

УДК 578.282

Новое бисульфитное производное окисленного β -циклодекстрина эффективно ингибирует инфекцию, вызванную вирусом гриппа A *in vitro* и *in vivo*

Е. П. Гончарова¹, Я. А. Костыро², А. В. Иванов², М. А. Зенкова¹¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Россия, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8²Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, 664033, Россия, Иркутск, ул. Фаворского, 1

*E-mail: egn@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 25.04.2019

Принята к печати 15.07.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-20-30

РЕФЕРАТ Разработка противогриппозных препаратов представляет актуальную и важную задачу. Ранее проведенные исследования показали, что соединения на основе сульфопроизводных олиго- и полисахаридов обладают высокой противовирусной активностью. Нами изучены перспективы использования нового бисульфитного производного окисленного β -циклодекстрина (соединение KS-6469) для подавления репликации вируса гриппа A/WSN/33 (H1N1) *in vitro* и *in vivo*. Противовирусный потенциал KS-6469 *in vitro* оценивали в культуре клеток МДСК, инфицированных вирусом. Показано, что инкубация инфицированных клеток в присутствии соединения KS-6469 в течение 48 ч приводит к полному подавлению репродукции вируса. Терапевтическая эффективность KS-6469 проверена на модели гриппозной пневмонии у мышей линии BALB/c. Двукратное интраназальное введение KS-6469 обеспечивало полную защиту животных от заражения вирусом, что сопровождалось значительным снижением титров вируса гриппа в легких инфицированных животных. Таким образом, новое бисульфитное производное β -циклодекстрина KS-6469 обладает выраженной противовирусной активностью и эффективно подавляет развитие гриппозной инфекции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вирус гриппа, противовирусная активность, сульфированное производное β -циклодекстрина.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВГ – вирус гриппа; ДМСО – диметилсульфоксид; ИМДМ – среда Искова МДМ; МВЦД – метил- β -циклодекстрин; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид; МОИ – множественность заражения; МЭК – минимально эффективная концентрация; МПК – максимально переносимая концентрация; РГА – реакция гемагглютинации; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; ФОЕ – фокус-образующие единицы; ХТИ – химиотерапевтический индекс; НА – гемагглютинин; IC₅₀ – концентрация соединения, приводящая к гибели 50% клеток; СИ – клеточный индекс; НА – нейраминидаза.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус гриппа (ВГ) вызывает развитие респираторных заболеваний, в результате которых ежегодно умирает до 500 000 человек [1]. Возникновение новых лекарственно устойчивых штаммов вируса гриппа и недостаточная эффективность существующих вакцин делают необходимой разработку новых, более эффективных противовирусных соединений для борьбы с этим вирусом.

Одними из наиболее перспективных противовирусных соединений являются сульфопроизводные

углеводов. Эта группа соединений включает сульфопроизводные олиго- и полисахаридов, содержащих О-сульфатные и/или N-сульфонатные группы. Противовирусные свойства сульфопроизводных углеводов известны давно. Гинзберг и соавт. исследовали антивирусные свойства капсульного полисахарида *Klebsiella pneumoniae* и показали, что этот полисахарид эффективно подавляет репликацию вируса эпидемического паротита [2]. Сообщалось, что сульфатированные полисахариды, включая β -циклодекстрин, обладают противовирусной ак-

тивностью в отношении целого ряда вирусов [3–7]. Имеются данные о том, что сульфопроизводные олиго- и полисахаридов, содержащих О-сульфатные группы, обладают высокой противовирусной активностью [8–11]. Показано, что синтетические полимеры N-сульфонатных производных эффективно ингибируют вирус гриппа А *in vitro* и *ex vivo*, действуя главным образом на поздних стадиях развития инфекции [12]. Примечательно, что йота-каррагинан – сульфатированный полисахарид, протестирован клинически, разрешен к выпуску и продается в некоторых странах для интраназального применения при гриппозной инфекции [13]. Однако данные об антивирусной активности сульфопроизводных углеводов, содержащих сульфатные группировки (С-сульфаты), отсутствуют.

Нами изучены противовирусные свойства сульфонированного (С-сульфат) олигосахаридов – бисульфитного производного окисленного β-циклодекстрина KS-6469 в отношении вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1) (ВГ) *in vitro* и *in vivo*. Показано, что KS-6469 эффективно ингибирует репликацию ВГ в клетках МДСК, действуя на поздних стадиях инфекции, и обладает вирулицидными свойствами. Результаты лечения гриппозной пневмонии у мышей подтвердили высокий антивирусный потенциал этого соединения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез соединения KS-6469

Соединение KS-6469 было разработано и синтезировано в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (патент РФ 2635765, 2017) на основе коммерчески доступного β-циклодекстрина (KLEPTOSE®, Бельгия). Подробное описание процедуры синтеза и физико-химических свойств KS-6469 будет опубликовано отдельно. Коммерчески доступный осельтамивир (Тамифлю®, Швейцария) готовили в виде раствора в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) для перорального введения.

Цитотоксическое действие KS-6469 в культуре клеток МДСК

МТТ-анализ. Цитотоксичность KS-6469 оценивали с использованием теста 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ-тест) как описано ранее [14]. Клетки МДСК получены из коллекции клеточных культур Института цитологии (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде Искова МДМ (ИМДМ) (Sigma, США) с добавлением 5% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Sigma, США), 100 Ед/мл пеницил-

лина, 100 мг/мл стрептомицина и 0.25 мг/мл амфотерицина (антибиотик-антимикотический раствор, Sigma, США) при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂ (стандартные условия). Клетки МДСК высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали в стандартных условиях до формирования полного монослоя. Затем питательную среду заменяли свежей средой, содержащей KS-6469 в различных концентрациях, и клетки инкубировали в течение 24 ч в стандартных условиях. Аликвоты раствора МТТ добавляли в каждую лунку, инкубировали в течение 3 ч, затем кристаллы формазана солибилизировали диметилсульфоксидом (ДМСО) и измеряли оптическую плотность при 570 нм с использованием ридера Multiskan™ FC (Thermo LabSystems, Финляндия). Концентрацию соединения, приводящую к гибели 50% клеток (IC₅₀), определяли как концентрацию, необходимую для снижения значения оптической плотности до 50% от контроля (только ДМСО).

