

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-22-26
УДК 615.2

Изучение противовирусной активности комплексного препарата с аминокaproновой кислотой для профилактики гриппа и ОРВИ

А. С. Карпова^{1,2*}, Ю. В. Кочкина^{1,2}, С. А. Кедик^{1,2}

1 – «МИРЭА – Российский технологический университет», 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86
2 – АО «Институт фармацевтических технологий», 121353, Россия, г. Москва, Сколковское шоссе, д. 21, оф. 1

*Контактное лицо: Карпова Анастасия С. E-mail: karpova@ipt.ru.com

Статья получена: 27.02.2018. Статья принята к печати: 07.05.2019

Резюме

Введение. Грипп и острая респираторная вирусная инфекция (далее – ОРВИ) являются тяжелыми заболеваниями, от которых ежегодно страдают до 500 миллионов человек во всем мире. В России ежегодно регистрируют от 27,3 до 41,2 миллионов заболевших. Таким образом актуальной задачей является разработка новых эффективных лекарственных средств, направленных на профилактику и лечение вышеуказанных заболеваний. Предложен состав лекарственного препарата на основе аминокaproновой кислоты, обладающей противовирусной активностью, и сополимера N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина с доказанным иммуностимулирующим действием для интраназального применения.

Цель. Изучение противовирусной активности комплексного препарата с аминокaproновой кислотой и сополимером N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина.

Материалы и методы. Для решения поставленной цели использовали препараты с разным соотношением активных веществ для выявления наилучшей эффективности. Исследование проводили в сравнении с известным препаратом занамивира. Противовирусную активность изучали в отношении вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) у белых беспородных мышей при назальном введении исследуемых образцов. Активность исследуемых препаратов оценивали по весовым показателям и динамике гибели животных контрольных и опытных групп. Также оценивали инфекционную активность вируса в ткани легких зараженных мышей более чем в два раза относительно титрования на культуре клеток MDCK в питательной среде MEM. Титр вируса выражали в логарифмах 50% экспериментальной инфекционной дозы вируса ($\lg \text{TCID}_{50}$) на 200 мкл среды.

Результаты и обсуждение. Согласно данным, полученным в ходе исследования динамики весовых показателей и динамики гибели животных, максимальную противовирусную активность показал препарат с соотношением активных веществ 2:1, что подтверждают данные изучения вирусной активности в легких животных, титр вируса составил $1,9 \pm 0,3$ ($p=0,616$) $\lg \text{TCID}_{50}/0,2$ мл, таким образом данный испытуемый образец снизил уровень вирусной нагрузки в ткани легких зараженных мышей более чем в два раза относительно контрольной группы.

Заключение. В ходе проделанной работы изучена противовирусная активность комплексного препарата на основе аминокaproновой кислоты и сополимера N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина и выявлено, что препарат с соотношением активных веществ 2:1 снижает уровень вирусной нагрузки в ткани легких зараженных мышей более чем в два раза относительно контрольной группы. Таким образом данная комбинация активных веществ может быть использована для разработки перспективного лекарственного препарата для лечения и профилактики гриппа и ОРВИ при назальном применении.

Ключевые слова: аминокaproновая кислота, сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона, противовирусная активность, профилактика гриппа и ОРВИ, назальный спрей.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Карпова А. С., Кочкина Ю. В., Кедик С. А. Изучение противовирусной активности комплексного препарата с аминокaproновой кислотой для профилактики гриппа и ОРВИ. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2019; 8(2): 22–26.

The Antiviral Activity Study of Complex Drug with Aminocaproic Acid for Prevention of Influenza and ARVI

А. С. Карпова^{1,2*}, Ю. В. Кочкина^{1,2}, С. А. Кедик^{1,2}

1 – «MIREA – Russian Technical University», 86, Vernadskogo highway, Moscow, 119571, Russia
2 – JSC «Institute of Pharmaceutical Technology», of. 1, 21, Skolkovskoye highway, Moscow, 121353, Russia

*Corresponding author: Anastasiya S. Karpova. E-mail: karpova@ipt.ru.com

Received: 27.02.2018. Accepted: 07.05.2019

Abstract

Introduction. Influenza and acute respiratory viral infection (hereinafter – ARVI) are serious diseases that affect up to 500 million people worldwide every year. From 27.3 to 41.2 million people are registered annually in Russia. Thus, the urgent task is to develop new effective drugs aimed at the prevention and treatment of the above diseases. The drug composition for intranasal use based on aminocaproic acid with antiviral activity and a copolymer of N-vinylpyrrolidone and 2-methyl-5-vinylpyridine with a proven immunostimulating action was developed.

