

ВИРУСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ГРИППА

ИСТОРИЯ И СОВРЕМЕННОЕ РАЗВИТИЕ

Грипп является острым респираторным заболеванием, наносящим вред здоровью людей и приводящим к огромным экономическим потерям. Борьба с этим заболеванием входит в приоритетные задачи здравоохранения многих стран мира и имеет важное медико-социальное значение [1, 2]. В дополнение к вакцинации как основной стратегии борьбы против гриппа Всемирная организация здравоохранения рекомендует применение противовирусных препаратов. Разработка таких препаратов началась в 60-е годы прошлого века, когда пришло понимание тонких процессов вирусной репликации и возможности подавлять ее отдельные стадии, не оказывая эффекта на значимые для самой клетки метаболические процессы.

Ключевые слова: грипп, противовирусные препараты, Арбидол.

I.A. LENEVA, Biology Doctor

Mechnikov Scientific and Research Institute of Vaccines and Serums, Russia, Moscow

VIRUS-SPECIFIC THERAPY OF INFLUENZA, HISTORY AND MODERN STATE

Influenza is an acute respiratory disease that harms human health and leads to huge economic losses. The fight against this disease is included in the priorities of healthcare in many countries and has important medical and social importance [1, 2]. In addition to vaccination as the main strategy in the fight against flu, the World Health Organization recommends the use of antiviral drugs. The development of such drugs began in the 60s of the last century, when the scientists became to understand the subtle processes of viral replication and the ability to suppress its individual stages, without exerting a significant effect on the cells metabolic processes.

Keywords: influenza, antiviral drugs, Arbidol

Важнейшим достижением в химиотерапии вирусных инфекций по праву считается создание первых противогриппозных препаратов адамантанового ряда амантадина и римантадина, которые были найдены путем широкого скрининга среди химического ряда адамантанов, причем амантадин к этому времени уже широко использовался для лечения болезни Паркинсона [3–5].

Подобный подход был использован для поиска и разработки отечественного препарата Арбидол (МНН умифеновир). В течение ряда лет в Центре по химии лекарственных средств (ЦХЛС) проводились широкие исследования по поиску новых лекарственных средств в ряду производных индола, гетероциклическая структура которого лежит в основе многих природных биологически активных веществ, включая алкалоиды, аминокислоты, а также некоторых лекарственных препаратов. К числу последних принадлежал созданный в ЦХЛС препарат димекарбин, который в течение ряда лет использовался для лечения гипертонической болезни и явился ключевым соединением при создании Арбидола. Модификации структуры димекарбина, проведенные ЦХЛС в тесной кооперации с Медицинским радиологическим научным центром Российской академии медицинских наук, путем последовательного введения различных атомов и химических групп в бензольное ядро индола и в саму индольную молекулу, позволили получить новое оригинальное соединение с выраженной противовирусной активностью *in vitro* и *in vivo*. Анализ зависимости «структура – активность»,

проведенный в процессе разработки Арбидола, позволил предположить, что сочетание в его молекуле биогенной основы (структура индола) и высоко реакционноспособных функциональных заместителей в индольном кольце позволило создать оригинальный препарат, обладающий широким спектром биологической активности: вирус-специфическим действием, антиоксидантной, иммуномодулирующей и интерферониндуцирующей активностью. Все эти свойства обеспечили выраженную эффективность Арбидола в отношении гриппа и безопасность препарата на моделях животных. Далее это было подтверждено клиническими испытаниями препарата в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (г. Санкт-Петербург) и ряде клиник, включая ведущие научные учреждения бывшего СССР, проведенными в периоды эпидемических вспышек гриппа (1983–1990 гг.) с охватом более чем 10 тыс. пациентов, включая 500 детей [6–7].

На основании вышесказанного приказом Минздрава СССР №229 от 23 марта 1988 г. Арбидол был разрешен для медицинского применения у взрослых и детей старше 6 лет в качестве профилактического и лечебного средства при гриппе и других острых респираторных инфекциях (ОРВИ).

