИФН) и инкубировали в течение 2 ч, затем конъюгируемый компонент, спермидин, в соотношении 1 : 10 (моль/моль), инкубировали 2 ч при комнатной температуре и останавливали реакцию боргидридом натрия в соотношении 1 : 80 (моль декстрана/моль боргидрида). Полученную смесь выдерживали 2 ч при комнатной температуре, после чего проводили очистку синтезированного конъюгата ПГС-ИФН гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25.

Для получения молекулярной конструкции, содержащей дцРНК и ИФН, в полученный раствор конъюгата ПГС-ИФН вносили субстанцию дцРНК (с содержанием дцРНК 50 мкг/доза), выдерживали реакционную смесь в течение 1 ч при (2–8)°С, полученный продукт очищали гель-филь-

трацией на сефарозе-6В с целью удаления непрореагировавших компонентов.

Интраназальную форму препарата получали путем смешивания раствора молекулярной конструкции со вспомогательными компонентами (ЭДТА, ДМСО, ПЭГ-400, NaCl) в условиях асептики с последующей лиофилизацией. Процесс лиофилизации вели в камере лиофильной сушки с опцией пневматической укупорки в автоматическом режиме с заморозкой образцов до $-(70 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 6 ч и сублимацией в течение 16 ч при температуре $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$.

При изучении биологических свойств молекулярных конструкций в качестве препаратов сравнения использовали композиции дцРНК с ИФН- α или ИФН- γ , полученные методом, описанным ранее [10].

Анализ стабильности структуры дцРНК

Оценку сохранности структуры дцРНК в конструкциях проводили методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием в камере для электрофореза SE-1 с источником питания Эльф-4 (“ДНК-технологии”, Россия). О подлинности препарата судили по наличию индивидуальных L- и M-форм дцРНК. Гели документировали с помощью системы GI-2 (“Хеликон”, Россия) с трансиллюминатором ЕСХ-20.М (Vilber Lourmat, Франция).

Исследование сохранности структуры дцРНК в составе конструкции для интраназального введения в сравнении с композицией того же состава и исходной дцРНК оценивали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием после инкубации образцов с панкреатической РНКазой (0.03–0.1 У). В раствор исследуемых образцов, содержащих 50 мкг дцРНК в 10 мкл, вносили 1 мкл свежеприготовленного раствора панкреатической РНКазы (0.03–0.1 У). Реакционную смесь инкубировали 5 мин и останавливали реакцию добавлением 2 мкл 200 мМ ЭДТА.

ИК-спектральный анализ интраназальной формы молекулярной конструкции и исходных компонентов

ИК-спектры интраназальной формы молекулярной конструкции и исходных компонентов регистрировали на Фурье-спектрофотометре Infracal FT-801 (“Симэкс”, Россия) в диапазоне длин волн 4000–500 cm^{-1} . Для анализа тонкоизмельченный образец тщательно перемешивали в агатовой ступке с порошком KBr (1% образца и 99% KBr) и прессовали смесь в пресс-форме. В качестве контроля использовали исходные ком-

поненты: натриевую соль дцРНК, субстанции ИФН- α 2b и ИФН- γ .

Анализ противовирусной активности интраназальной формы молекулярной конструкции

Противовирусную активность конструкций определяли по описанной ранее методике [18] в микропланшетном формате по подавлению цитопатического действия тестируемого вируса в культуре клеток. Для анализа противовирусной активности дцРНК использовали культуру мышинных фибробластов L929, клон линии клеток L; для анализа ИФН – линии диплоидных клеток эмбриона легкого человека L-68. В качестве тест-вируса использовали вирус энцефаломиокардита мышей (EMCV) в концентрации 100 ЦПД₅₀.

Перед проведением анализа на культуре клеток L929 исследуемые образцы и препарат сравнения (субстанцию дцРНК) вводили внутривентриально белым аутбредным мышам-самцам линии ICR массой 18–20 г (2.5 мг/кг по дцРНК), через 6 ч у животных брали кровь и отделяли сыворотку для анализа ее противовирусной активности.

Для анализа использовали 96-луночные полистирольные стерильные плоскодонные планшеты, в лунки которых вносили по 0.1 мл суспензии клеток L929 (2×10^4 клеток) в среде Игла MEM с 10% сыворотки крупного рогатого скота. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 ч – до образования клеточного монослоя. Для определения противовирусной активности (по активности ИФН) готовили двукратные разведения сывороток крови мышей не менее, чем в двух повторях. После 24 ч инкубации при 37°C в атмосфере 5% CO₂ из лунок планшета удаляли культуральную жидкость. В каждую лунку вносили по 100 ЦПД₅₀ (50%-ная цитопатическая доза) EMCV в 0.1 мл среды Игла MEM. Планшеты инкубировали в тех же условиях в течение 18 ч, после чего оценивали сохранность клеточного монослоя методом светооптической микроскопии. За единицу активности принимали величину, обратную наибольшему разведению сыворотки, обеспечивающему 50%-ную защиту клеток от деструктивного действия вируса (ИЕ₅₀).

