

Изучение лечебной эффективности нового отечественного препарата Ингавирин® в отношении возбудителя гриппа А (H3N2)

С. Я. ЛОГИНОВА¹, С. В. БОРИСЕВИЧ¹, В. А. МАКСИМОВ¹, В. П. БОНДАРЕВ¹, В. Е. НЕБОЛЬСИН²

¹ Вирусологический центр Филиала 48 Центрального научно-исследовательского института Министерства обороны Российской Федерации, *Сергиев Посад*

² ОАО «Валента Фармацевтика», *Москва*

Therapeutic Efficacy of Ingavirin®, a New Russian Formulation Against Influenza A Virus (H3N2)

S. YA. LOGINOVA, S. V. BORISEVICH, V. A. MAKSIMOV, V. P. BONDAREV, V. E. NEBOLSIN

Central Research Institute No. 48 of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Virological Centre *Sergiev Posad*.
Valenta Farmaceutica, *Moscow*

При изучении лечебной эффективности препарата Ингавирин® (ОАО «Валента Фармацевтика», Россия) при экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа А (H3N2) в сравнении с препаратами Тамифлю®, Ремантадин® и Арбидол® установлено, что Ингавирин® в суточных дозах 15 и 20 мг/кг (равноэффективные дозы для человека - 90 и 120 мг) эффективно защищает белых мышей, инфицированных в дозе 10–15 LD₅₀. Защитная эффективность препарата составила 38,3–39,2%, увеличение среднего времени жизни — 4,2–4,4 сут. Эффективность Ингавирина® была сравнима с эффективностью Ремантадина®, значительно превосходила эффективность Арбидола® и уступала по эффективности Тамифлю®. Изучение влияния препарата в дозах 15 и 20 мг/кг на динамику и уровень репродукции вируса гриппа, штамм А/Аichi/2/68 в легких инфицированных белых мышей массой 10–12 г выявило, что во всех изученных дозах на протяжении всего срока наблюдения Ингавирин® эффективно подавлял репродукцию вируса гриппа. В течение всего периода наблюдения (5 суток) отмечено эффективное подавление Ингавирином® образования вирусспецифического геммагглютинина в органе-мишени.

Ключевые слова: грипп А, Ингавирин®, лечение, противовирусная эффективность.

Investigation of the therapeutic efficacy of Ingavirin® (Valenta Farmaceutica, Russia) against influenza virus A (H3N2) vs. Tamiflu®, Remantadin® and Arbidol® showed that in daily doses of 15 and 20 mg/kg (equal by the efficacy to the human doses of 90 and 120 mg) Ingavirin® was effective in protection of the albino mice infected by the virus in a dose of 10 to 15 LD₅₀. The protective efficacy was 38.3–39.2% and the increase of the average lifespan amounted to 4.2–4.4 days. The Ingavirin® efficacy was comparable with that of Remantadine®, markedly exceeded that of Arbidol® and was lower than that of Tamiflu®. Investigation of the Ingavirin® influence in doses of 15 and 20 mg/kg on the dynamics and level of the influenza virus A/Aichi/2/68 reproduction in the lungs of the infected albino mice weighing 10–12 g revealed that during the whole observation period in the doses tested Ingavirin® was effective in inhibition of the influenza virus reproduction. During the whole period of the observation (5 days) Ingavirin® was effective in inhibiting the formation of the virus specific hemagglutinin in the target organ.

Key words: influenza A virus, Ingavirin®, therapy, antiviral efficacy.

Введение

Важным аспектом совершенствования профилактики и лечения гриппа является расширение существующего арсенала эффективных противовирусных препаратов. В настоящее время на фармацевтическом рынке представлены отечественные (ремантадин®, арбидол®) и зарубежный (тамифлю®) этиотропные средства, предназначенные для профилактики и лечения гриппа.