Aim. Study of the antiviral activity of the complex drug composition with aminocaproic acid and a copolymer of N-vinylpyrrolidone and 2-methyl-5-vinylpyridine.

Materials and methods. To reach this goal, preparations with different ratios of active substances were used to identify the best efficacy. The study was conducted in comparison with the known drug zanamivir. Antiviral activity was studied against influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) virus in white outbred mice upon nasal administration of the test samples. The activity evaluation of the studied drugs was carried out according to the weight values and the death dynamics control and experimental groups of animals. Infectious activity of the virus in the lung tissue of animals was assessed on day 5 after infection by titration on a culture of MDCK cells in a nutrient medium MEM. Virus titer was expressed in logarithm of 50% of the virus experimental infectious dose ($\lg \text{TCID}_{50}$) per 200 μl of medium.

Results and discussion. Based on the data obtained during the study of the weight values dynamics and the dynamics of animal death, the drug showed a maximum antiviral activity with a 2:1 ratio of active substances, which is confirmed by the data on viral activity in the lungs of animals, the virus titer was 1.9 ± 0.3 ($p=0.616$) $\lg \text{TCID}_{50}/0.2$ ml.

Conclusion. Antiviral activity of the complex preparation based on aminocaproic acid and N-vinylpyrrolidone and 2-methyl-5-vinylpyridine copolymer was studied, the most effective ratio of active substances was found, it is 2:1. Thus this complex preparation with a ratio of active substances 2:1 reduced the viral load level in the lung tissue of infected mice by more than two times relative to the control group. Therefore, this combination of active substances can be used to develop a promising drug for nasal use as treatment and prevention of influenza and ARVI.

Keywords: aminocaproic acid, copolymer of 2-methyl-5-vinylpyridine and N-vinylpyrrolidone, antiviral activity, prevention of influenza and ARVI, nasal spray.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Karpova A. S., Kedik S. A., Kochkina Y. V. The antiviral activity study of complex drug with aminocaproic acid for prevention of influenza and ARVI. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 22–26.

ВВЕДЕНИЕ

Грипп – это острое инфекционное заболевание дыхательных путей, вызываемое вирусом, которое входит в группу острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ). В настоящее время известно более 2000 различных типов вируса гриппа, различающихся между собой антигенным спектром. Кроме вируса гриппа на сегодняшний день описано более 200 видов респираторных вирусов, таких как аденовирусы, риновирусы, респираторно-синцитиальные вирусы, вызывающих гриппоподобные заболевания у человека. В тяжелых случаях грипп может распространяться в виде эпидемий и пандемий [1].

Вирусные инфекции дыхательных путей являются тяжелой болезнью, от которой в 2015 г. в мире умерли 3,2 млн человек [2]. Следовательно, существует потребность в разработке новых лекарственных препаратов, направленных на борьбу с гриппом и ОРВИ.

В качестве активных веществ разрабатываемого лекарственного препарата предложены аминокaproновая кислота (далее – АКК) и сополимер N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина (далее – сополимер). АКК зарегистрирована в России в качестве фибринолитического средства в виде раствора для инфузий при хирургических операциях. Однако известны и ее противовирусные свойства, врачи назначают ее больным в виде раствора для ингаляций во время вирусных заболеваний, а также для профилактики. АКК в форме назальных капель зарегистрирована в Украине, противовирусное действие которых описано в литературных источниках [3, 4]. Механизм действия аминокaproновой кислоты заключается в предотвращении проникновения вируса в клетки слизистой оболочки носоглотки. Она на ранних этапах блокирует взаимодействие вируса с мембранами здоровых клеток человека, подавляя протеолитический процессинг гемоглобулина [5].