Определение противовирусной активности ИФН в культуре клеток L-68 выполняли аналогичным образом, используя в качестве образцов двукратные последовательные разведения исследуемых препаратов.

Статистическая обработка результатов

Полученные данные обрабатывали с использованием пакета программ Statgraphics, Version 5.0 (Statistical Graphics Corp., США). При статистической обработке результатов противовирусной

активности образцов для оценки межгрупповых различий применяли непараметрический *H*-критерий Краскела–Уоллиса и *U*-критерий Манна–Уитни. Критический уровень статистической значимости (*p*) для множественных сравнений принимали равным 0.05. При обнаружении статистически значимых различий проводили апостериорные сравнения с помощью двувыворочного критерия Манна–Уитни, при этом скорректированный критический уровень значимости (*p*) для 6 попарных сравнений принимали равным 0.0085.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве системы доставки дцРНК и ИФН нами была выбрана биodeградируемая молекулярная конструкция, пригодная, как показано ранее [13–17], для депонирования и транспортировки к клеткам-мишеням белкового материала (фактора некроза опухоли-альфа и аналога ИФН- γ). Эта молекулярная конструкция представляет собой частицу, содержащую в центральной части полинуклеотидный комплекс (дцРНК), покрытый слоем конъюгата полиглобулина со спермидином, удерживаемого за счет ионного взаимодействия между отрицательно заряженным полинуклеотидным комплексом и положительно заряженным спермидином [14].

Ранее нами был подобран оптимальный диапазон концентраций рекомбинантного ИФН (500–5000 МЕ/мл восстановленного раствора) и дцРНК (0.0113 г/мл восстановленного раствора) в составе композиционного препарата для интраназального применения [19, 20]. На экспериментальных моделях *in vivo* показано, что эти концентрации компонентов конструкции обеспечивали повышенную выживаемость и продолжительность жизни зараженных мышей. Этот диапазон концентрации использован нами при получении препаратов, содержащих дцРНК и ИФН в составе молекулярных конструкций.

Синтез конъюгата ПГС-ИФН- α /ИФН- γ и сборку конструкций с дцРНК проводили по вышеописанному методу. В результате получены препараты для интраназального введения трех составов (состав и содержание активных компонентов приведены в табл.1). Интраназальные формы препаратов, полученные в виде лиофилизатов, содержали, помимо активных компонентов в составе молекулярных конструкций, вспомогательные вещества: ЭДТА (антиоксидант, хелатообразователь), ДМСО (активатор всасывания), ПЭГ-400 (неионогенное поверхностно-активное соединение) и NaCl (стабилизатор, обеспечивает изотоничность восстановленного раствора).

Одним из главных условий сохранности биологических свойств активных компонентов в составе многокомпонентных биофармацевтических пре-

паратов является стабильность их структуры. Известно, что под влиянием физических или химических воздействий белки например, быстро теряют нативность. Как правило, это приводит к изменению третичной и частично вторичной структуры молекулы и не сопровождается какими-либо изменениями первичной структуры. Изменение уникальной структуры нативного белка способствует потере характерных для него свойств: растворимости, биологической активности, электрофоретической подвижности [21]. Сохранность вторичной структуры относится к критическим факторам для реализации биологических свойств и полинуклеотидов. Известно, например, что ИФН-индуцирующая активность дцРНК определяется не только нуклеотидной последовательностью ее цепей, но и вторичной структурой молекулы [22].

При анализе стабильности нуклеинового компонента полученных нами конструкций методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле показано, что во всех исследуемых образцах сохраняются характерные L- и M-формы дцРНК. Снижение электрофоретической подвижности дцРНК в составе интраназальных форм препаратов свидетельствует об образовании конструкции. Подвижность дцРНК носила дозозависимый характер и снижалась при увеличении содержания ИФН в препарате, то есть при повышении молекулярной массы конструкции. Это хорошо видно на электрофореграмме, представленной на рис. 1.