Анализ цитотоксичности KS-6469 в реальном времени. Цитотоксическое действие KS-6469 на клетки МДСК измеряли с помощью технологии микроэлектронного биосенсора на приборе xCELLigence Real-Time (ACEA Biosciences Inc., США). Клеточный индекс (CI) рассчитывается автоматически на основании изменения параметров сопротивления при взаимодействии обработанных и необработанных клеток с электродами на микроэлектронных планшетах (Е-планшеты). Клетки высевали в Е-планшеты (ACEA Bioscience Inc., США) в среде ИМДМ и инкубировали в течение ночи (20 ч) в стандартных условиях. Затем питательную среду удаляли, клетки промывали ФСБ и в каждую лунку добавляли 150 мкл среды ИМДМ, содержащей различные концентрации KS-6469 или среду (контроль). Клетки инкубировали в стандартных условиях в течение 65 ч, а жизнеспособность клеток контролировали каждые 15 мин с использованием анализатора xCELLigence Real-Time. Эксперименты повторяли 2 раза, а концентрацию соединения, приводящую к гибели 50% клеток (IC₅₀), рассчитывали с использованием программного обеспечения xCELLigence Real-Time Cell Analyzer. Максимальную концентрацию соединения, при которой график изменения CI совпадал с графиком CI для необработанных клеток, т.е. не оказывающую на клетки токсичного действия, принимали за максимально переносимую концентрацию (МПК).

Изучение противовирусной активности KS-6469 в культуре клеток МДСК

Штамм вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1) был получен в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского.

Клетки МДСК выращивали в стандартных условиях в 24-луночных планшетах до формирования полного монослоя. Затем клетки инфицировали ВГ при множественности заражения (МОИ) 0.1 в среде ИМДМ, содержащей KS-6469 (70–600 мкг/мл), и инкубировали при 37°C в течение 24 или 48 ч в стандартных условиях. Через 24 или 48 ч клетки подвергали одному циклу замораживания/оттаивания (-20/20°C), а затем определяли титр вируса с использованием метода оценки титра вируса по количеству фокус-образующих единиц (ФОЕ/мл), описанному ранее [15]. Основными критериями оценки эффективности препаратов *in vitro* были следующие показатели: коэффициент ингибирования (Ки, %) и химиотерапевтический индекс (ХТИ). Снижение уровня накопления вируса под влиянием соединения определяли по формуле:

$$K_{и} = (T_{к} - T_{о}) / T_{к} \times 100\%,$$

где $T_{к}$ – уровень накопления вируса при культивировании без внесения в среду изучаемого соединения (ФОЕ/мл); $T_{о}$ – уровень накопления вируса при культивировании с внесением в питательную среду изучаемого соединения (ФОЕ/мл) [16]. За величину ХТИ препарата принимали соотношение $X_{ТИ} = M_{ПК} / M_{ЭК}$, где МЭК – минимально эффективная концентрация соединения, снижающая титр вируса не менее чем на 2 lg ФОЕ/мл [17].

Метод Time-of-addition

Для более точной оценки влияния KS-6469 на различные стадии жизненного цикла ВГ клетки МДСК выращивали до формирования полного монослоя в 24-луночных планшетах в стандартных условиях и инфицировали ВГ (МОИ 0.1) в течение 1 ч. После каждого периода инкубации с ВГ клетки промывали ФСБ и добавляли соединение KS-6469 в концентрации 5 мг/мл в разные промежутки времени до или после инфицирования клеток ВГ. Через 48 ч клетки подвергали одному циклу замораживания/оттаивания и определяли титр вируса.

Анализ активности нейраминидазы ВГ

Активность нейраминидазы ВГ (НА) измеряли с использованием набора для анализа функциональной активности нейраминидазы гриппа NA-Fluor™ (Applied Biosystems, США) в соответствии с протоколом производителя. Анализ основан на измерении активности НА, расщепляющей субстрат 2'-(4-метилумбеллиферил)- α -D-N-ацетилнейраминовой кислоты (MUNANA) с высвобождением флуоресцентного продукта 4-метилумбеллиферона. Флуоресцентный сигнал

измеряли с использованием флуоресцентного ридера CLARIOstar® (BMG LABTECH, Германия). Эксперименты выполняли в трех повторах.

Анализ гемагглютинирующей активности вируса

Противовирусную активность соединения KS-6469 исследовали по ингибированию инфекционного титра вируса в реакции гемагглютинации (РГА). Результаты оценивали, сравнивая значения титра вируса после инкубации ВГ с KS-6469 в различных концентрациях. В РГА использовали 0.5% взвесь эритроцитов цыпленка. За титр вируса принимали величину, противоположную значению наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную РГА.

Анализ содержания холестерина

Концентрацию холестерина в вирусных оболочках определяли с использованием набора Amplex Red Cholesterol (Molecular Probes, США) в соответствии с инструкциями производителя. ВГ инкубировали с KS-6469 в различных концентрациях в течение 6 ч при 37°C, затем осаждали и ресуспендировали в реакционном буфере Amplex Red. Метил- β -циклодекстрин (М β ЦД) использовали в качестве положительного контроля. Затем уровень флуоресценции анализировали на ридере CLARIOstar®, используя длину волны возбуждения 550 нм и длину волны излучения 590 нм. Эксперименты были выполнены в трех повторах.

Изучение вирулицидной активности KS-6469

ВГ инкубировали с равным объемом среды, содержащей различные концентрации KS-6469, в течение 3 или 6 ч при 4, 20 или 37°C. В качестве контроля ВГ инкубировали с равным объемом среды, не содержащей KS-6469. Титр вируса оценивали методом ФОЕ. Эксперименты выполняли в трех повторах

Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ проводили с использованием коммерчески доступных моноклональных антител, связывающихся с гемагглютинином ВГ (H1N1) [IVC102], [1.B.408] и [B219M] (Abcam), как описано ранее [18].

Изучение эффективности применения KS-6469 на модели гриппозной пневмонии мышей

Лабораторные животные. Самки мышей BALB/c в возрасте от 4 до 6 недель приобретены в Государственном научно-исследовательском центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово, Российская Федерация). Животных со-

держали в виварии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН с режимом естественного освещения на стандартном рационе для лабораторных животных (ГОСТ Р 5025892) в соответствии с международными рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях [19], а также правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований в российских государственных стандартах (Р 51000.3-96 и 51000.4-96). Протоколы экспериментов утверждены Межведомственной комиссией по биоэтике СО РАН (22.11 от 30.05.2014 г.).

Токсичность KS-6469 для мышей. Токсичность KS-6469 для мышей оценивали при внутрибрюшинном и интраназальном введении соединения. Каждая из экспериментальных групп содержала шесть мышей BALB/c. Две группы мышей получали KS-6469 внутрибрюшинно однократно в дозе 250 или 500 мг/кг в 0.2 мл ФСБ. Две другие группы животных получали KS-6469 интраназально, однократно или двукратно с интервалом в 1 день, в дозе 250 мг/кг в объеме 40 мкл. Мыши контрольных групп получали ФСБ по аналогичной схеме. После инъекции или интраназального введения признаки интоксикации, такие, как общее состояние, вес и депрессия центральной нервной системы, оценивали ежедневно в течение 14 дней.