Актуальность проблемы гриппозной инфекции, успехи в терапии гриппа, развитие молекулярной биологии и достижения медицинской науки инициировали дальнейший поиск и разработку противовирусных препаратов с использованием новых технологий. В 90-е годы прошлого века получение кристаллов поверхностного

белка вируса гриппа фермента NA (NA – EC 3.2.1.18) и изучение его функциональной структуры с использованием X-кристаллографии открыло новую эру в направленном синтезе его ингибиторов, так называемый подход drug design (мишень-ориентированный поиск) [8]. Идея создания ингибиторов нейраминидазы заключалась в поиске аналога субстрата нейраминидазы – сиаловой кислоты, связывающегося сильнее, чем она с активным сайтом нейраминидазы. Исследования увенчались созданием высокоспецифичных противогриппозных препаратов второго поколения – ингибиторов нейраминидазы занамивира и озельтамивира [9–10].

В настоящее время многие препараты претендуют на роль противовирусных, таковыми не являясь. Поэтому установление механизма действия и выявление его мишени принципиально важно для любого противовирусного препарата и лежит в основе его доказательной базы. В настоящее время для получения разрешения на клинические испытания препарата как противовирусного средства в FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США) необходимым условием является предоставление данных о вирусспецифической мишени и механизме действия [11]. В тех случаях, когда для создания ингибиторов нейраминидазы использовался подход целенаправленного «drug design», мишень действия – нейраминидаза не вызывает сомнений. Для препаратов, обнаруженных эмпирически в результате широкого скрининга и обладающих оригинальной химической структурой, отличной от известных ранее противовирусных препаратов, данные о вирусспецифической мишени принципиально важны.

Изучение механизма действия препаратов адамантанового ряда представляет собой одну из увлекательнейших страниц в истории молекулярной биологии вируса гриппа, оно привело к открытию нового белка вируса гриппа M2 и показало, что эти препараты блокируют ионные каналы, образуемые им [12–14].

Исследования механизма вирусспецифического действия Арбидола начались в период его доклинического изучения в ЦХЛС. Первые исследования показали, что Арбидол не влияет на такие стадии вирусной репродукции, как транскрипция и трансляция, адсорбция вируса на клеточной поверхности, а также нейраминидазную активность вируса гриппа. С использованием метода расщепления флуоресценции было показано, что Арбидол ингибирует слияние вирусной оболочки с мембранами эндосом, происходящее внутри клеток [15–16].

Актуальность проблемы гриппозной инфекции, успехи в терапии гриппа, развитие молекулярной биологии и достижения медицинской науки инициировали дальнейший поиск и разработку противовирусных препаратов с использованием новых технологий

Следующая часть работы, целью которой было установление конкретных структур мембраны клетки и вирусных белков, обеспечивающих взаимодействие с ними, была проведена во Всемирной лаборатории ВОЗ по гриппу в Национальном институте медицинских исследований (Лондон, Великобритания) и финансово поддержана грантом фонда WellcomeTrust. Для исследования был использован широко применяемый в таких случаях подход – получение и изучение мутантов, устойчивых (резистентных) к препарату. Мутанты, резистентные к Арбидолу, были получены в культуре клеток MDCK, и определение нуклеотидной последовательности их геномов показало, что все арбидолрезистентные мутанты имеют мутации в гене, кодирующем субъединицу NA 2 в NA в различных позициях. Это указывало на NA как мишень действия Арбидола [17]. Известно, что NA играет ведущую роль в осуществлении слияния липидной оболочки вируса с мембранами эндосом при проникновении вируса в

АРБИДОЛ®. НАДЕЖНОСТЬ ФАКТОВ, ДОКАЗАННЫХ КЛИНИЧЕСКИ

ИССЛЕДОВАНИЯ ПОКАЗАЛИ¹

- Сокращает общую продолжительность гриппа на 2,8 суток
- Облегчает тяжесть симптомов
- Снижает риск развития пневмонии на 98%



1 – при гриппе, при условии начала приема препарата в первые 48 часов от начала заболевания, по сравнению с отсутствием противовирусной терапии. Малеев В.В., Селькова Е.П. с соавт. Фармакоэпидемиологическое исследование течения гриппа и других ОРВИ в сезоне 2010/11 гг. Инфекционные болезни, 2012, т. 10, №3, С.15-23.»