Исследование интраназальных форм препаратов, содержащих дцРНК и рекомбинантные бел-

Таблица 1. Состав интраназальных композиционных препаратов, содержащих дцРНК и ИФН в качестве активных компонентов

Table 1. Composition of intranasal preparations containing dsRNA and IFN as active components

Активный компонент	Состав препарата		
	1	2	3
дцРНК, мкг/доза	50	50	50
ИФН- α или ИФН- γ , МЕ/доза	10	50	100

ки (ИФН- α , ИФН- γ), методом ИК-спектрометрии показало, что спектры препаратов имеют те же максимумы поглощения, что и исходные компоненты в области 500–4 000 cm^{-1} (рис. 2 и 3), и носят аддитивный характер.

Полученные данные спектрального и электрофоретического анализа подтверждают сохранность структуры дцРНК и спектральных характеристик дцРНК и ИФН в составе молекулярных конструкций.

Важным элементом оценки стабильности препаратов является изучение устойчивости активных компонентов к действию гидролаз. Этот параметр определяет длительность циркуляции функциональных ингредиентов в биологически активной форме в организме. При сравнительном анализе устойчивости препаратов, содержащих дцРНК и ИФН, к действию соответственно нуклеаз и протеаз показано, что дцРНК в составе как конструк-

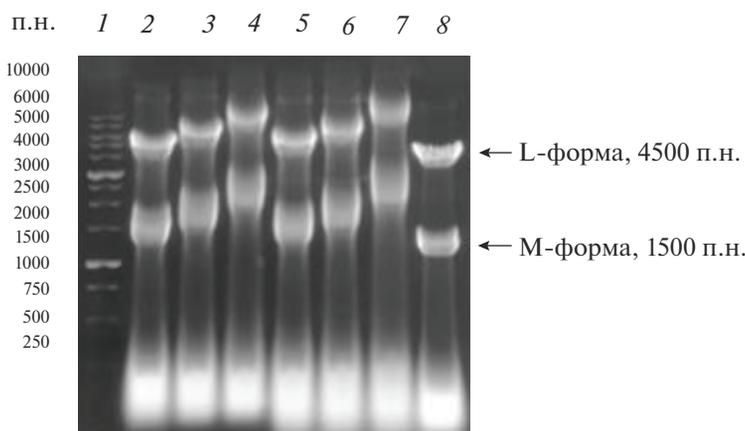


Рис. 1. Электрофореграмма образцов интраназальной формы препаратов, содержащих дцРНК и ИФН в составе молекулярных конструкций. На дорожки нанесены следующие образцы: 1 – ДНК маркер 1 Кб (ООО “СибЭнзим”); 2 – дцРНК и ИФН- α 2b (состав 1 – 10 МЕ ИФН/доза); 3 – дцРНК и ИФН- α 2b (состав 2 – 50 МЕ ИФН/доза); 4 – дцРНК и ИФН- α 2b (состав 3 – 100 МЕ ИФН/доза); 5 – дцРНК и ИФН- γ (состав 1 – 10 МЕ ИФН/доза); 6 – дцРНК и ИФН- γ (состав 2 – 50 МЕ ИФН/доза); 7 – дцРНК и ИФН- γ (состав 3 – 100 МЕ ИФН/доза); 8 – субстанция дцРНК (50 мкг/дорожка, контроль).

Fig. 1. Electropherogram of intranasal preparations containing dsRNA and IFN as a part of molecular constructs. 1 – DNA marker 1 Kb (SibEnzyme Ltd., Russia); 2 – dsRNA and IFN- α 2b (formulation 1 – 10 IU IFN/dose); 3 – dsRNA and IFN- α 2b (formulation 2 – 50 IU IFN/dose); 4 – dsRNA and IFN- α 2b (formulation 3 – 100 IU IFN/dose); 5 – dsRNA and IFN- γ (formulation 1 – 10 IU IFN/dose); 6 – dsRNA and IFN- γ (formulation 2 – 50 IU IFN/dose); 7 – dsRNA and IFN- γ (formulation 3 – 100 IU IFN/dose); 8 – dsRNA substance (50 μg /lane, control).

