

# Амізон проти грипу та ГРВІ:

**Надзвичайно приємно, коли українські вчені, спортсмени чи митці здобувають світове визнання: мало не вся країна перехоплює подих під час бою Сталевого Молоту (як називають суперники Володимира Кличка) чи перегляду концерту з європейського турне «Океану Ельзи». Удвічі приємно, якщо йдеться про вітчизняну медицину, зокрема про стратегії лікування грипу та гострих респіраторних вірусних інфекцій (ГРВІ).**

Пацієнти і лікарі часто сприймають інформацію щодо ефективності противірусних та протигрипозних засобів із певним скепсисом та недовірою, адже на сьогодні для профілактики та терапії грипу в дітей і дорослих затверджено лише один клас вірусспецифічних препаратів – інгібітори нейрамінідази (доказовою медициною схвалено озельтамівір і занамівір). Однак широке їх застосування лімітують кілька моментів:

- ✓ під час сезонних епідемій грипу у 2007-2009 рр. в усьому світі була зафіксована висока поширеність вірусів А(H1N1) із мутацією H275Y, яка зумовлює резистентність до інгібіторів нейрамінідази;

- ✓ відмічається широка циркуляція вірусної мікс-інфекції (раціональним є застосування не тільки препаратів, що впливають на віруси грипу, а й засобів, активних відносно інших респіраторних вірусів).

Високу протиепідемічну ефективність щодо грипу має вакцинація, однак і ця стратегія характеризується певними недоліками: можлива невідповідність штамового складу вакцини й актуального різновиду вірусу, а розробка клінічно доступної вакцини проти нового вірусного штаму потребує тривалого часу.

Ураховуючи вкрай високу актуальність проблеми (щороку респіраторні віруси уражають мільйони людей в усьому світі, досягаючи рівня пандемії, як, наприклад, широко відомі пташиний та свинячий грип; а зумовлені ними інфекції супроводжуються високим ризиком ускладнень та асоціюються зі значними фінансовими витратами) та тенденцію до зниження/втрати чутливості вірусів до дії існуючих препаратів, учені активно працюють над розробкою нових противірусних засобів.

Виділяють кілька перспективних напрямів наукового пошуку, що передбачають створення:

- ✓ препаратів, що впливають на білки клітин, інфікованих вірусом;
- ✓ сполук, які пригнічують механізми реплікації вірусів;
- ✓ ліків, що захищають клітини людини від вірусу грипу шляхом видалення рецепторів, до яких він прикріплюється;
- ✓ засобів, здатних активувати неспецифічні механізми противірусного захисту.

Багато, щоб препарати мали широкий спектр ефектів, адже це дозволяє впливати на різні патогенетичні механізми вірусної інфекції. Зокрема, важливу роль відіграє протизапальна дія, оскільки залишкові запальні явища створюють передумови для приєднання інфекційного процесу за наявності грипу та ГРВІ та можуть стати пусковим механізмом виникнення ускладнень.

У терапії грипу та ГРВІ клініцисти України та інших країн СНД успішно застосовують оригінальний противірусний препарат Амізон (енісаміуму йодид) виробництва української компанії «Фармак».

12-14 жовтня в рамках Третього противірусного конгресу, який відбувся у м. Амстердамі (Нідерланди), вперше було представлено нові багатообіцяючі результати досліджень українського препарату Амізон («Фармак»).

Міжнародною групою дослідників Іллінойського технологічного інституту (David Boltz, Xinjian Peng, Miguel Muzzio, Rajendra Mehta), Дитячого дослідницького госпіталю ім. св. Іуди (Pradyot Dash, Paul Thomas) та ПАТ «Фармак» (Віктор Маргітич) було виконано дослідження противірусної активності енісаміуму щодо вірусів грипу *in vitro* у диференційованих нормальних клітинах епітелію бронхів людини. Його результати були оприлюднені у вигляді постерної презентації, яку ми пропонуємо вашій увазі.