клетки. Изучение пространственной структуры молекулы НА показало, что при низком pH в эндосомах молекула НА подвергается структурным изменениям, которые запускают процесс слияния липидной мембраны вируса с мембранами клеток, приводящее, в конечном итоге, к освобождению и воспроизводству вирусного генома [17]. Необходимые для НА конформационные изменения идентифицируются экспериментально с помощью конформационных антител, различающих НА в нативном состоянии и состоянии при низком pH. С использованием двух типов конформационных антител были изучены конформационные изменения НА арбидолрезистентных мутантов в сравнении с НА вируса дикого типа, из которого эти мутанты были получены. Процесс перехода НА из нативного состояния в активное состояние для дикого типа вируса имеет место при pH = 5,0, однако для арбидолрезистентного штамма этого же вируса имеет место при pH = 5,2, то есть при pH выше, чем для вируса дикого типа. Кроме того, добавление Арбидола к НА дикого типа вызывало сдвиг конформационного перехода НА на 0,2 единицы, в то время как добавление Арбидола к НА резистентных вирусов не оказывало влияния на значение pH, при котором конформационные изменения НА имели место при отсутствии Арбидола. Таким образом, НА арбидолрезистентных штаммов не был чувствителен к действию Арбидола [17–18].

Полученные данные позволили сделать вывод о том, что вирусспецифической мишенью действия Арбидола в цикле вирусной репродукции является НА вируса гриппа. Эти данные были опубликованы международным коллективом исследователей из России и Великобритании в международном журнале *Antiviral Research* [17]. Эти данные, наряду с опытом успешного и безопасного использования препарата в России и на территории стран СНГ, совокупностью экспериментальных и клинических исследований, явились основанием для того, чтобы ВОЗ присвоила Арбидолу международный код АТХ как противовирусному препарату прямого действия (J05A – Direct acting antivirals), подтвердив тем самым, что объем доказательной базы Арбидола соответствует требованиям, предъявляемым ВОЗ к препаратам прямого противовирусного действия.

Изучение механизма действия препаратов адамантанового ряда представляет собой одну из увлекательнейших страниц в истории молекулярной биологии вируса гриппа, оно привело к открытию нового белка вируса гриппа М2 и показало, что эти препараты блокируют ионные каналы, образуемые им

В последние годы наблюдается всплеск интереса к Арбидолу у научной общественности, включая зарубежных исследователей с мировыми именами. К настоящему времени Арбидол является единственным лицензированным противогриппозным препаратом, мишенью действия которого является НА, однако, каким именно образом

Арбидол воздействует на вирусный белок, оставалось невыясненным [17–20]. Ответ на этот вопрос был получен группой известных американских ученых из ведущего научного центра The Scripps Research Institute, La Jolla, Сан-Диего, Калифорния, в котором работают несколько лауреатов Нобелевской премии в области естественных наук. Это исследование было выполнено на средства от гранта, полученного учеными от Национального института здоровья США (NIH), поддерживающего инновационные перспективные разработки, и результаты были опубликованы в авторитетном международном журнале PNAS, являющемся вторым по цитируемости в мире [21]. Американские ученые И. Уилсон и Р. Кадам являются признанными лидерами в области изучения пространственной структуры НА, в частности, им удалось исследовать структуру НА смертоносного пандемического вируса гриппа, вызвавшего «испанку» в 1918 г. Они получили кристаллы белка НА двух различных штаммов вируса гриппа H7N9 (А/Шанхай/2/2013; H7/SH2) и H3N2 (А/Гонконг/1/1968; H3/НК68) в комплексе с Арбидолом. Оказалось, что Арбидол связывается с верхней частью НА на расстоянии приблизительно 16 Å от «пептида слияния», причем с одним тримером НА связываются три молекулы Арбидола. В состав сайта связывания входят аминокислотные остатки Arg54-Glu57 α-спирали А, Lys58-Asn60 петли В, Trp92-Glu103 из спирали С субъединицы НА2. Кроме того, в образовании сайта связывания участвуют аминокислоты Pro293, Phe294 и Arg307, расположенные в С-концевых петлях субъединицы НА1 [21].