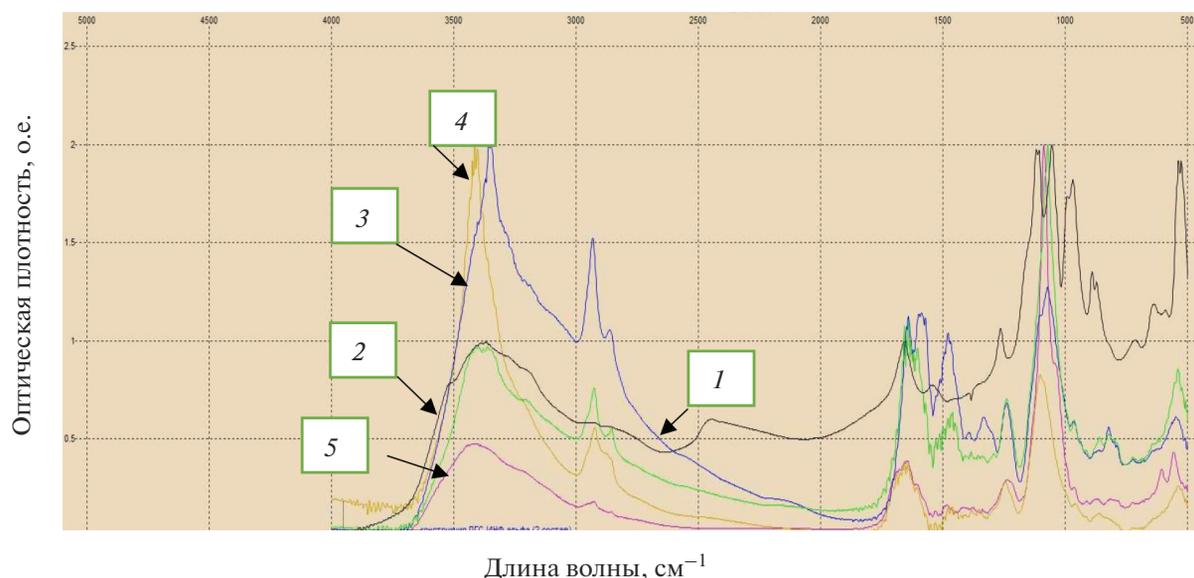


Рис. 2. ИК-спектры дцРНК и ИФН- α 2b по отдельности и в составе интраназальных препаратов. 1 – ИФН- α 2b; 2 – конструкция дцРНК–ИФН- α 2b (состав 1); 3 – конструкция дцРНК–ИФН- α 2b (состав 2); 4 – конструкция дцРНК–ИФН- α 2b (состав 3); 5 – дцРНК.

Fig. 2. IR spectra of dsRNA and IFN- α 2b separately and in composition of intranasal preparations. 1 – IFN- α 2b; 2 – dsRNA–IFN- α 2b construct (formulation 1); 3 – dsRNA–IFN- α 2b construct (formulation 2); 4 – dsRNA–IFN- α 2b construct (formulation 3); 5 – dsRNA.

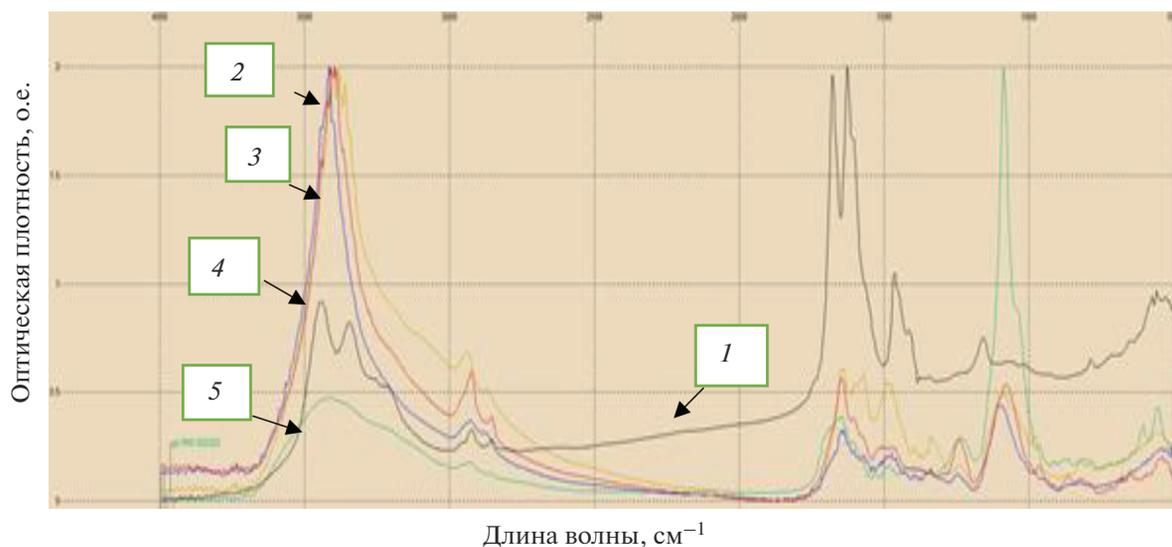


Рис. 3. ИК-спектры дцРНК и ИФН- γ по отдельности и в составе интраназальных препаратов. 1 – ИФН- γ ; 2 – конструкция дцРНК–ИФН- γ (состав 1); 3 – конструкция дцРНК–ИФН- γ (состав 2); 4 – конструкция дцРНК–ИФН- γ (состав 3); 5 – дцРНК.