## Противірусна активність енісаміуму щодо вірусів грипу у диференційованих нормальних клітинах епітелію бронхів людини

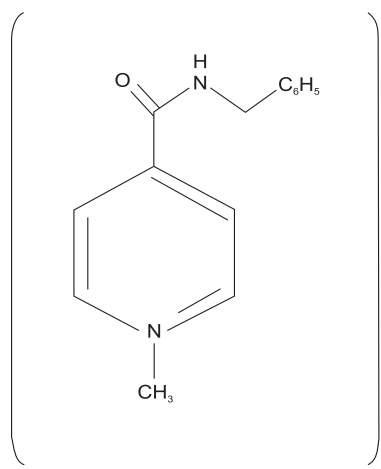


Рис. 1. Хімічна структура енісаміуму йодиду

Дейвід Болц (David Boltz)<sup>1</sup>, Синьцзян Пен (Xinjian Peng)<sup>1</sup>, Мігель Музіо (Miguel Muzzio)<sup>1</sup>, Прадйот Даш (Pradyot Dash)<sup>2</sup>, Пол Томас (Paul Thomas)<sup>2</sup>, Раджendra Мехта (Rajendra Mehta)<sup>1</sup> і Віктор Маргітич (Victor Margitich)<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Науково-дослідний інститут Іллінойського технологічного інституту (Illinois Institute of Technology (IIT) Research Institute), м. Чикаго, Іллінойс, США;

<sup>2</sup> Дитячий дослідницький госпіталь ім. св. Іуди (St. Jude Children Research Hospital), м. Мемфіс, Теннессі, США;

<sup>3</sup> ПАТ «Фармак», м. Київ, Україна.

Наразі лише один клас противірусних препаратів – інгібітори нейрамінідази озельтамівір (Tamiflu®, Roche) і занамівір (Relenza®, GlaxoSmithKline) – рекомендовано для використання з метою профілактики та лікування грипу у дорослих та дітей у всьому світі.

Сьогодні значні зусилля зосереджені на виявленні нових методів лікування і мішеней

для впливу лікарських засобів, які дали б змогу елімінувати патогенні властивості вірусу грипу.

У терапії грипу та ГРВІ клініцисти України, РФ, Білорусі, Казахстану, Узбекистану успішно застосовують оригінальний противірусний препарат Амізон (енісаміуму йодид) виробництва української компанії «Фармак».

У ході клінічного дослідження, проведеного в НДІ грипу (РФ), продемонстровано противірусну ефективність відносно вірусів грипу А і В, що дозволило говорити про енісаміум як про перспективний засіб для лікування грипу. Однак наявні експериментальні дані про ефективність цього похідного ізонікотинової кислоти як агента, дієвого щодо вірусів грипу, потребують додаткових досліджень.

Метою цього дослідження було оцінити очікувану противірусну активність енісаміуму щодо вірусів грипу *in vitro*. Пілотні дослідження з використанням клітин MDCK та A549 продемонстрували низьку проникність енісаміуму (на рівні 0,08 і 0,87% відповідно), а також відсутність противірусного ефекту. Поглинання енісаміуму диференційованими нормальними клітинами епітелію бронхів людини (normal human bronchial epithelial, NHBE) було кращим порівняно з клітинами A549 та MDCK (варіювало в межах 1,7-2,1%), тому саме NHBE були обрані для оцінки ефективності та наявності противірусного ефекту енісаміуму щодо вірусів грипу.

### Матеріали та методи

**Культура клітин.** У дослідженні були використані диференційовані нормальні клітини епітелію бронхів людини (NHBE) EpiAirway System компанії MatTek (м. Ашланд, Массачусетс, США). Клітини від одного донора були використані для аналізу однорідності. Апікальну поверхню клітин піддавали впливу вологого 95% повітря / 5% CO<sub>2</sub>, а також замінювали базолатеральне середовище та відмивали муцин кожні 24-48 год.