Тогда как сополимер с содержанием мономерных звеньев $n=25-50$ мольн. %, и средневязкостной молекулярной массой $M_w=15-28$ кДа имеет доказанное иммуностимулирующее действие [6].

Таким образом АКК и сополимер являются перспективными веществами для создания на их основе лекарственного препарата для профилактики гриппа

и ОРВИ, так как ожидается, что АКК будет проявлять краткосрочный противовирусный эффект, а сополимер будет оказывать общее иммуностимулирующее действие.

Цель исследования заключалась в выявлении противовирусной активности у кандидатных препаратов с разным соотношением активных веществ. Объем исследований определялся действующими нормативными документами [7].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были АКК (ООО «Полисинтез, Россия, серия 571016, годен до 11.2021), сополимер (АО «ИФТ», Россия, содержание звеньев 32 мол. %, молекулярная масса 27 кДа), также были использованы калия дигидрофосфат х.ч. (Химмед, Россия), динатрия гидрофосфат х.ч. (Химмед, Россия), бензалкония хлорид (Unilab chemicals and pharmaceuticals Pvt. Ltd., India, USP), вода очищенная (ФС 2.2.0020.15). В качестве положительного контроля (препарат сравнения) использовали препарат «Реленза» порошок для ингаляций, 5 мг, производства фирмы Глаксосмиткляйн, Великобритания, серия МА8Т, срок годности до 01.02.2023 г. (МНН занамивир) (далее по тексту занамивир).

Для исследования было предложено три кандидатных препарата с разным соотношением активных веществ: Препарат 1 – 1:1, препарат 2 – 1:2, препарат 3 – 2:1 с соотношением аминокaproновой кислоты и сополимера 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона соответственно. Образцы препаратов готовили в фосфатном буферном растворе pH 5,5 с добавлением консерванта – бензалкония хлорида.

В ходе проводимых исследований оценку активности кандидатных препаратов проводили по трем параметрам:

- оценка динамики весовых показателей животных контрольных и опытных групп;
- оценка динамики гибели животных контрольных и опытных групп;
- оценка инфекционной активности вируса в ткани легких животных контрольных и опытных групп на 5 сутки после инфицирования.

Оценку проводили при заражении мышей модельным вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H_1N_1), полученном из музея вирусов гриппа ФГБУ «НИИ Гриппа Министерства здравоохранения РФ.

Работы по изучению противовирусной активности предлагаемого лекарственного средства выполнялись на самках белых беспородных мышей массой 16–18 г, полученных из питомника «Рапполово» Ленинградской области. Экспериментальных животных разделили на группы по вводимым веществам, а также группы отрицательного и положительного контроля по 20 особей в каждой группе (таблица 1).

Таблица 1. Схема применения образцов у мышей

Table 1. Pattern of use of samples in mice

№ п/п	Группы	Животные	Введение образцов	Инфицирование через 3 часа
1	Препарат 1	20 мышей	X	X
2	Препарат 2	20 мышей	X	X
3	Препарат 3	20 мышей	X	X
4	Контроль +	20 мышей	X	X
5	Контроль –	20 мышей	Физ.р-р	X
6	Здоровые	20 мышей		

За 3 часа до заражения мыши первых трех групп получали исследуемые образцы. Мыши группы положительного контроля получали препарат с известной противовирусной активностью, мыши группы отрицательного контроля получали физиологический раствор, последняя группа – незараженные мыши. В качестве препарата для положительного контроля подбирают лекарственное средство с известной и доказанной противовирусной активностью схожего механизма действия, в данном случае использовали препарат на основе субстанции занамивира – зарегистрированного в РФ лекарственного средства, обладающего противовирусной активностью.

Образцы вводили в объеме 10 мкл на мышью. Введение вирусного инокулята осуществляли под легким эфирным наркозом в дозе 5×10^3 TCID₅₀ на мышью в объеме 15 мкл.