Fig. 3. IR spectra of dsRNA and IFN- α 2b separately and in composition of intranasal preparations. 1 – IFN- γ ; 2 – dsRNA–IFN- γ construct (formulation 1); 3 – dsRNA–IFN- γ construct (formulation 2); 4 – dsRNA–IFN- γ construct (formulation 3); 5 – dsRNA.

ций, так и композиций более устойчива к действию рибонуклеазы, чем при нахождении в свободной форме. Из данных, представленных на рис. 4, видно, что L- и M-формы дцРНК в составе субстанции полностью деградируют в течение

5 мин после добавления РНКзы даже в минимальной концентрации (0.03 U). В тоже время в образцах конструкций для интраназального применения дцРНК сохранялась более 5 мин после обработки ферментом в дозе 0.1 U, хотя первые при-

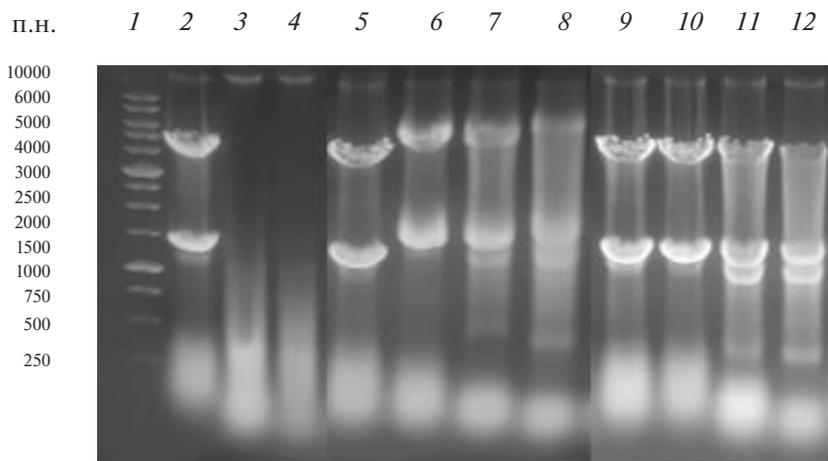


Рис. 4. Анализ устойчивости дцРНК в составе субстанции, интраназальной композиции и интраназальной конструкции к действию РНКазы. Обработку дцРНК-содержащих образцов проводили в течение 5 мин РНКазой в различных концентрациях. На дорожки 1%-ного агарозного геля нанесены следующие образцы: 1 – ДНК-маркер 1 Kb (ООО “СибЭнзим”); субстанция дцРНК, не обработанная РНКазой (2, 5, 9), и после инкубации с 0.03 U (3) и 0.1 U (4) РНКазы; интраназальная конструкция, содержащая дцРНК и ИФН- α 2b, не обработанная РНКазой (6), и после инкубации с 0.03 U (7) и 0.1 U (8) РНКазы; интраназальная композиция, содержащая дцРНК и ИФН- α 2b, не обработанная РНКазой (10), и после инкубации с 0.03 U (11) и 0.1 U (12) РНКазы.

Fig. 4. RNAase resistance of dsRNA as a part of substance, intranasal composition, and intranasal construct. The dsRNA-containing samples were exposed to RNAase in various concentrations for 5 min. Samples applied to 1% agarose gel: 1 – DNA marker 1 Kb (SibEnzyme Ltd.); dsRNA substance without exposure to RNAase (2, 5, 9) and after incubation with RNAase, 0.03 U (3) and 0.1 U (4); intranasal construct containing dsRNA and IFN- α 2b without exposure to RNAase (6) and after incubation with RNAase, 0.03 U (7) and 0.1 U (8); intranasal composition containing dsRNA and IFN- α 2b without exposure to RNAase (10) and after incubation with RNAase, 0.03 U (11) and 0.1 U (12).

знаки деградации М-формы были отмечены и в этом случае (рис. 4). Значимых отличий в степени устойчивости дцРНК в составе конструкций и композиций не выявлено. Следовательно, можно заключить, что вспомогательные компоненты, входящие в состав интраназальных препаратов, ослабляли гидролитическую активность РНКазы в отношении дцРНК.

Определение противовирусной активности препаратов конструкций, содержащих дцРНК и ИФН, в сравнении с исходной дцРНК и композициями дцРНК и ИФН проводили в культуре мышечных фибробластов L929, инфицированных EMCV. Из данных, приведенных в табл. 2, видно, что по сравнению с субстанцией противовирусная активность дцРНК в составе конструкции с ИФН- α 2b (100 МЕ/доза) была значимо выше. Аналогичные изменения регистрировали при анализе противовирусной активности препаратов, содержащих ИФН- γ . Существенных различий в активности конструкций, содержащих ИФН- α 2b или ИФН- γ , как и в случае композиций, не выявлено.