Протективная активность соединения KS-6469. Протективное действие соединения KS-6469 оценивали по динамике падения массы тела, выживаемости мышей после заражения и репродукции вируса в легких. Мыши BALB/c были разделены на группы по шесть животных. Мышей анестезировали путем внутрибрюшинной инъекции трибромэтанола (Avertin®). Мышей инфицировали интраназально вирусом в дозе 3 ЛД₅₀, эквивалентной $1.2 \times 10^4 \pm 0.7 \times 10^4$ ФОЕ ($p < 0.05$), в объеме 30 мкл сразу после интраназального введения KS-6469 в дозе 250 мг/кг в объеме 30 мкл. На следующий день мыши получали интраназально такую же дозу KS-6469. В качестве положительного контроля группа мышей получала перорально осельтамивир ежедневно (7.5 мг/кг) в течение 5 дней после заражения. Мыши из контрольной группы без лечения получали ФСБ по аналогичной схеме (отрицательный контроль). Животных осматривали и взвешивали ежедневно в течение 14 дней после заражения. Для оценки репродукции ВГ в легких мышам BALB/c ($n = 6$) интраназально вводили KS-6469 в различных дозах и инфицировали дозой вируса 3 ЛД₅₀. На следующий день мыши получали такую же

дозу KS-6469 интраназально. Мыши из контрольной группы получали ФСБ по аналогичной схеме. Мышей в каждой группе подвергали эвтаназии через 72 ч после заражения и извлекали легкие. Легкие гомогенизировали с использованием ультразвукового гомогенизатора Sonopuls HD 2070 (Bandelin, Германия). Титр вируса в гомогенатах легких определяли методом ФОЕ.

Статистический анализ

Данные выражали как среднее значение \pm стандартное отклонение. Статистический анализ проводили с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента. Значения *p* менее 0.05 считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика KS-6469

KS-6469 представляет собой бисульфитное производное окисленного олигосахарида (β -циклодекстрина), имеющее в своем составе сульфонатные группировки, связанные непосредственно с атомом углерода (С-сульфаты), общей формулой $[(\text{Glu}_{\text{ox}})_7\text{-C}_x]\text{-(SO}_3\text{Na)}_x$, где $[(\text{Glu}_{\text{ox}})_7\text{-C}_x]$ – окисленный β -циклодекстрин, *x* – количество сульфированных атомов углерода, SO₃R – бисульфитная (сульфонатная) группировка. Структура и физико-химические свойства KS-6469 являются предметом дальнейших исследований и будут опубликованы позже.

Изучение цитотоксического действия KS-6469

Цитотоксические свойства KS-6469 в отношении клеток линии МДСК изучали с помощью МТТ-теста и анализа состояния клеток в реальном времени, позволяющего регистрировать токсическое действие соединений в динамике. По данным МТТ-теста концентрация KS-6469, при которой выживает 50% клеток в популяции, через 24 ч экспозиции = 15 ± 3.3 мг/мл (рис. 1А). Исследование цитотоксического действия изучаемого соединения при более длительном его воздействии на клетки (в течение 65 ч) с использованием анализатора клеток xCELLigence показало, что в этом случае IC₅₀ равно 8.9 ± 1.3 мг/мл (рис. 1Б). Концентрация, не оказывающая на клетки токсического действия (МПК), составила 2.5 мг/мл. Другими словами, соединение KS-6469 обладает низкой токсичностью в отношении культуры клеток МДСК.

Изучение противовирусной активности KS-6469 в культуре клеток

Противовирусную активность KS-6469 оценивали, используя модель вирус гриппа А/WSN/33/ –

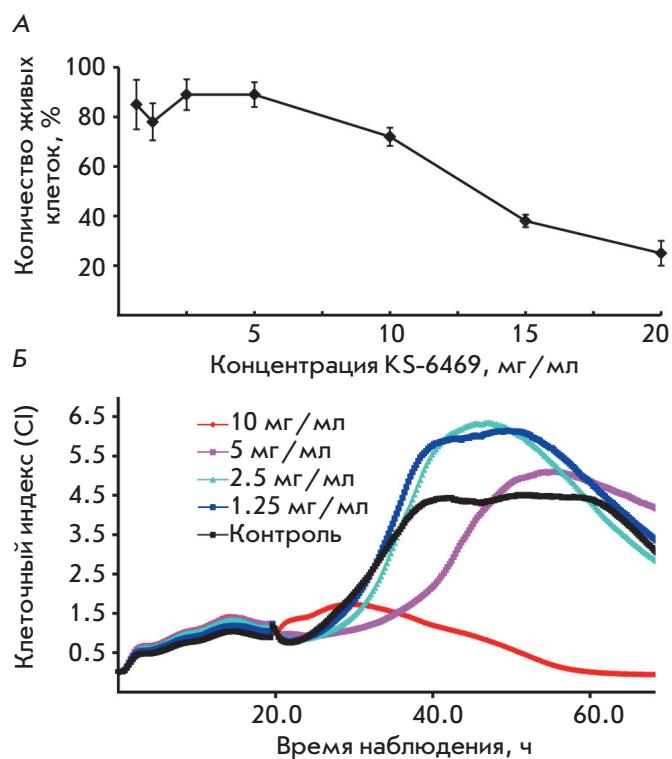


Рис. 1. Цитотоксичность KS-6469 в культуре клеток МДСК. Клетки МДСК инкубировали с различными концентрациями KS-6469 при 37°C с последующим измерением жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста (А) и с помощью технологии микроэлектронного биосенсора на приборе xCELLigence Real-Time в реальном времени (Б). Контроль – клетки, инкубированные в ИМДМ без KS-6469

клетки МДСК. Клетки МДСК одновременно инкубировали в присутствии различных концентраций KS-6469 и инфицировали вирусом при MOI 0.1. Количественная оценка титра вируса после его инкубации с соединением (рис. 2) в течение 24 ч выявила зависимое от концентрации снижение репликации вируса в диапазоне концентраций KS-6469 70–600 мкг/мл. При концентрации KS-6469 600 мкг/мл через 24 ч после заражения титр вируса был ниже порога чувствительности метода. При инкубации инфицированных ВГ клеток с соединением KS-6469 в концентрации 70 мкг/мл наблюдалось значительное снижение титра вируса $K_i = 75\%$ (60.0–80.2%) ($p < 0.05$). Следует отметить, что при концентрации KS-6469 600 мкг/мл наблюдалось полное подавление вирусной инфекции, так как мы не выявили репродукции вируса через 48 ч после заражения клеток. Таким образом, KS-6469, бисульфитное производное окисленного β -циклодекстрина, в концентрации выше 70 мкг/мл значительно снижает титр вируса при экспозиции и полностью подавляет