Животные каждой испытуемой группы содержались в двух отдельных клетках: для учета динамики массы тела (15 животных) и забора органов (5 животных). Наблюдение за животными осуществляли в течение двух недель. Ежедневно проводили изучение динамики массы тела и фиксировали гибель животных. На основании полученных показателей выживаемости в каждой группе рассчитывали следующие показатели [8]:

1. Процент гибели: M_r – отношение числа павших за 14 дней животных к общему числу зараженных животных в группе,
2. Индекс защиты: IP – отношение разницы доли погибших животных в контрольной и подопытной группах к доле погибших животных в контрольной группе в соответствии со следующими формулами:

$$M_r = M/N_t,$$

где M – число животных в группе, павших в течение 14 дней после заражения; N_t – общее число павших животных в группе.

$$IP = ((M_c - M_e)/M_c) \times 100\%,$$

где M_c и M_e – доля погибших животных в контрольной и опытной группах соответственно.

Для оценки специфической фармакологической активности образцов препаратов на 3-й день после заражения по 5 животных из каждой группы умерщвляли, вскрывали и изолировали легкие, гомогенизировали с помощью прибора TissueLyserII (Qiagen, США) и определяли в гомогенатах инфекционную активность вируса. Для оценки уровня репродукции вируса в ткани легких проводили титрование его инфекционной активности в культуре клеток MDCK, коллекции ATCC CCL-34 (106 кл./мл), полученной из лаборатории клеточных культур ФГБУ «НИИ Гриппа».

Из гомогената легочной ткани готовили серию 10-кратных разведений на среде MEM (ООО «БиолоТ», Россия) с добавлением трипсина (Sigma Aldrich, USA, 1 мкг/мл) и антибиотика ципрофлоксацина (ОАО «Синтез», Россия, 20 мкг/мл) и вносили их в лунки планшета с клетками MDCK. Планшеты инкубировали в течение 48 часов при температуре 37 °C в атмосфере 5% диоксида углерода. По окончании срока инкубации культуральную жидкость переносили в лунки планшетов с круглым дном для иммунологических реакций и добавляли по 100 мкл на лунку 1% суспензии куриных эритроцитов в физиологическом растворе. Планшеты выдерживали 1 час при температуре 20 °C, после чего визуально оценивали наличие или отсутствие гемагглютинации в лунках. За титр вируса принимали максимальное разведение ткани, при котором в лунках отмечается гемагглютинация. Уровень репродукции вируса в лунках панели оценивали по реакции гемагглютинации (РГА) эритроцитов. За титр вируса принимали величину, противоположную десятичному логарифму наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную реакцию гемагглютинации и выражали в логарифмах 50% экспериментальной инфекционной дозы вируса (lg TCID₅₀) на 200 мкл среды.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel. Полученные результаты представляли в виде среднего значения \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$) или ошибка эксперимента ($M \pm SE$). Достоверность различий в титрах вируса в лёгких оценивали при помощи критерия Стьюдента. Достоверными считали различия между группами, если параметр p не превышал 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка динамики весовых показателей животных

Результаты исследований веса испытуемых животных подтверждают, что инфицирование вируса гриппа приводит к развитию у животных патологического

процесса. Внешние признаки заболевания проявлялись в ограничении подвижности животных, снижении потребления корма и воды, приводящему к потере веса и гибели животных, мыши, которых не заражали вирусом, не теряли в весе на протяжении всего исследования (таблицы 2, 3; рисунок 1).

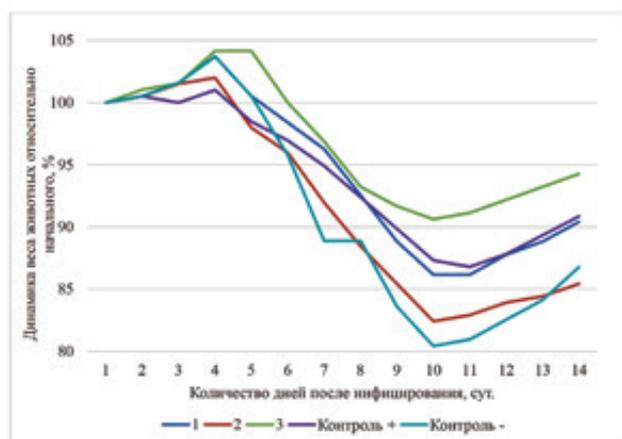


Рисунок 1. Динамика веса животных в ходе гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H₁N₁) в условиях применения препаратов за 3 часа перед инфицированием