В ходе исследования, проведенного на культуре эмбриональных клеток легкого человека L-68, продемонстрировано дозозависимое повышение противовирусной активности ИФН в составе молекулярных конструкций. Как видно из результатов, представленных в табл. 3, молекулярная конструкция, содержащая ИФН- α 2b, была более ак-

тивной по сравнению с содержащей ИФН- γ в эквивалентных дозах. При анализе композиций получены аналогичные данные.

Обращает на себя внимание тот факт, что EMCV-противовирусная активность конструкций в культуре клеток мышечных фибробластов L929 была выше, чем соответствующих композиций (см. табл. 2), в то время как в клетках L-68 человека – практически одинаковой. В соответствии с дизайном эксперимента, в культуре L929 оценивали противовирусную активность сывороток мышей, которым вводили композиционные препараты дцРНК и ИФН. Следовательно, эти сыворотки содержали как индуцированный препаратом мышечный ИФН, так и введенный животному человеческий ИФН. В культуре клеток L-68 определяли активность непосредственно самих препаратов. Учитывая сведения о видоспецифичности ИФН [23], можно говорить о том, что противовирусная активность на клетках L929 обусловлена преимущественно индуцированным мышечным ИФН, а на клетках L-68 – человеческим ИФН. Из этого логично предположить, что молекулярная конструкция обеспечивает в основном стабилизацию дцРНК.

Таким образом, по сравнению с индивидуальными компонентами образцы интраназальной формы препаратов, содержащих дцРНК и ИФН- α 2b/ИФН- γ в составе молекулярных конструкций, были более устойчивы к деградации и

Таблица 2. Противовирусная активность интраназальных композиционных препаратов дцРНК с разным содержанием ИФН в EMCV-инфицированной культуре клеток L929**Table 2.** Antiviral activity of intranasal dsRNA preparations with different IFN concentrations in the EMCV-infected L929 cell culture

Препарат	Противовирусная активность ^a , log ₂ ИЕ ₅₀			
	[ИФН], МЕ/доза			
	0	10	50	100
Конструкция дцРНК–ИФН-α2b	10.07 ± 0.32	9.87 ± 0.27	10.47 ± 0.36	11.97 ± 0.36 ^b p = 0.0005 ^c p = 0.0001 ^d p = 0.0064
Конструкция дцРНК–ИФН-γ		9.77 ± 0.18	11.02 ± 0.31 ^c p = 0.0021	12.17 ± 0.22 ^b p = 0.00004 ^c p = 0.000003 ^d p = 0.0077
Композиция дцРНК + ИФН-α2b		9.90 ± 0.32	10.43 ± 0.33	11.05 ± 0.32 ^b p = 0.0406
Композиция дцРНК + ИФН-γ		9.72 ± 0.30	10.52 ± 0.26	11.02 ± 0.29 ^c p = 0.0028

Примечание: ^a Данные представлены в виде среднего арифметического (M) ± ошибка среднего арифметического (m); объем выборки – n = 20. Противовирусную активность оценивали по титру интерферона, который определяли как величину, обратную разведению сыворотки крови мышей, защищавшему 50% клеток L929 от цитотоксического действия 100 ЦПД₅₀ EMCV, и выражали в интерфероновых единицах (ИЕ₅₀). Достоверность межгрупповых различий, определенная по критерию Манна–Уитни: ^b отличие от группы с [ИФН] = 0; ^c отличие от группы с [ИФН] = 10 МЕ/доза; ^d отличие от группы с [ИФН] = 50 МЕ/доза.

Note: ^aData are presented as the arithmetic mean (M) ± the error of the arithmetic mean (m); n = 20. Antiviral activity was assessed by interferon titer, which was determined as the inverse of the mouse blood serum dilution that protected 50% of L929 cells from the cytotoxic effect of 100 CPE₅₀ EMCV, and expressed in interferon units (IU₅₀). The reliability of the intergroup differences was determined by the Mann–Whitney U-test: ^b difference from group with [IFN] = 0; ^c difference from group with [IFN] = 10 IU/dose; ^d difference from group with [IFN] = 50 IU/dose.