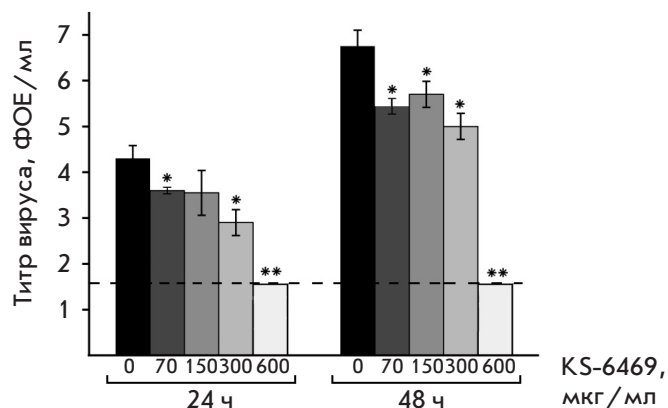


Рис. 2. KS-6469 эффективно ингибирует репродукцию вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1) в клетках МДСК. Инфицированные клетки МДСК инкубировали с различными концентрациями KS-6469. Продукцию инфекционных вирусных частиц определяли по методу ФОЕ через 24 и 48 ч. Предел чувствительности метода ФОЕ – 1.7 lg ФОЕ/мл, указан пунктирной линией. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ в сравнении с репродукцией вируса в необработанных клетках (0)

развитие инфекционного процесса при концентрации 600 мкг/мл. Результаты, полученные на модели *in vitro*, продемонстрировали высокую ингибирующую активность соединения KS-6469 в отношении ВГ. Необходимо отметить, что высокий химиотерапевтический индекс KS-6469, равный 8.3, свидетельствует о целесообразности дальнейшего изучения противовирусной активности этого соединения *in vivo*.

Для определения механизма ингибирования репродукции ВГ при инкубации с KS-6469 необходимо было установить, на какой стадии жизненного цикла вируса происходит подавление его репродукции. С этой целью был проведен эксперимент Time-of-addition, когда KS-6469 добавляли к клеткам на разных этапах развития вирусной инфекции. Во-первых, мы оценили, может ли KS-6469 при добавлении к клеткам до инфицирования вирусом защитить их от последующей инфекции. Клетки МДСК обрабатывали KS-6469 за 2 ч до заражения ВГ (от (-3) до (-1) ч) (рис. 3). Мы не обнаружили снижения титра вируса после предварительной инкубации клеток с KS-6469. Также не обнаружено снижения титра вируса при использовании KS-6469 на начальных стадиях инфекционного процесса в клетке ((-1)–0 ч) и на ранних стадиях репродукции вируса ((-1)–6 ч). Таким образом, показано, что соединение KS-6469 не влияет на ранние стадии репликации вируса, такие, как прикрепление вириона к клетке, проникновение в клетки-мишени. Ингибирование репродук-

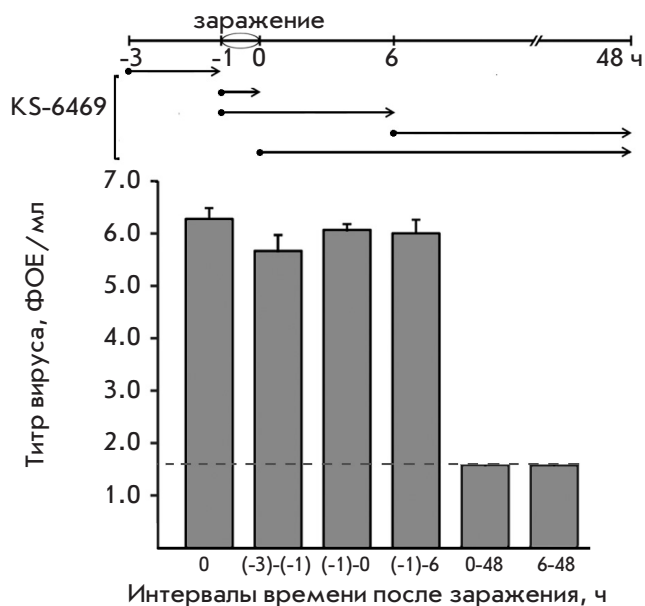


Рис. 3. Эксперимент Time-of-addition, показывающий механизм инактивации вируса гриппа под действием KS-6469. Клетки МДСК инфицировали ВГ при MOI 0.1 в течение 1 ч ((-1)–0 ч), затем в лунки добавляли 5 мг/мл KS-6469 в указанные моменты времени (·). После каждого периода инкубации (показано стрелками) среду, содержащую KS-6469, заменяли свежей средой, не содержащей соединения. Через 48 ч титр вируса оценивали по методу ФОЕ. Указаны средние значения ± S.D. (n = 3). Предел чувствительности метода ФОЕ – 1.7 lg ФОЕ/мл указан пунктирной линией

ции вируса наблюдалось только тогда, когда KS-6469 постоянно присутствовал в среде, начиная с момента заражения клеток (0–48 ч) или при добавлении соединения через 6 ч после заражения клеток (6–48 ч) (рис. 3).

Влияние KS-6469 на функциональную активность поверхностных белков оболочки ВГ

Проникновение вирусных частиц в клетку обеспечивается согласованной работой основных поверхностных белков оболочки вириона, гликопротеинов гемагглютинаина (НА) и нейраминидазы (НА). Изменения функциональной активности НА оценивали с использованием модельной системы связывания вирусных частиц с эритроцитами. Вирус гриппа инкубировали с KS-6469 (5 мг/мл) в течение 1 или 6 ч при 37 или 4°C, а затем титр вируса оценивали в РГА (табл. 1). Инкубация вируса с KS-6469 в течение 1 ч при 37°C приводила к снижению титра вируса в 4 раза, а после 6 ч инкубации титр вируса снижался

Таблица 1. Титр вируса гриппа в РГА после инкубации с KS-6469

Соединение	Титр вируса и условия инкубации			
	4°C		37°C	
	1 ч	6 ч	1 ч	6 ч
KS-6469, 5 мг/мл	64	32	16	4
ФСБ	64	64	64	64

в 16 раз (табл. 1). Интересно, что титр вируса снизился только в 2 раза после инкубации в течение 6 ч при 4°C в присутствии KS-6469 в той же концентрации. Снижение связывания гемагглютинаина вируса с эритроцитами предполагает возможное изменение конформации поверхностных эпитопов этого белка.