Figure 1. The dynamics of animal weight during influenza pneumonia caused by the influenza A/Puerto Rico/8/34 (H₁N₁) virus under the conditions of using the drugs 3 hours before infection

Оценка динамики гибели животных

Препарат сравнения приводил к снижению специфической смертности животных на 55 %. Исследуемые препараты, 1 и 2, снижали процент гибели мышей на 22% по сравнению с отрицательным контролем. В то

Таблица 2. Оценка динамики веса испытываемых животных

Table 2. Evaluation of the weight dynamics of the test animals

Образец	Вес животных (г), на сутки после инфицирования									
	0	1	2	3	5	6	7	9	12	13
1	19,9±1,3	20,0±1,3	20,2±2,2	20,3±2,9	19,1±3,9	18,3±4,1	17,6±4,2	16,4±3,6	17,4±3,3	17,8±2,0
2	19,2±1,3	19,4±1,4	19,5±1,9	20,0±2,4	19,2±2,7	18,6±2,8	17,9±3,0	17,4±3,2	17,9±3,2	18,1±1,8
3	19,7±1,5	19,8±1,5	19,7±2,0	19,9±2,3	19,1±3,2	18,7±3,0	18,2±3,5	17,2±2,8	17,6±3,0	17,9±1,3
4	18,8±1,3	18,9±1,3	19,1±2,1	19,5±2,6	18,5±3,1	18,1±4,0	17,4±4,1	16,2±3,1	16,7±3,0	17,0±2,3
Контроль	18,9±2,2	19,0±1,6	19,2±2,3	19,6±2,7	18,1±3,9	16,8±3,8	16,8±3,8	15,2±3,6	15,9±3,7	16,4±1,0

Таблица 3. Динамика гибели животных в ходе гриппозной пневмонии в условиях интраназального применения исследуемых образцов

Table 3. The dynamics of the death of animals during influenza pneumonia in the conditions of intranasal use of the samples

Образец	Дни исследования										Кол-во павших животных	Смертность, %	Индекс защиты, %
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1			3	2	1	1					7	47	22
2	1		1	1	1	2	1				7	47	22
3	1				1	1					3	20	67
Контроль +					2	2					4	27	55
Контроль -			3	2	2	1	1				9	60	-

время как исследуемый образец 3 снизил показатель смертности на 67% по сравнению с группой мышей отрицательного контроля (таблица 3, рисунок 2). Из группы здоровых не зараженных мышей ни одна особь не погибла.

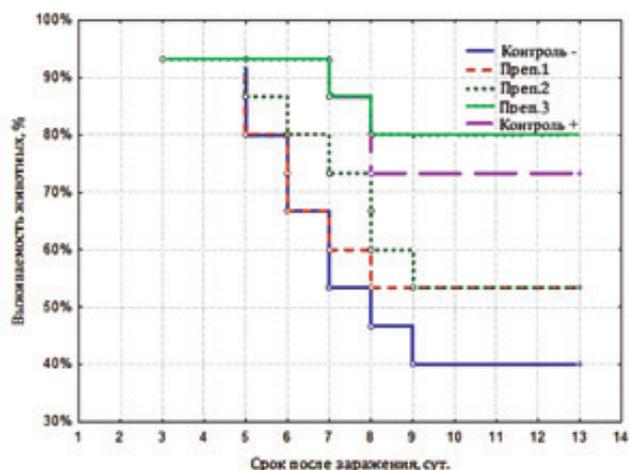


Рисунок 2. Динамика гибели животных в ходе гриппозной пневмонии в условиях интраназального применения исследуемых образцов

Figure 2. The dynamics of the death of animals during influenza pneumonia in the conditions of intranasal use of the samples

Оценка инфекционной активности вируса в ткани легких испытываемых животных

Результаты, полученные в ходе оценки гибели испытываемых животных, подтвердили изучением вирусной активности в легких животных исследуемых групп (таблица 4).