Производные адамантана — римантадин и амантадин были открыты в конце 60-х годов прошлого столетия, однако их эффективность в настоящее время ограничивается появляющимися резистентными штаммами вируса гриппа А. Формирование резистентности штаммов обусловлено заменой аминокислот в положениях 26, 27, 30, 31 и 34 трансмембранной части М2-канала [1, 2]. При анализе более 60000 штаммов вируса гриппа А (H3N2), выделенных в различных странах мира за последнее десятилетие, выявлено увеличение устойчивости к ингибиторам М2-каналов с 0,4% в 1995 году до 12,3% в 2004 году [1]. Частота ус-

© Коллектив авторов, 2008

Адрес для корреспонденции: 117105 Москва, Нагатинская ул, д. 3а.
Редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия»

Таблица 1. Результаты сравнительной оценки лечебной эффективности препарата Ингавирин® в отношении экспериментальной гриппозной инфекции у белых мышей, интраназально инфицированных вирусом гриппа

Препарат	Число опытов	Доза препарата, мг/кг	Гибель животных, % ($M \pm m$)	Удлинение среднего времени жизни, сутки ($M \pm m$)	Защита от гибели, % ($M \pm m$)
Ингавирин®	3	15,0	61,7±1,7	4,4±0,1	38,3±1,7
	6	20,0	60,8±0,8	4,2±0,1	39,2±0,8
Тамифлю®	5	25,0	10,0±4,5	6,9±0,1	80,0±4,5
Ремантадин®	3	25,0	46,7±3,3	4,9±0,2	53,3±3,3
Арбидол®	5	60,0	83,0±2,0	1,9±0,1	17,0±2,0
	4	135,0	85,0±2,6	1,6±2,0	15,0±2,6
Контроль дозы	—	—	100,0±0,0	—	—
Контроль стада	—	—	0,0±0,0	—	—

тойчивости оказалась самой высокой в Азии: в Китае в 2004 году резистентными были 73,8% выделенных штаммов [1]. В США также наблюдалась высокая частота устойчивости к амантадину штаммов вируса гриппа А, выделенных в сезоны 2005—2006 гг. и 2006—2007 гг. Так, у 72,0—92,3% штаммов вируса гриппа А (H3N2) и 25% штаммов вируса гриппа А (H1N1) выявлена замена аминокислоты в позиции 31 гена М2-канала. Подобные изменения коррелировали с устойчивостью к ингибиторам М2-каналов [3, 4]. Аналогичная частота резистентности к вирусу гриппа А/H3N2 (91%) наблюдалась в этот период в Канаде [5].

Зарубежными специалистами была проверена расчётная частота резистентности к ингибитору нейраминидазы (осельтамивиру) после лечения, которая составила примерно 0,32% у взрослых и 4% у детей [6]. Однако на практике эта цифра оказалась выше. Так, в январе 2008 года на территории 9 из 18 Европейских стран циркулировало 17% резистентных штаммов вируса гриппа из общего количества выделенных [7—9]. На территории США во время вспышки заболеваемости гриппа в 2007—2008 гг. 2,9% изолятов были устойчивыми к осельтамивиру. По другим данным, устойчивыми к осельтамивиру в США и Канаде оказались 8,4 и 6,3% штаммов соответственно [10].

Нельзя исключить, что к препарату арбидол, активно применяемому за последние 15 лет, также могли возникнуть резистентные штаммы возбудителя гриппа. Это подтверждают данные отечественных специалистов, которые были получены в культуре клеток [11].

Широкая циркуляция резистентных штаммов вируса гриппа А к римантадину, а также появление устойчивых штаммов к осельтамивиру в различных регионах мира делают актуальным поиск новых эффективных противовирусных препаратов.

Цель настоящей работы — оценка лечебной эффективности препарата Ингавирин® (производства ОАО «Валента Фармацевтика», Россия) в отношении экспериментальной формы гриппозной инфекции у белых мышей, интраназально

инфицированных вирусом гриппа, штамм А/Aichi/2/68 (H3N2).

Материал и методы

В работе использовали адаптированный к лёгким белых мышей вирус гриппа, штамм А/Aichi/2/68 (H3N2), полученный из НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН. Штамм А/Aichi/2/68 вируса гриппа, подтип H3N2 является прототипным по отношению к основным подтипам, циркулирующим в настоящее время.

Для моделирования экспериментальной формы гриппа А использовали белых мышей массой 10–12 г, полученных из вивария филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России — ВЦ». Животных инфицировали интраназально в дозе 10–15 ЛД₅₀.

В ходе оценки лечебной эффективности Ингавирина® проводилось его сравнение с препаратами контроля — Тамифлю® (осельтамивир), Арбидолом® и Ремантадином® (римантадин). Ингавирин® вводили животным перорально в дозах 15 и 20 мг/кг массы животных (что соответствует равноэффективным суточным дозам для человека — 90 и 120 мг); Тамифлю® — в дозе 25 мг/кг массы; Ремантадин® — в дозе 30 мг/кг массы; Арбидол® — в дозах 60 и 135 мг/кг массы животных. Все препараты вводили через 24 ч после инфицирования животных и далее ежедневно, 1 раз в сутки, в течение 5 суток.