Способность KS-6469 влиять на структуру поверхностных эпитопов гемагглютинаина была проанализирована с использованием набора коммерчески доступных моноклональных антител к гемагглютину ВГ. Обработка вирионов ВГ KS-6469 (5 мг/мл) в течение 6 ч при 37°C, которая привела к 16-кратному снижению титра НА, не влияла на эффективность связывания НА с моноклональными антителами к НА вируса гриппа (рис. 4). Следует отметить, что процесс ингибирования функциональной активности НА вириона требует достаточно продолжительной инкубации с KS-6469 при температуре не менее 37°C, и мы наблюдали только частичную потерю функциональной активности НА после часовой экспозиции с KS-6469, что свидетельствует о сохранении инфекционных свойств вируса.

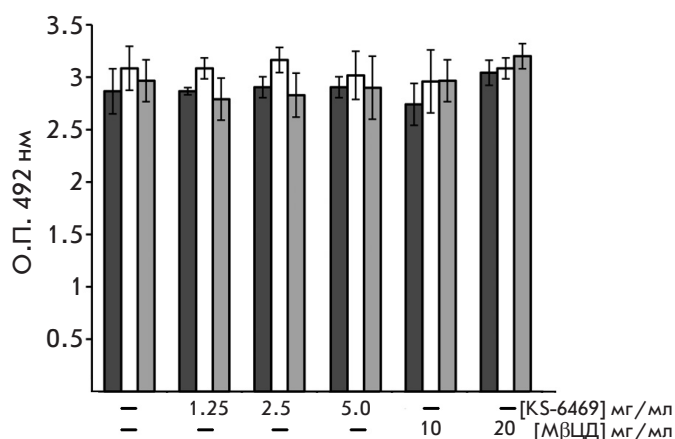


Рис. 4. Влияние KS-6469 на эффективность связывания вирусного НА с моноклональными антителами. Результаты представлены в О.П. ± S.D., где О.П. – оптическая плотность. Эксперимент проведен в трех повторах

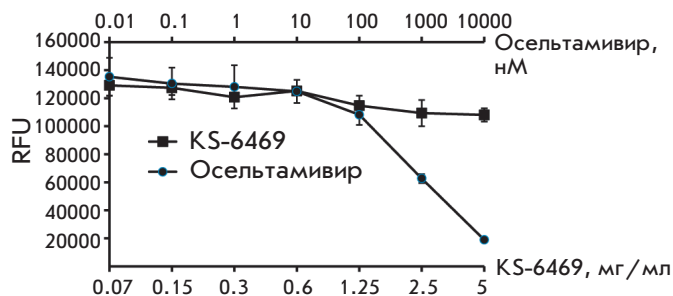


Рис. 5. Анализ активности NA. ВГ инкубировали с KS-6469 или осельтамивиром в течение 6 ч перед добавлением субстрата MUNANA, а затем инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Результаты представлены в RFU ± S.D., где RFU – relative fluorescence units. Эксперимент проведен в трех повторах

Далее мы изучили возможное ингибирование активности вирусной нейраминидазы при инкубации с KS-6469. Нейраминидаза препятствует агрегации вирусных частиц и обеспечивает их высвобождение из зараженной клетки. Полученные результаты (рис. 5) показали, что инкубация ВГ с KS-6469 (5 мг/мл) не меняет активность NA. Это свидетельствует о том, что NA не является мишенью для KS-6469. Учитывая, что механизм противовирусного действия другого производного β-циклодекстрина – метил-β-циклодекстрина (МВЦД), связан с удалением холестерина из липидной оболочки вирионов ВГ [20], мы проанализировали возможное изменение уровня холестерина в вирусной оболочке после обработки KS-6469. ВГ предварительно обрабатывали KS-6469 и МВЦД (положительный контроль) в различных концентрациях или оставляли без обработки (рис. 6). Снижение содержания холестерина в вирусной оболочке наблюдали только после инкубации ВГ с МВЦД, но не KS-6469. Следовательно, противовирусный эффект KS-6469 не связан с изменением содержания холестерина в вирусной оболочке. Таким образом, мы показали, что KS-6469 частично

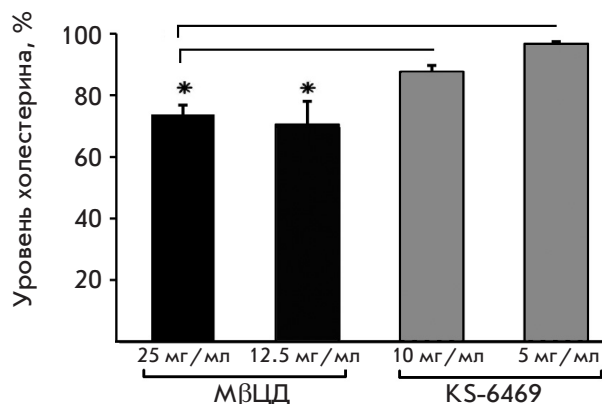


Рис. 6. Содержание холестерина в оболочке ВГ после обработки KS-6469 или МВЦД. ВГ инкубировали с различными концентрациями KS-6469 или МВЦД в течение 6 ч при 37°C, уровень холестерина определяли с использованием набора для анализа холестерина Amplex Red Cholesterol. Уровень холестерина в необработанном вирусе принимали за 100%. *p < 0.05. Эксперимент проведен в трех повторах

снижает гемагглютинирующую активность вируса, но не влияет на функциональную активность вирусной NA и не уменьшает содержания холестерина в вирусной оболочке.

Вирулицидные свойства KS-6469

Ранее было показано, что сульфатированные полисахариды обладают вирулицидной активностью [21, 22]. Нами изучена способность KS-6469 непосредственно инактивировать вирус гриппа. Инкубация ВГ с KS-6469 в концентрации 2.5 или 5 мг/мл в течение 3 ч при 37°C привела к полной потере инфекционных свойств вирусных частиц. Снижение концентрации KS-6469 до 1.25 мг/мл с последующей инкубацией вируса в тех же условиях (3 ч, 37°C) привело к снижению титра вируса на 2 lg ФОЕ/мл, а после инкубации в течение 6 ч инфекционные вирионы не были обнаружены (табл. 2). Инкубация вируса в при-

Таблица 2. Титр вируса (lg ФОЕ/мл) после инкубации вируса гриппа с KS-6469

KS-6469, мг/мл	Условия инкубации					
	4°C		20°C		37°C	
	3 ч	6 ч	3 ч	6 ч	3 ч	6 ч
0.3	н.о.	5.4 ± 0.1	н.о.	4.9 ± 0.1	н.о.	4.8 ± 0.3
0.6	5.4 ± 0.1	4.9 ± 0.1	5.3 ± 0.1	4.9 ± 0.2	3.9 ± 0.1	1.9 ± 0.3
1.25	4.7 ± 0.3	5.1 ± 0.1	4.8 ± 0.2	4.6 ± 0.2	2.4 ± 0.2	< 1.7
2.5	5.0 ± 0.2	5.3 ± 0.3	4.5 ± 0.2	4.3 ± 0.2	< 1.7	< 1.7
5.0	н.о.	4.9 ± 0.4	н.о.	4.3 ± 0.4	< 1.7	< 1.7
ФСБ	5.1 ± 0.1	5.2 ± 0.2	5.1 ± 0.1	5.0 ± 0.3	4.4 ± 0.3	4.6 ± 0.1

Примечание. «н.о.» – не определяли.