Сайт связывания характеризуется наличием соляных мостиков, образованных аминокислотами. После взаимодействия с Арбидолом происходит разрушение части существующих соляных мостиков и образование новых нековалентных связей, приводя к переориентировке аминокислот, что раскрывает полость, в которую входит молекула Арбидола. Эти мостики, различные в случае двух изученных штаммов вирусов, в целом при взаимодействии с H7/SH2 способствуют более значительным фундаментальным конформационным изменениям, чем при взаимодействии с H3/НК68. Однако в обоих случаях молекула Арбидола имеет высокую степень комплементарности к сайтам связывания, и в целом примерно 565–580 Å² поверхностной площади Арбидола погружено в НА, а коэффициент поверхностной комплементарности оценивается в ~0,75–0,8 (где 1 – идеальное соответствие) [21]. Это свидетельствует о крайне специфичном характере взаимодействия Арбидола с НА по системе «ключ – замок».

Таким образом, Арбидол взаимодействует с НА вируса гриппа, увеличивая его стабильность к конформационным изменениям, индуцированным низким pH, и, как следствие, ингибирует процесс слияния липидной оболочки вируса с мембранами эндосом, приводящего к освобождению вирусного нуклеокапсида и началу транскрипции вирусного генома. Совокупность полученных данных позволяет классифицировать Арбидол как первый противогриппозный препарат, направленный на НА вируса гриппа, и дает понимание его отличия от ингиби-

торов нейраминидазы озельтамивира и занамивира, направленных на второй поверхностный белок вируса гриппа – фермент нейраминидазу. Если ингибиторы нейраминидазы не позволяют вновь высвободившимся вирусам освободиться с поверхности клетки и распространяться дальше, то Арбидол не дает вирусу войти в клетки.

Арбидол взаимодействует с НА вируса гриппа, увеличивая его стабильность к конформационным изменениям, индуцированным низким pH, и, как следствие, ингибирует процесс слияния липидной оболочки вируса с мембранами эндосом, приводящего к освобождению вирусного нуклеокапсида и началу транскрипции вирусного генома

Определение строения центра связывания Арбидола с НА создает основы для мишень-ориентированного рационального дизайна новых молекул среди аналогов Арбидола с улучшенными свойствами. В настоящее время несколько научных групп в мире занимаются исследова-

ниями «структура – активность» в ряду аналогов Арбидола с использованием различных методов [20, 22–24]. В частности, группа, получившая комплекс Арбидола с НА и изучившая его методом рентгено-структурного анализа [21], используя полученные данные о сайте связывания НА с Арбидолом, синтезировала его новые аналоги путем добавления метагидроксила к тиофенольной группе и замены новой группировкой молекулы воды в сайте связывания, связь которых с НА была намного сильнее, чем связь Арбидола с НА [24].

Таким образом, в настоящее время совокупность накопленных экспериментальных данных, полученных как в России, так и в мире, успешный опыт клинического использования препарата, показавший его высокую эффективность и благоприятный профиль безопасности, позволяет рассматривать Арбидол как базисную молекулу, на основе которой могут быть разработаны новые фармакологические препараты, обладающие большей специфичностью в отношении конкретных вирусов и, как следствие, проявляющие более выраженный терапевтический и профилактический эффект.