Наблюдение за инфицированными животными проводили в течение 14 суток. Титрование возбудителя гриппа А проводили на 9-суточных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ).

Оценка противовирусной эффективности используемых лекарственных препаратов проводилась согласно требованиям, изложенным в соответствующем руководстве [12]. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по Стьюденту [13].

Основными критериями оценки лечебной эффективности препаратов *in vivo* являлись:

- показатели защиты лабораторных животных от гибели;
- среднее время жизни животных в группе;
- снижение уровня накопления вируса в легких (ΔIg).

Результаты исследования

Полученные результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о высокой лечебной эффективности Ингавирина® при использовании доз 15 и 20 мг/кг. Защитная эффективность препарата составила 38,3—39,2%, удлинение среднего времени жизни — 4,2—4,4 сут. Следует отметить, что различия лечебной эффективности препарата Ингавирин® в зависимости от использованных доз 15 и 20 мг/кг статистически не значимы.

Таблица 2. Результаты сравнительного изучения динамики и уровня подавления репродукции вируса в лёгких белых мышей, интраназально инфицированных вирусом гриппа, штамм A/Aichi/2/68, при лечении препаратом Ингавирин® и другими препаратами

Препарат	Доза препарата, мг/кг	Время отбора проб после инфицирования, ч	Уровень накопления вируса, lgЭИД ₅₀ /мл*	Снижение уровня накопления вируса, Δlg	Коэффициент ингибирования (КИ), %
Ингавирин®	15	12	0	2,3	100
		24	0	3,5	100
		48	1,5	2,4	99,8
		72	2,4	2,8	99,8
		96	2,6	3,8	99,99
		120	2,8	3,7	99,99
	20	12	0	2,3	100
		24	0	3,5	100
		48	1,5	2,4	99,8
		72	2,3	2,9	99,8
		96	2,5	3,9	99,99
		120	2,7	3,8	99,99
Тамифлю®	25	12	0	2,3	100
		24	0	3,5	100
		48	1,2	2,7	99,9
		72	1,8	3,4	99,97
		96	2,3	4,1	99,99
		120	2,5	4,0	99,99
Ремантадин®	30	12	0	2,3	100
		24	0	3,5	100
		48	1,5	2,4	99,8
		72	2,7	2,5	99,8
		96	3,1	3,3	99,98
		120	3,2	3,3	99,96
Арбидол®	60	12	0	2,3	100
		24	0,9	2,6	99,9
		48	2,4	1,5	94,0
		72	3,7	1,5	97,3
		96	4,3	2,1	99,2
		120	6,5	0	0
Контроль (без препарата)		12	2,3	—	—
		24	3,5	—	—
		48	3,9	—	—
		72	5,2	—	—
		96	6,4	—	—
		120	6,5	—	—

Примечание. * ЭИД — эмбриональная инфицирующая доза.

В качестве референс-препаратов использовали Арбидол®, Ремантадин® и Тамифлю® (осельтамивир). Препарат Тамифлю® в суточной дозе 25 мг/кг (соответствует равноэффективной суточной дозе для человека 150 мг) защищал белых мышей от гибели, в среднем, на 80%. Защитная эффективность Ремантадина® составила около 50%. Арбидол® обладает низкой защитной эффективностью в отношении экспериментальной гриппозной инфекции у белых мышей (15–17%).

В ходе изучения влияния Ингавирина® на динамику и уровень репродукции вируса гриппа (штамм A/Aichi/2/68) в лёгких инфицированных белых мышей массой 10–12 г выявлено, что во всех изученных дозах на протяжении всего срока наблюдения (5 суток) препарат эффективно подавлял репродукцию вируса гриппа (табл. 2). При этом статистически достоверных отличий эффективности подавления репродукции вируса Инга-

вирином® в дозах 15 и 20 мг/кг не наблюдалось (с вероятностью 95%).

В течение всего срока наблюдения, вплоть до терминальной фазы, референс-препараты Тамифлю® и Ремантадин® также ингибировали размножение вируса с высоким уровнем эффективности. Практически на протяжении всего срока наблюдения наименьшую эффективность проявил Арбидол®, особенно в период, совпадающий с гибелью животных.