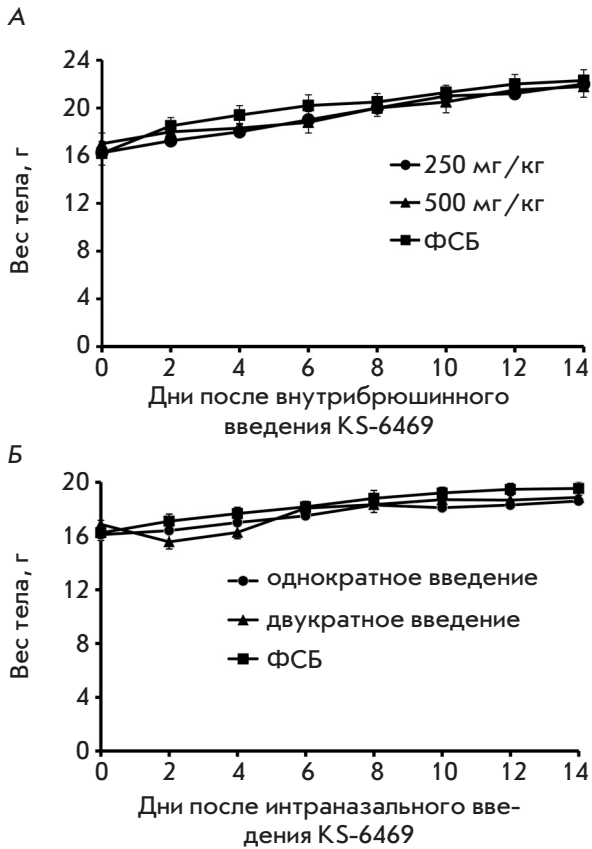


Рис. 7. Токсичность соединения KS-6469 для мышей. Мыши BALB/c ($n = 6$) получали KS-6469 в дозе 500 или 250 мг/кг однократно внутривенно в 0.2 мл ФСБ (А) или 1 или 2 раза интраназально в дозе 250 мг/кг в 40 мкл ФСБ (Б). Представлены средние значения массы тела животных \pm S.D. в указанные промежутки времени

сутствии 0.3 мг/мл KS-6469 при 37°C в течение 6 ч не влияла на его инфекционность. Снижение температуры инкубации привело к значительному снижению вирулицидных свойств KS-6469: при инкубации вируса с соединением при 4 или 20°C, снижения инфекционности вируса не наблюдалось. Мы предполагаем, что вирулицидный эффект KS-6469 может быть опосредован образованием агрегатов вирусных частиц и соединения, а снижение температуры инкубации может резко уменьшить эффективность образования таких агрегатов.

Изучение противовирусной эффективности KS-6469 на модели гриппозной пневмонии мышей

Токсичность соединения KS-6469 для мышей. Мышам линии BALB/c однократно внутривенно вводили KS-6469 (250 или 500 мг/кг) в 0.2 мл ФСБ.

Физические параметры и вес животных контролировали ежедневно (рис. 7). Однократное введение соединения в максимальной дозе 500 мг/кг не приводило к снижению веса и изменению общего состояния животных, что указывает на низкую токсичность KS-6469. Мыши, которым двукратно с интервалом 24 ч интраназально вводили KS-6469 (250 мг/кг), теряли вес минимально в течение 2 дней после введения, далее токсических побочных эффектов не наблюдали в течение всего периода наблюдения (рис. 7А и 7Б).

Протективное действие KS-6469. Эффективность KS-6469 против летального заражения ВГ протестировали на модели гриппозной пневмонии мышей. Для оценки репродукции ВГ в легких мышам интраназально вводили KS-6469 в различных дозах и заражали вирусом в дозе, соответствующей 3 ЛД₅₀. На следующий день мыши интраназально получали вторую дозу KS-6469. Мыши группы положительного контроля ежедневно перорально получали осельтамивир (7.5 мг/кг); мыши контрольной группы без лечения получали ФСБ по аналогичной схеме (отрицательный контроль). Через 3 сут в гомогенатах легких с помощью метода ФОЕ определяли титр вируса (рис. 8А). Из представленных данных видно, что в легких мышей, получавших KS-6469, титр вируса значительно ниже, чем в контрольной группе, что свидетельствует об эффективном подавлении репродукции вируса гриппа в легких мышей после интраназального введения KS-6469 (рис. 8А). На 3-й день в легких мышей, не получавших лечения, титры вируса были на ~ 2.5 lg выше, чем у мышей, получавших KS-6469 и осельтамивир ($p < 0.05$). Необходимо отметить отсутствие дозозависимого снижения титра вируса в легких мышей, получавших разные дозы KS-6469, что, возможно, связано с механизмом действия этого соединения.

Для сравнения протективных свойств KS-6469 использовали две схемы введения препарата: 1) мышам первой группы однократно интраназально вводили KS-6469 в дозе 250 мг/кг с последующим заражением вирусом (3 ЛД₅₀); 2) вторая группа мышей получала KS-6469 в тех же дозах 2 раза с интервалом в 1 день. В качестве положительного контроля мыши ежедневно перорально получали осельтамивир (7.5 мг/кг), мышам из группы без лечения по аналогичной схеме вводили ФСБ. В течение 14 дней после заражения ежедневно оценивали падение массы тела (количественный клинический признак гриппозной пневмонии) и выживаемость. Показано (рис. 8Б, 8В), что двукратное интраназальное введение KS-6469 приводило к минимальной потере массы тела и обеспечивало полную защиту мышей от заражения, как и введение осельтамивира (100% выживаемость). В группе мышей, получавших KS-6469 однократ-

но, показатель выживаемости достигал 66%, и потеря массы тела была минимальной. Значительное падение массы тела у мышей без лечения (до 20%) свидетельствует о развитии тяжелой гриппозной