Таблица 3. Противовирусная активность интраназальных композиционных препаратов дцРНК с разным содержанием ИФН в культуре клеток L-68**Table 3.** Antiviral activity of intranasal dsRNA preparations with different IFN content in the EMCV-infected L-68 cell culture

Препарат	Противовирусная активность ^a , log ₂ ИЕ ₅₀		
	[ИФН], МЕ/доза		
	10	50	100
Конструкция дцРНК–ИФН-α2b	11.65 ± 0.33	11.99 ± 0.88	13.07 ± 0.22
Конструкция дцРНК–ИФН-γ	10.82 ± 0.29	11.32 ± 0	11.32 ± 0.41
Композиция дцРНК + ИФН-α2b	10.99 ± 0.66	12.07 ± 0.48	12.57 ± 0.85
Композиция дцРНК + ИФН-γ	10.07 ± 0.25	11.07 ± 0.63	11.99 ± 0.67

Примечание: ^a Данные представлены в виде M ± m; n = 4.

Note: ^a Data are presented as M ± m; n = 4.

проявляли повышенную противовирусную активность в отношении EMCV *in vitro*. На основании полученных данных можно говорить о перспективности создания интраназальной формы лекарственных препаратов с использованием интерферона и дцРНК в составе средств доставки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора по теме ГЗ-38/21: “Разработка лекарственных средств для профилактики и лечения острых респираторных заболеваний”.

торных вирусных инфекций на основе интерферонов и их индукторов”.

ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Все эксперименты с животными проводили в соответствии с российскими и международными требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. Протокол-заявка утвержден Биоэтической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора (Протокол №1 от 15.01.2024).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Нестерова И.В.* Препараты интерферона альфа в клинической практике: когда и как. *Медицинский научно-практический портал Lvrach.ru*, 2017, 9, 17. <https://www.lvrach.ru/2017/9/15436809>
2. *Pierson T.C., Diamond M.S.* The continued emerging threat of flaviviruses. *Nat. Microbiol.*, 2020, 5(6), 796–812. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>
3. *Ike K., Uchida Y., Nakamura T. Imai S.* Induction of interferon-gamma (IFN- γ) and T helper 1 (Th1) immune response by bitter melon extract. *J. Vet. Med. Sci.*, 2005, 67(5), 521–524. <https://doi.org/10.1292/jvms.67.521>
4. *Ершов Ф.И., Кисилев О.И.* Интерфероны и их индукторы (от молекулы до лекарств). Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2005, 368 с.
5. *Ершов Ф.И., Шульдяков А.А., Романцов М.Г., Ляпина Е.П., Соболева Л.А.* Результаты и перспективы использования индукторов интерферона в лечении инфекционных болезней. *Вестник РАМН*, 2013, 68(10), 46–52. <https://doi.org/10.15690/vramn.v68i10.788>
6. *Порфирьева Н.Н., Семин И.И., Мустафин Р.И., Хуторянский В.В.* Интраназальное введение как способ доставки лекарств в головной мозг (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*, 2021, 10(4), 117–127. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-117-127>
7. *Ichinohe T., Kawaguchi A., Tamura S.-I., Takahashi H., Sawa H., Ninomiya A., Imai M., Itamura S., Odagiri T., Tashiro M., Chiba J., Sata T., Kurata T., Hasegawa H.* Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C₁₂U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes Infect.*, 2007, 9(11), 1333–1340. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.06.007>
8. *Mangan N.E., Fung K.Y.* Type I interferons in regulation of mucosal immunity. *Immunol. Cell Biol.*, 2012, 90(5), 510–519. <https://doi.org/10.1038/icb.2012.13>
9. *Иванова О.С., Левагина Г.М., Скарнович М.О., Скарнович М.А., Шишкина Л.Н., Гамалей С.Г., Даниленко Е.Д.* Получение и характеристика препарата дуспиральной РНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для интраназального применения. *Биофармацевтический журнал*, 2019, 11(4), 29–33.
10. *Иванова О.С., Левагина Г.М., Башкина Е.С., Усова С.В., Телегина Ю.В., Гамалей С.Г., Ломзов А.А., Даниленко Е.Д.* Лекарственные средства для интраназального применения на основе интерферонов и их индуктора: получение и исследование свойств. *Биофармацевтический журнал*, 2023, 15(4), 32–44. <https://doi.org/10.30906/2073-8099-2023-15-4-14-2011>
11. *Gu F., Younes H.M., El-Kadi A.O., Neufeld R.J., Amsden B.G.* Sustained interferon- γ delivery from a photocrosslinked biodegradable elastomer. *J. Control. Release*, 2005, 102(3), 607–617. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.10.020>
12. *Никитин И.Г.* Пегилированные интерфероны-альфа: новые возможности лечения хронического гепатита С. *Фарматека*, 2002, 9. <https://pharmateca.ru/ru/archive/article/5723>
13. *Левагина Г.М., Аликин Ю.С., Масычева В.И., Даниленко Е.Д., Факина В.А., Игнатъев Г.М.* Индуктор интерферона пролонгированного действия. *Патент RU2172631*, опубл. 27.08.2001.
14. *Сизов А.А., Лебедев Л.Р., Масычева В.И., Даниленко Е.Д.* Молекулярный вектор для доставки генов в клетки-мишени. *Патент RU2190018*, опубл. 27.09.2002.
15. *Гамалей С.Г., Батенева А.В., Сысоева Г.М., Даниленко Е.Д., Лебедев Л.Р., Масычева В.И.* Фармакокинетика и противоопухолевые свойства препарата, содержащего ФНО- α в составе наночастиц. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2010, 149(3), 296–299.
16. *Коровина О.С., Корнеев Д.В., Левагина Г.М., Богрянцева М.П., Масычева В.И.* Исследование физико-химических свойств нового препарата дельтаферона в составе молекулярной конструкции. *Биотехнология*, 2012, 2, 73–77.
17. *Коровина О.С., Гамалей С.Г., Батенева А.В., Корнеев Д.В., Медикова Л.Д., Левагина Г.М., Даниленко Е.Д., Богрянцева М.П.* Иммуномодулирующие свойства наноконструкции, несущей аналог интерферона гамма. *Вестник уральской медицинской академической науки*, 2010, 2/1(29), 40.
18. *ОФС.1.7.2.0002.15* Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток. *Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV издание*, 2018, 2, 2740–2749. <https://femb.ru/record/pharmascope14>
19. *Сысоева Г.М., Лебедев Л.Р., Батенева А.В., Гамалей С.Г., Скарнович М.О., Скарнович М.А., Шишкина Л.Н., Даниленко Е.Д.* Иммуномодулирующие и противовирусные свойства композиционного препарата дуспиральной РНК и интерферона альфа. *Сб. тезисов: Региональная научно-практическая конференция, посвященная 95-летию со дня образования Госсанэпидслужбы России: “Обеспечение эпидемиологического благополучия в современных условиях”*, Новосибирск, 2017, 201–207.