Результаты изучения способности Ингавирина® подавлять формирование специфического гемагглютинина в лёгких инфицированных белых мышей (табл. 3) свидетельствуют о том, что препарат несколько более эффективен в дозе 20 мг/кг, чем в дозе 15 мг/кг, т. е. имеется дозозависимый эффект. Ингавирин® эффективно подавлял образование вирусспецифического гемагглютинина в лёгких на протяжении всего срока наблюдения. Коэффициент ингибирования

Таблица 3. Результаты сравнительного изучения динамики и уровня подавления образования специфического гемагглютинина в легких белых мышей, интраназально инфицированных вирусом гриппа, штамм А/Aichi/2/68, при лечении препаратом Ингавирин® и другими препаратами

Препарат	Доза препарата, мг/кг	Коэффициент ингибирования формирования гемагглютинина вируса гриппа А после инфицирования, %, через					
		12 ч	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч	120 ч
Ингавирин®	15	100±0	100±0	66,7±8,3	87,5±0,0	89,6±2,1	87,5±0,0
	20	100±0	100±0	75,0±0,0	89,6±2,1	91,3±2,1	91,7±2,1
Тамифлю®	25	100±0	100±0	91,7±8,3	93,8±0,0	95,9±2,1	97,9±1,0
Ремантадин®	30	100±0	100±0	91,7±8,3	91,3±2,1	93,8±0,0	94,8±1,0
Арбидол®	60	100±0	100±0	50,0±0,0	75,0±0,0	75,0±0,0	75,0±0,0

ния формирования гемагглютинина Ингавирином® был ниже, чем Ремантадином® и Тамифлю®, но выше, чем Арбидолом®.

Заключение

Применение Ингавирина® в суточных дозах 15 и 20 мг/кг (равноэффективные дозы для человека — 90 и 120 мг) у мышей, инфицированных вирусом гриппа А (H3N2) в дозе 10—15 ЛД₅₀, эффективно защищает белых мышей от гибели. Эффективность Ингавирина® сравни-

ма с эффективностью Ремантадина®, значительно превосходит эффективность Арбидола® и уступает Тамифлю®. Защитная эффективность Ингавирина® составила 38,3—39,2%, удлинение среднего времени жизни мышей — 4,2—4,4 суток.

Ингавирин® при использовании в дозах 15 и 20 мг/кг эффективно подавляет репродукцию вируса гриппа, штамм А/Aichi/2/68, а также образование вирусспецифического гемагглютинина в лёгких инфицированных белых мышей.

ЛИТЕРАТУРА

- Bright R. A., Medina M. J., Xu X. et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994—2005: a cause for concern. *Lancet* 2005; 366: 9492: 1175—1181.
- Hay A. J., Zambon M. C., Walstenholme A. J. et al. Molecular basis of resistance of influenza A virus to adamantane. *J Antimicrob Chemoter* 1986; 18: Suppl B: 19—29.
- Bright R. A., Shay D. K., Shu B. et al. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005—2006 influenza season in the United States. *JAMA* 2006; 295: 8: 891—894.
- Deyde V. M., Garten R., Sheu T. et al. Emerging trends in adamantane resistance: 2006—2007 influenza season. Program and Abstract Book International Conference on Emerging Infectious Disease (ICEAD), Atlanta, Georgia (USA) 16—19 March, 2008: 72; <http://www.iceid.org/>
- www.phacaspcc.ca/media/advisories_avis/2006/statment_060115
- Kiso M., Mitamura K., Sakai-Togawa Y. et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet* 2004; 364: 9436: 759—765.
- Laceny A., Hungnes O., Dudman S. G. et al. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A (H1N1) viruses in Europe. *Eurosurveillance* 2008; 13: Issue 5: 8026.
- Wetherall et al. Methodology used for testing *in vitro* susceptibility of influenza viruses to oseltamivir and zanamivir was described by the Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network (NISN). *J Clin Microbiol* 2003; 41: 742—750.
- www.euro.who.int/flu/20080131_2
- www.promedmail.org / Archive Number 20080209.0529. Published date 09-FEB-2008.
- Leneva I., Hay A. The mechanism of action of arbidol against influenza virus-selection and characterization of arbidol-resistant mutants. Abs. 12th International Congress of Virology. Paris., 2002; 1077.
- Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Минздрав РФ, 2005.
- Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: 1990.