пневмонии, которая привела к гибели 84% мышей. Таким образом, полученные нами данные показывают, что лечебно-профилактическое применение соединения KS-6469 в модели гриппозной пневмонии эффективно защищает мышей от летальной гриппозной инфекции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Грипп остается одним из самых опасных вирусных заболеваний. На сегодняшний день одобрены только два класса препаратов для лечения гриппа – блокаторы ионных каналов белка M2 и ингибиторы NA [23, 24]. Вакцинация является надежным способом борьбы с гриппозной инфекцией [25], но вирусы гриппа постоянно меняются как в результате случайного накопления мутаций в генах поверхностных белков гемагглютинаина и нейраминидазы, так и в результате реассортации сегментов вирусного генома различных штаммов вируса гриппа, что приводит к снижению эффективности противогриппозных вакцин и терапевтических препаратов. Таким образом, существует острая необходимость в разработке новых подходов к борьбе с гриппом. Одно из возможных решений – разработка противовирусных соединений на основе сульфопроизводных олиго- и полисахаридов, полученных из синтетических или натуральных продуктов. Такие соединения эффективно инактивируют более восприимчивые к ним оболочечные вирусы [3–7]. Ранее было показано, что сульфатированные полисахариды из морских микроводорослей обладают активностью против вирусов без оболочки [26]. Считается, что сульфатированные полисахариды влияют на такие стадии цикла репликации гриппа, как связывание вирусных частиц с рецепторами клеточной поверхности [27], интернализация вирионов [28] и высвобождение вируса из клетки [12, 29]. Однако для выяснения механизмов их противовирусного действия требуются дополнительные исследования. Нами исследованы противовирусные свойства нового сульфированного производного β -циклодекстрина KS-6469. Обнаружено полное подавление репродукции вируса после инкубации инфицированных клеток в течение 24 ч с KS-6469 в концентрации 600 мкг/мл, что указывает на высокий противовирусный потенциал соединения. Для определения механизма противовирусной активности KS-6469 мы оценили эффективность ингибирования на разных стадиях жизненного цикла вируса (рис. 3). Оказалось, что KS-6469 не влияет на ранние стадии репликации вируса, однако значительное снижение титра вируса происходило при инкубации инфицированных клеток с KS-6469 в течение длительного времени. Таким образом, мы можем предположить, что KS-6469 влияет на поздние ста-

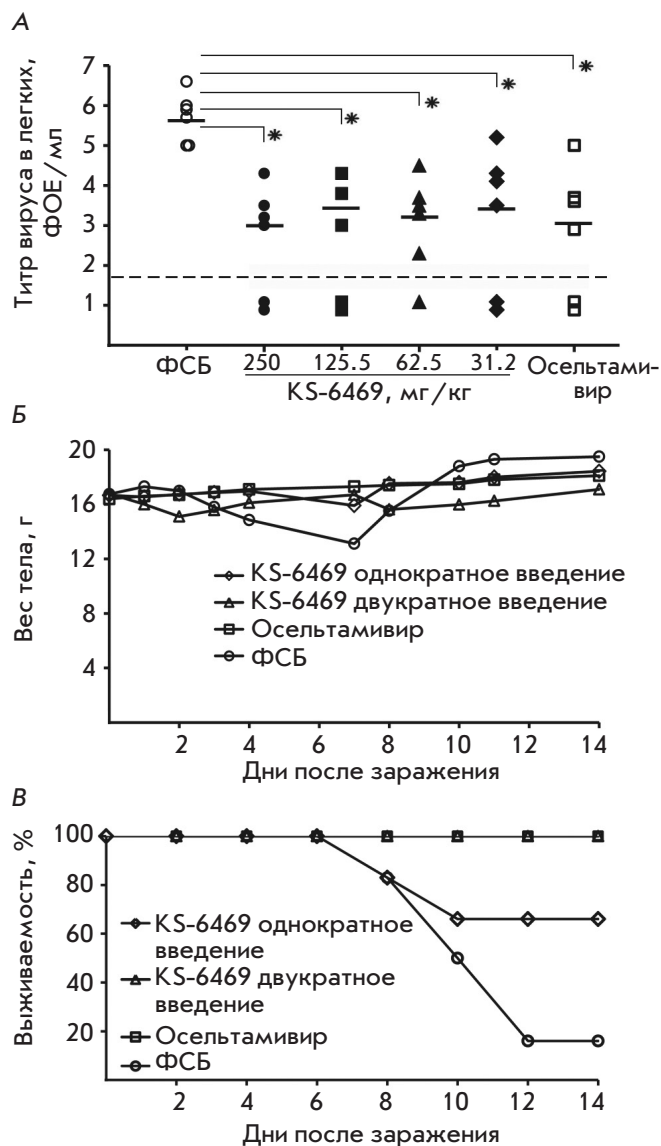


Рис. 8. Протективное действие соединения KS-6469 при летальном заражении мышей ВГ. А – мышам BALB/c ($n = 6$) вводили интраназально KS-6469 в указанных дозах и инфицировали 3 ЛД₅₀ ВГ. На следующий день мыши получали вторую дозу KS-6469 интраназально. Через 72 ч определяли титр вируса в легких мышей по методу ФОЕ. Б – изменение массы тела мышей, инфицированных вирусом гриппа и получавших однократно или двукратно интраназально KS-6469 (250 мг/кг), осельтамивир или фСБ. В – выживаемость мышей BALB/c ($n = 6$), инфицированных 3 ЛД₅₀ ВГ и получавших однократно или двукратно интраназально KS-6469 (250 мг/кг). * $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой без лечения

дии развития гриппозной инфекции. Ингибирующий эффект KS-6469 на поздних стадиях инфекции может быть связан с подавлением активности НА, однако мы не обнаружили каких-либо изменений в активности НА после инкубации с KS-6469 (рис. 5). Функциональная активность другого белка вирусной оболочки – гемагглютинина, после инкубации вирусных частиц с KS-6469 в течение 1 ч при 37°C была снижена в 4 раза по сравнению с гемагглютинином необработанного вируса (табл. 1), что не повлияло на эффективность связывания вирионов с рецепторами клеток и не привело к снижению эффективности репродукции вируса. Следует отметить, что инкубация ВГ с KS-6469 не снижала способность НА взаимодействовать с определенными моноклональными антителами к этому белку, что свидетельствует о сохранности антигенных детерминант, к которым направлены эти антитела (рис. 4). Нами показано, что KS-6469 обладает выраженной вирулицидной активностью, способной вызывать полную потерю инфекционности вируса после инкубации с KS-6469 (табл. 2). Вирулицидная активность соединения была максимальной при 37°C, но требовала длительной инкубации, что, в свою очередь, объясняет отсутствие эффекта ингибирования ранних этапов репликации вируса при инкубации клеток с KS-6469 (рис. 3). Экспозиция клеток с KS-6469 в течение первых часов развития инфекционного процесса привела лишь к частичному снижению инфекционности вируса, явно недостаточной для инактивации всего пула вирусных частиц и, как следствие, полной остановки репликации вируса. Детальный механизм действия KS-6469 находится в процессе изучения, тем не менее, полученные результаты позволяют предположить, что при взаимодействии KS-6469 с вирусными частицами *in vitro* образуются агрегаты, что приводит к значительному снижению инфек-