Таблица 4. Уровень репродукции вируса гриппа А/Puerto Rico/8/34 (H₁N₁) в условиях применения изучаемых препаратов за 3 часа до заражения

Table 4. The level of reproduction of influenza A/Puerto Rico/8/34 (H₁N₁) virus under the conditions of use of the studied drugs 3 hours before infection

Образец	Титр вируса в ткани легких (lg TCID ₅₀ /0,2 мл)
Исследуемый образец 1 (n=5)	2,9±0,4 (p=0,036)
Исследуемый образец 2 (n=5)	2,7±0,2 (p=0,042)
Исследуемый образец 3 (n=5)	1,9±0,3 (p=0,031)
Контроль + (n=5)	2,2±0,3 (p=0,023)
Контроль – (n=5)	3,9±0,2

Из представленных данных видно, что, как препарат сравнения, так и изучаемые экспериментальные образцы снижали вирусную нагрузку в ткани легких мышей. Были получены достоверные отличия от группы отрицательного контроля, как при использовании занамивира, так и при использовании исследуемых препаратов. Из исследуемых образцов максимальную активность проявил исследуемый образец 3, снизивший уровень вирусной нагрузки в ткани легких зараженных мышей более чем в два раза относительно контрольной группы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что раствор, содержащий аминокaproную кислоту и сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона имеет противовирусную активность и может быть использован в качестве разработки перспективного лекарственного препарата для лечения и профилактики гриппа и ОРВИ при интраназальном применении. Наиболее эффективным является состав препарата с соотношением активных компонентов 2:1, подавлявший размножение вируса в легких белых беспородных мышей более чем в два раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бюллетень Всемирной организации здравоохранения. 2012; 90(4): 245–320.
2. Nair H., Brooks W., Katz M., Roca A., Berkley J., Madhi S. et al. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*. 2011; 378(9807): 1917–1930. Doi: 10.1016/s0140-6736(11)61051-9.
3. Serkedjieva J., Nikolova E., Kirilov N. Synergistic inhibition of Influenza A virus replication by a plant polyphenol-rich extract and ε-aminocaproic acid in vitro and in vivo. *Acta Virologica*. 2010; 54(2): 137–145. Doi: 10.4149/av_2010_02_137.
4. Рыбалко С. Л., Краснобаев Е. А., Жеребцова Э. Н. и др. Современное состояние проблемы гриппа А H1N1 2009. Украина. Здоров'я нації. 2010; 3(15): 169–178.
5. Lozitsky V. Anti-Infectious Actions of Proteolysis Inhibitor ε-Aminocaproic Acid (ε-ACA). National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH. 2008; 193–198. Doi: 10.1007/978-1-59745-569-5_20.
6. Патент Российской Федерации №20000004, кл. C08F 226/10, A61K 31/79, опубл. 15.02.1993.
7. Миронов А. Н. Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств. Т. 1. – М.: ФГБУ «НЦЭСМП». 2012; 942.

8. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, – М.: Медицина. 2005; 832.

REFERENCES

1. Bulletin of the World Health Organization. 2012; 90(4): 245–320 (In Russ.).
2. Nair H., Brooks W., Katz M., Roca A., Berkley J., Madhi S. et al. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*. 2011; 378(9807): 1917–1930. Doi: 10.1016/s0140-6736(11)61051-9
3. Serkedjieva J., Nikolova E., Kirilov N. Synergistic inhibition of Influenza A virus replication by a plant polyphenol-rich extract and ε-aminocaproic acid in vitro and in vivo. *Acta Virologica*. 2010; 54(2): 137–145. Doi: 10.4149/av_2010_02_137.
4. Rybalko S. L., Krasnobaev E. A., Zherebtsova E. N. et al. The current state of the H1N1 2009 flu problem. *Ukraine. Health of the Nation*. 2010; 3 (15): 169–178 (In Russ.).
5. Lozitsky V. Anti-Infectious Actions of Proteolysis Inhibitor ε-Aminocaproic Acid (ε-ACA). National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH. 2008; 193–198. Doi: 10.1007/978-1-59745-569-5_20.
6. Patent of the Russian Federation №20000004, cl. C08F 226/10, A61K 31/79, publ. 02/15/1993 (In Russ.).
7. Mironov A. N. Manual for preclinical studies drugs. T. 1. – М.: FGBU «NCEHMS». 2012; 942. (In Russ.).
8. Khabriev P. U. Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. М.: Medicine. 2005; 832 (In Russ.).