**Матеріали, що досліджуються.** Продукт, що досліджувався, – енісаміум – був наданий ПАТ «Фармак». Препарат для позитивного контролю – озельтамівіру карбоксилат – отриманий від Toronto Research Chemicals, TRC (м. Торонто, Канада).

**Вірусний агент.** У NHBE було інокульовано віруси грипу А шляхом взаємодії апікальної поверхні клітин із вірусом грипу. Після інкубації протягом 1 год вірусний інокулянт видаляли від клітин, апікальний бік клітин промивали натрій-фосфатним буферним розчином (Phosphate Buffered Saline, PBS).

**Введення матеріалу, що досліджується.** Для проведення позитивного контролю (використання озельтамівіру карбоксилату) культура NHBE інкубувалася з базального боку з озельтамівіром протягом 60 хв до зараження вірусом. Енісаміум або контроль додавався до базального компартменту культури клітин до або після інокуляції та інкубувався протягом визначеного умовами експерименту періоду.

### Результати

Таблиця 1. Противірусна активність енісаміуму щодо вірусів грипу А та В у культурі диференційованих NHBE

Доза препарату, (мкмоль) <sup>a</sup>	Титри вірусу грипу (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /мл ± SD)				
	A/GA/20/06 (H1N1) H275Y	A/Brisbane/59/07 (H1N1)	A/TN/1-560/09 (H1N1)	A/Perth/16/09 (H3N2)	B/Texas/06/11
0	6,9±0,4	5,58±0,1	7,58±0,7	6,7±0,5	6,8±0,4
Озельтамівір <sup>b</sup>	6,0±0,4 (-0,9)	3,08±0,6 (-2,5) <sup>c</sup>	3,75±0,4 (-3,8)	3,0±0,4 (-3,2)	4,9±0,3 (-1,8)
Енісаміум					
40	6,5±0,0 (-0,4)	5,67±0,1 (ND)	6,50±0,3 (-1,1)	6,2±0,9 (-0,5)	6,2±0,6 (-0,6)
200	6,2±0,6 (-0,8)	5,50±0,3 (-0,1)	6,75±0,0 (0,8)	6,3±0,1 (-0,3)	5,8±0,5 (-1,0)
600	5,1±0,3 (-1,8)	4,33±1,0 (-1,25)	5,67±0,1 (-1,9)	4,8±0,4 (-1,8)	4,8±0,4 (-1,9)
1000	4,8±0,5 (-2,1)	3,25±0,5 (-2,3) <sup>c</sup>	4,83±0,1 (-2,8)	4,1±0,7 (-2,6)	4,6±0,1 (-2,2)

<sup>a</sup> NHBE було інокульовано вірусом грипу у такій кількості, що показник множинності інфекції (multiplicity of infection, MOI) становив 0,01 PFU/клітину (PFU – plaque-forming unit, бляшкоутворююча одиниця – окрема інфекційна вірусна частка в суспензії вірусів, що виявляється за утворенням бляшки). Після адсорбції протягом 1 год енісаміум додавався до базального компартменту у вказаній дозі та інкубувався протягом 24 год при 37 °С у середовищі з вмістом CO<sub>2</sub> на рівні 5%. Віруси, що вивільнялися з апікального боку NHBE клітин, збирали через 24 год після інокуляції.

<sup>b</sup> Концентрація озельтамівіру карбоксилату становила 1 мкмоль.

<sup>c</sup> Титри вірусів визначалися в MDCK-клітинах за допомогою TCID<sub>50</sub>-аналізу та виражалися у log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>/мл. Різниця середніх титрів вірусу (виражених як log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>/мл) між інфікованими вірусом необробленими препаратом і обробленими енісаміумом NHBE вказана в круглих дужках.