ЛИТЕРАТУРА

1. <http://www.who.int/influenza/en/>.
2. Постановление от 30.06.2017 №92 «О мероприятиях по профилактике гриппа и острых респираторных вирусных инфекций в эпидемиологическом сезоне 2017–2018 годов». <http://rospotrebnadzor.ru/deyatelnost/epidemiological-surveillance>.
3. Davies WL, Grunert RR, Haff RF et al. Antiviral activity of 1-adamantamine. *Science*, 1964, 144: 862-3.
4. Nicholson KG, Wiselka MJ. Amantadine for influenza A. *British Medical Journal*, 1991, 302: 425-6.
5. Zlydnikov DM, Kubar OI, Kovaleva TP, Kamforin LE. Study of rimantadine in the USSR: a review of the literature. (Review). *Rev. Infect. Dis.*, 1981, 3: 408-421.
6. Glushkov RG. Arbidol. Antiviral, Immunostimulant, Interferon inducer. *Drug of the Future*, 1992, 17: 1079-81.
7. Гуськова Т.А., Глушков Р.Г. Арбидол – иммуномодулятор, индуктор интерферона, антиоксидант. М.: Тимотек, 1999. 93с.
8. Laver WG. Crystallization and peptide maps of neuraminidase “heads” from H2N2 and H3N2 influenza virus strains. *Virology*, 1978, 86: 78-87.
9. Laver WG, Bischofberger N, Webster RG. Disarming Flu Viruses. *Scientific American*, 1999, 280: 78-87.
10. von Itzstein M, Wu W-Y, Kok GB et al. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza replication. *Nature*, 1993, 363: 418-23.
11. Guidance for Industry Antiviral Product Development – Conducting and Submitting Virology Studies to the Agency. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) June 2006. <https://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/05d-0183-gdl0002-01.pdf>.
12. Lamb RA, Lai CJ, Chopin PW. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: collinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1981, 78: 4170-4.
13. Hay A. Amantadine and Rimantadine-Mechanisms. In book: Antiviral Drug Resistance. Edited by Richman D. John Wiley and Sons Ltd, 1996: 44-58.
14. Hay AJ, Wolstenholme AJ, Skehel JJ, Smith MH. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO Journal*, 1985, 4: 3021-3024.
15. Глушков Р.Г., Фадеева Н.И., Ленева И.А. и др. Молекулярно-биологические особенности действия арбидола-нового противовирусного препарата. *Хим.-фарм. журнал*, 1992, 2: 8-15.
16. Фадеева Н.И., Ленева И.А., Панишева Е.К. и др. Ингибиторы ранних стадий вирус-клеточного взаимодействия среди производных 3-карбоксии-5-окси-6-броминдола. *Хим.-фарм. журнал*, 1992, 9: 9-11.
17. Leneva IA, Russell RJ, Boriskin YS, Hay AJ. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antiviral Res*, 2009, 81(2): 132-40. doi: 10.1016/j.antiviral.2008.10.009.
18. Boriskin Y, Leneva I, Pecheur E, Polyak S. Arbidol: a broad-spectrum antiviral compound that blocks viral fusion. *Curr Med Chem*, 2008, 15(10): 997-05. doi: 10.2174/092986708784049658
19. Nasser ZH, Swaminathan K, Müller P, Downard KM. Inhibition of influenza hemagglutinin by the antiviral inhibitor arbidol using a proteomics based approach and mass spectrometry. *Antiviral Res*, 2013 Nov, 100(2): 399-406. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.08.021.
20. Blaising J, Polyak SJ, Pécheur EI. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: an update. *Antiviral Res*, 2014, 107: 84-94. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.04.006.
21. Kadama RU and Wilson IA. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017 Jan 10, 114(2): 206-214. doi: 10.1073/pnas.1617020114.
22. Brancato V, Peduto A, Wharton S, Martin S, More V, Di Mola A, Massa A, Perfetto B, Donnarumma G, Schiraldi C, Tufano MA, de Rosa M, Filosa R, Hay A. Design of inhibitors of influenza virus membrane fusion: synthesis, structure-activity relationship and in vitro antiviral activity of a novel indole series. *Antiviral Res*, 2013 Aug, 99(2): 125-35. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.05.005.
23. Scuotto M, Abdelnabi R, Collarile S, Schiraldi C, Delang L, Massa A, Ferla S, Brancato A, Leysen P, Neyts J, Filosa R. Discovery of novel multi-target indole-based derivatives as potent and selective inhibitors of chikungunya virus replication. *Bioorg Med Chem*, 2017 Jan 1, 25(1): 327-337. doi: 10.1016/j.bmc.2016.10.037.
24. Wright ZVF, Wu NC, Kadam RU, Wilson IA, Wolan DW. Structure-based optimization and synthesis of antiviral drug Arbidol analogues with significantly improved affinity to influenza hemagglutinin. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017 Aug 15, 27(16): 3744-3748. doi: 10.1016/j.bmlc.2017.06.074.