ционности вируса. Однако этот процесс требует достаточно длительного времени, более 6 ч. Ранее было высказано предположение [21], что именно вирулицидная активность противовирусных препаратов связана с их высокой терапевтической активностью в экспериментах *in vivo*. Наши данные полностью подтверждают это предположение. Мы показали, что KS-6469 обладает выраженной противовирусной активностью при гриппозной пневмонии у мышей (рис. 8). Интраназальное введение соединения одновременно с заражением мышей летальной дозой ВГ приводило к снижению смертности животных. При однократном введении соединения KS-6469 выжило 66% животных, тогда как его двукратное введение обеспечивало полную защиту от заражения вирусом гриппа. В контрольной группе выжило только 16% мышей, не получавших препарата. Интраназальное применение KS-6469 для лечения зараженных гриппом мышей заметно снижало титр вируса в легких даже при введении низкой дозы KS-6469 (62.5 мг/кг (рис. 8)).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные эксперименты показывают, что KS-6469 – это препарат с низкой токсичностью, который эффективно ингибирует развитие гриппозной пневмонии. Интраназальное применение KS-6469 оказывало противовирусное действие, сопоставимое с действием осельтамивиром. Таким образом, KS-6469 представляется перспективным кандидатом для разработки противовирусного препарата, эффективного для профилактики и лечения гриппозных инфекций. ●

Работа выполнена при частичной поддержке проекта базового бюджетного финансирования
ПФНИ ГАН 2013-2020
№ АААА-А17-117020210024-8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Iuliano D., Roguski K.M., Chang H.H., Muscatello D.J., Palekar R., Tempia S., Cohen C., Gran J.M., Schanzer D., Cowling B.J., et al. // *Lancet*. 2018. V. 391. P. 1285–1300.
- Ginsberg H.S., Goebel W.F., Horsfall F.J. // *J. Exp. Med.* 1948. V. 87. P. 385–410.
- Moriya T., Saito K., Kurita H., Matsumoto K., Otake T., Mori H., Morimoto M., Ueba N., Kunita N. // *J. Med. Chem.* 1993. V. 36. P. 1674–1677.
- Ying C., van Pelt J.F., van Lommel A., van Ranst M., Leyssen P., De Clercq E., Neyts J. // *Antivir. Chem. Chemother.* 2002. V. 13. P. 157–164.
- Cardozo F.T., Camellini C.M., Leal P.C., Kratz J.M., Nunes R.J., Mendonça M.M., Simões C.M. // *Intervirology*. 2014. V. 57. P. 375–383. doi: 10.1159/000365194.
- Hidari K.I., Takahashi N., Arihara M., Nagaoka M., Morita K., Suzuki T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 376. P. 91–95. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.08.100.
- Novetsky A.P., Keller M.J., Gradissimo A., Chen Z., Morgan S.L., Xue X., Strickler H.D., Fernández-Romero J.A., Burk R., Einstein M.H. // *Gynecol. Oncol.* 2016. V. 143. P. 313–318. doi: 10.1016/j.jygyno.2016.09.003.
- Ikeda S., Neyts J., Verma S., Wickramasinghe A., Mohan P., De Clercq E. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994. V. 38. P. 256–259.
- Fitton J.H. // *Mar. Drugs*. 2011. V. 9. P. 1731–1760.
- Tang F., Chen F., Li F. // *J. Appl. Polym. Sci.* 2012. V. 127. P. 2110–2115.
- Kim M., Yim J.H., Kim S.Y., Kim H.S., Lee W.G., Kim S.J., Kang P.S., Lee C.K. // *Antiviral Res.* 2012. V. 93. P. 253–259. doi: 10.1016/j.antiviral.2011.12.006.
- Ciejka J., Milewska A., Wytrwal M., Wojarski J., Golda A., Ochman M., Nowakowska M., Szczubialka K., Pyrc K. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. V. 60. P. 1955–1966. doi: 10.1128/AAC.02183-15.
- Eccles R., Winther B., Johnston S.L., Robinson P., Trampisch

- M., Koelsch S. // *Respir. Res.* 2015. V. 16. P. 121. doi: 10.1186/s12931-015-0281-8.
14. Carmichael J., DeGraff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D., Mitchell J.B. // *Cancer Res.* 1987. V. 47. P. 936–942.
15. Brien J.D., Lazear H.M., Diamond M.S. // *Curr. Protoc. Microbiol.* 2013. doi:10.1002/9780471729259.mc15d03s31.
16. Крылова Н.В., Леонова Г.Н. // *Проблемы вирусологии.* 2016. Т. 61. С. 139–144.
17. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005. 832 с.
18. Goncharova E.P., Koroleva L.S., Silnikov V.N., Ternovoy V.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A. // *J. Mol. Genet. Med.* 2011. V. 5. P. 266–272.
19. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. European Treaty Series. 1986. No. 123.
20. Sun X., Whittaker G.R. // *J. Virol.* 2003. V. 77. P. 12543–12551.
21. Harden E.A., Falshaw R., Carnachan S.M., Kern E.R., Prichard M.N. // *Antiviral Res.* 2009. V. 83. № 3. P. 282–289. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.06.007.
22. Leibbrandt A., Meier C., König-Schuster M., Weinmüller R., Kalthoff D., Pflugfelder B., Graf P., Frank-Gehrke B., Beer M., Fazekas T., et al. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 12. E. 14320. doi: 10.1371/journal.pone.0014320.
23. Yen H.L. // *Curr. Opin. Virol.* 2016. V. 18. P. 126–134.
24. Nakamura S., Miyazaki T., Izumikawa K., Takeya H., Saisho Y., Yanagihara K., Miyazaki Y., Mukae H., Kohno S. // *Open Forum Infect. Dis.* 2017. V. 4. ofx129. doi: 10.1093/ofid/ofx129.
25. Lewnard J.A., Cobey S. // *Vaccines (Basel).* 2018. doi: 10.3390/vaccines6020028.
26. Yim J.H., Kim S.J., Ahn S.H., Lee C.K., Rhie K.T., Lee H.K. // *Mar. Biotechnol (NY).* 2004. V. 6. P. 17–25.
27. Vives R.R., Imberty A., Sattentau Q.J., Lortat-Jacob H.J. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 21353–21357.
28. Hashimoto K., Kodama E., Mori S., Watanabe J., Baba M., Okutani K., Matsuda M., Shigeta S. // *Antiviral Chem. Chemother.* 1996. V. 7. P. 189–196.
29. Wang W., Wu J., Zhang X., Hao C., Zhao X., Jiao G. Shan X., Tai W., Yu G. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 40760. doi: 10.1038/srep40760.