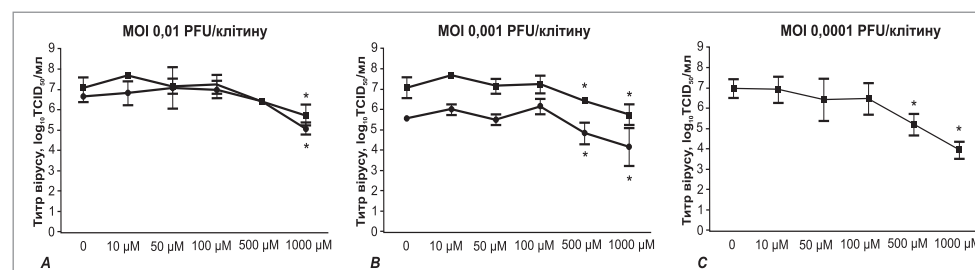


Рис. 2. Інгібіторна активність енісаміуму щодо різних MOI вірусу грипу A/Brisbane/59/2007 (H1N1)

Диференційовані NHBE були інфіковані вірусом грипу A/Brisbane/59/2007 (H1N1) у такій кількості, що показник MOI становив 0,01 PFU/клітину (А), 0,001 PFU/клітину (В) та 0,0001 PFU/клітину (С). Енісаміум (1000, 500, 100, 50, і 10 мкмоль) додавався до базального компартменту через 1 год після інокуляції вірусу. Змиви з апікальної поверхні клітин збирали через 24 год (чорні кружки) та 48 год (чорні квадрати) після зараження та титрувалися за допомогою TCID<sub>50</sub>-аналізу. Межове значення, що визначалося в ході аналізу, становило 0,75 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>/мл.



## результати міжнародного дослідження

Таблиця 2. Проникність енісаміуму у диференційовані NHBE

Доза препарату, (мкмоль) <sup>a</sup>	n <sup>b</sup>	Концентрація у NHBE (середнє значення ± SD, нг) <sup>c</sup>	Проникність (%)
10	3	36,8±3,8	1,4
50	3	213±34	1,6
100	3	410±77	1,6
500	3	1727±108	1,3
1000	3	3009±132	1,1

<sup>a</sup> Енісаміум у зазначених дозах інкубували з диференційованими NHBE при 37 °С в атмосфері з вмістом CO<sub>2</sub> на рівні 5% протягом 24 год у середовищі для росту бронхіальних епітеліальних клітин, що не містили сироватки (serum-free Bronchial Epithelial Cell Growth Medium).

<sup>b</sup> Кількість повторень експерименту.

<sup>c</sup> Клітинні екстракти збирали та визначали концентрацію енісаміуму за допомогою LC-MS-MS. Концентрація виражалася в нг на 10<sup>6</sup> клітин.

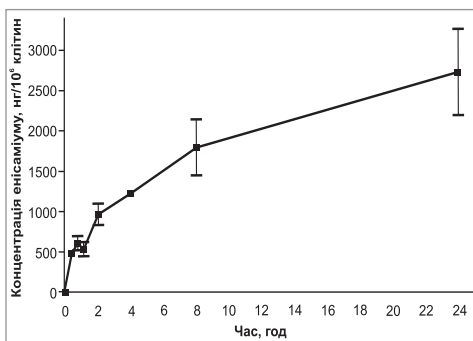


Рис. 3. Кінетика внутрішньоклітинного поглинання енісаміуму

Неінфіковані NHBE обробляли 1000 мкмоль енісаміуму, потім клітини відбирали через 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 і 24 год після контакту з досліджуваною речовиною. Представлені концентрації енісаміуму в клітинах.

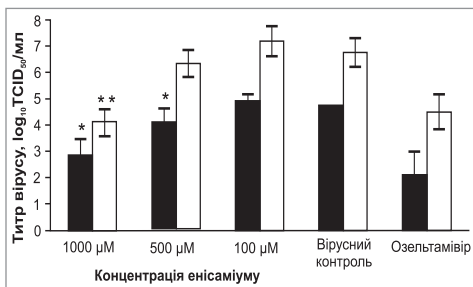


Рис. 5. Ефект попередньої інкубації NHBE з енісаміумом перед інюляцією вірусу

Диференційовані NHBE були попередньо оброблені енісаміумом 1000, 500, 100 мкмоль за 24 год до інюляції. Через 24 год до NHBE було інюльовано вірус грипу A/Brisbane/59/2007 (H1N1) у такій кількості, що показник MOI дорівнював 0,001 PFU/клітину; енісаміум знаходився у культуральному середовищі з базального боку протягом усього експерименту. Озельтамівіру карбоксилат (1 мкмоль) було додано до базального компартменту за 1 год до інюляції вірусу, він знаходився там протягом усього експерименту. Час інюляції вірусу вказується як 0 год. Супернатанти збирали через 24 год (чорні стовпчики) і 48 год (білі стовпчики) після інюлювання.