20. Гамалей С.Г., Батенева А.В., Шишкина Л.Н., Скарнович М.О., Медикова Л.Д., Богрянцева М.П., Иванова О.С., Левагина Г.М., Даниленко Е.Д. Интерферон-индуцирующая и противовирусная активность препарата на основе аналога интерферона-гамма и индуктора интерферона. *Медицинская иммунология*, 2017, 19(SV), 378.
21. Ашмарин И.П., Мюльберг А.А., Садикова Н.В., Сытинский И.А. *Химия белка. Учебное пособие для университетов, ч. 1*. Ленинград: Изд-во Ленинградского университета, 1968.
22. Johnston M.I., Stollar B.D., Torrence P.F., Witkop B. Structural features of double-stranded polyribonucleotides required for immunological specificity and interferon induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, 72(11), 4564–4568.
<https://doi.org/10.1073/pnas.72.11.4564>
23. de Weerd N.A., Kurowska A.K., Mendoza J.L., Schreiber G. Structure-function of type I and III interferons. *Curr. Opin. Immunol.*, 2024, 86, 102413.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2024.102413>

Development of Antiviral Drugs for Intranasal Administration Based on Double-Stranded RNA and Recombinant Interferons

O. S. Ivanova^{a, #}, G. M. Levagina^a, Y. V. Telegina^a, S. V. Usova^a,
E. S. Bashkina^a, S. G. Gamaley^a, and E. D. Danilenko^a

^aState Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk oblast”, 630559 Russia

[#]e-mail: ivanova_os@vector.nsc.ru

Abstract—Intranasal preparations containing double-stranded RNA (dsRNA) and interferon- α 2b (IFN- α 2b) or IFN- γ as a part of molecular constructs were more resistant to enzymatic degradation than as individual components. The antiviral activity of dsRNA in mouse fibroblast L929 cells infected with murine encephalomyocarditis virus (EMCV) was increased when IFN was introduced into the construct compared with that for the dsRNA substance alone. An increase in the anti-EMCV activity of the drug was observed with increasing IFN content of the construct. A dose-dependent increase in antiviral activity of IFN incorporated in the molecular constructs was shown against EMCV-infected human embryonic lung cells L-68. The data obtained confirm the prospects for the development of new drugs, the delivery system of which includes IFN and dsRNA, for intranasal administration as prophylactic and therapeutic agents against influenza and other acute respiratory viral infections.

Keywords: double-stranded RNA, recombinant interferon, molecular structure, intranasal form, enzymatic resistance, antiviral activity, delivery system