Детальний аналіз отриманих даних дозволив зробити декілька важливих висновків.

- Енісаміум дозозалежно знижує реплікацію всіх досліджуваних вірусів грипу, в тому числі сезонного H1N1, що мав мутацію H275Y NA, і виявляє ефективність проти штамів, резистентних до озельтамівіру.
- Противірусна ефективність енісаміуму є дозозалежною, а ефект більш виражений при нижчих інфекційних дозах.
- Максимальна ефективність енісаміуму спостерігається при його застосуванні протягом 8 год після зараження.
- Внутрішньоклітинна концентрація енісаміуму, що досягається при його додаванні в кількості 1000 мкмоль під час інюлювання, корелює з противірусною ефективністю.

Було виявлено активність енісаміуму проти вірусу грипу, що підтверджує дані про його клінічну ефективність. Хоча механізм дії препарату остаточно не ідентифіковано, отримані дані дозволяють припустити, що енісаміум впливає на реплікацію вірусів грипу. В експериментах, що передбачали додавання енісаміуму одразу після інюлювання або в ранні терміни, зниження експресії М-гена і вірусних титрів указувало на здатність препарату інгібувати синтез вірусної РНК. Цікаво, що вірусні титри продовжували збільшуватися в присутності енісаміуму, тому можна зробити висновок, що він пригнічує реплікацію вірусу грипу, але не інгібує її повністю.

## Пояска

Ця робота фінансувалася ПАТ «Фармак». Ми висловлюємо глибоку вдячність доктору Джону Моррі (John Morrey), Дональду Смі (Donald Smece) та Олені А. Говорковій (Elena A. Govorkova) за цінні поради та корисні обговорення під час цих досліджень.

Постерна презентація результатів дослідження, присвяченого вивченню ефективності Амізону, привернула увагу міжнародної медичної спільноти. Отримані дані та можливості, які вони відкривають для лікування грипу та ГРВІ, прокоментували авторитетні світові експерти.



**Олена Говоркова (MD, PhD)** – директор лабораторії відділу інфекційних захворювань Дитячого дослідницького госпіталю ім. св. Іуди (м. Мемфіс, штат Теннессі, США) і один з провідних фахівців Американського національного центру з вивчення і контролю грипу. Сфера її наукової діяльності охоплює дослідження ефективності препаратів проти вірусів грипу (в т. ч. високопатогенних штамів) та вивчення молекулярно-біологічних і генетичних властивостей резистентних вірусів. Автор понад 110 оригінальних наукових публікацій у провідних міжнародних журналах, власник декількох російських і американських патентів. Є членом ряду наукових товариств, а також редакційних рад журналів Antiviral Research, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vaccine, Journal of Infectious Diseases.

– Розробка та вивчення нового лікарського засобу – складний і багатоступеневий процес. Доклінічні дослідження проводяться з використанням культур клітин і на лабораторних тваринах. Під час їх виконання слід оцінити не тільки ефективність і профіль безпеки препарату, а й зрозуміти можливий механізм його дії. У культурі клітин визначають пригнічення специфічної вірусної активності і зниження вірусних титрів із установленням дозозалежного ефекту. В експериментах на тваринах оцінюють ступінь захисту від грипозної інфекції на тлі застосування препарату.

На клінічній стадії досліджень найбільш важливими залишаються критерії оцінки стану пацієнта: вираженість основних клінічних симптомів, тривалість захворювання, наявність ускладнень. Разом із тим необхідно використовувати і вірусологічні критерії, що дозволяють оцінювати рівень зниження реплікації вірусу у верхніх дихальних шляхах людини.

Для встановлення механізму дії досліджуваних препаратів застосовується низка високотехнологічних підходів. До них належать різні молекулярно-генетичні методи, скринінг рецепторів, визначення рівня цитокінів і хемокинів, а також аналіз клітинних факторів.

Одним з багатообіцяючих противірусних препаратів для лікування грипу та ГРВІ є Амізон – оригінальна хімічна сполука, що належить до похідних ізонікотинової кислоти. За результатами клінічних досліджень, проведених у Науково-дослідному інституті грипу МОЗ РФ (м. Санкт-Петербург), Амізон виявляє виражений клінічний ефект при грипу та ГРВІ.

У рамках Третього противірусного конгресу було представлено переконливі дані щодо активності Амізону (енісаміуму) відносно вірусів грипу та деяких інших РНК-вмісних респіраторних вірусів.

Амізон – це оригінальний лікарський засіб. Поки ні на ринку США, ні на ринках інших економічно розвинених країн хіміко-фармацевтичних аналогів цього препарату немає.



**Дейвід Болц (PhD)** – науковий співробітник відділу мікробіології і молекулярної біології Іллінойського технологічного інституту (м. Чикаго, штат Іллінойс, США). Понад 10 років вивчає проблематику патогенезу вірусних захворювань, проводить доклінічні дослідження противірусної активності вакцин і хімотерапевтичних препаратів. Є членом Американського товариства вірусологів (American Society for Virology).

– Нами було досліджено активність енісаміуму щодо вірусів грипу і респіраторно-синцитіального вірусу *in vitro*. В експерименті з використанням клітин NHBE було продемонстровано, що енісаміум (Амізон) ефективно (більш ніж у 100 разів) пригнічує реплікацію різних підтипів вірусів грипу А (H1N1, H1N1pdm09 і H3N2), а також грипу В. Крім того, енісаміум (Амізон) інгібував реплікацію резистентного до озельтамівіру вірусу грипу А (H1N1) з мутацією H275Y. У додаткових експериментах, в яких енісаміум (Амізон) додавали до клітин NHBE через різні проміжки часу, впливаючи на різні стадії циклу реплікації вірусу грипу, відзначено значне зниження вірусних титрів ( $p < 0,05$ ) протягом 8 год після інюлювання клітин. При додаванні енісаміуму (Амізону) протягом перших 4 год після інюлювання зафіксовано зниження титру вірусу більш ніж у 100 разів, що свідчить про його терапевтичний вплив уже на початковій стадії реплікації вірусу грипу.

Установлено, що енісаміум (Амізон) ефективно пригнічує реплікацію респіраторно-синцитіального вірусу в клітинах NHBE (більш ніж у 100 разів), що корелює зі значним зниженням внутрішньоклітинного рівня вірусної РНК.

Таким чином, енісаміум (Амізон) реалізує активність щодо вірусів грипу А і В та респіраторно-синцитіального вірусу *in vitro*. Отримано попередні результати, що свідчать про високу активність енісаміуму (Амізону) відносно адено- і коронавірусів.

Ураховуючи доступні на сьогодні дані, варто припустити, що енісаміум (Амізон) може діяти як противірусний засіб широкого спектру дії, що є суттєвою перевагою у разі поєднання грипу та інших ГРВІ.

Поєднання високої клінічної ефективності і привабливого профілю безпеки дозволяє рекомендувати застосування Амізону в складі комплексної терапії грипу та ГРВІ.

Сподіваємося, що оприлюднені дані дослідження ефективності енісаміуму йодиду (Амізону) будуть успішно інтегровані в міжнародну практику лікування зазначених патологій, а досягнення вітчизняної фармації на світовій медичній арені стануть ще одним приводом пишатися своєю країною.

Підготувала **Ольга Радучич**

Матеріали надані компанією «Фармак».