

А.В.Катлинский, Р.И.Атауллаханов, Р.Д.Холмс, А.Н.Наровлянский,  
М.В.Мезенцева, В.Э.Щербенко, Ф.И.Ершов.

**«Гепон» и его структурные гомологи оказывают противовирусное действие в культуре клеток человека, инфицированных вирусом энцефаломиокардита.**

*ООО Иммафарма, ГНЦ-Институт иммунологии МЗ РФ, Immutic Group, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Гамалеи РАМН, Московская медицинская академия им. Сеченова*

Иммуномодулятор «Гепон» успешно применяется при лечении острых и хронических инфекционно-воспалительных процессов различной этиологии и локализации. В частности, имеются сообщения о высокой эффективности гепона в лечении респираторных вирусных инфекций [4] и герпес-вирусной инфекции [1,2]. При применении гепона в острой фазе герпес-вирусной инфекции отмечается быстрая регрессии герпетических поражений кожи и слизистых, а также быстрая эпителизация участков поражения.

Для понимания механизмов противовирусного действия гепона в данной работе изучалось влияние гепона на размножение и цитопатогенное действие вируса энцефаломиокардита (ВЭМК) в культуре клеток человека *in vitro*. Сравнение противовирусной активности гепона и его структурных гомологов позволило также исследовать связь между структурой гепона и его противовирусным действием.

### **Материалы и методы**

Клетки. В работе были использованы перевиваемые культуры клеток J-96 (культура получена из клеток крови мужчины, больного подострой моноцитарной лейкемией [5]) и L-41 (культура перевиваемых клеток, используемая для титрования активности интерферонов). Клетки культивировали в среде 199, дополненной 2 mM L-глутамина, 10% инактивированной сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота, 100 Ед/мл пенициллина и анти-PPLO.

Вирус. Использовали вирус энцефаломиокардита (ВЭМК) мышей, штамм "Колумбия SK-Co1-SK", в исходной концентрации  $10^5$  ТЦД<sub>50</sub> (тканевая цитопатогенная доза, приводящая к гибели 50% клеток) в 1 мл.

Титрование ВЭМК. Предварительно за 24 часа до проведения эксперимента культуру клеток J-96 или L-4 1, выращенную и 96-луночных пластиковых панелях

до монослоя, заражали ВЭМК в 10-кратных разведениях от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$ . Культуры клеток инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, через 24 часа учитывали цитопатогенное действие (ЦПД) вируса с использованием инвертированного микроскопа (Leitz). При исследовании гепона и его гомологов применяли дозу вируса 100 ТЦД<sub>50</sub> в 1 мл.

Препараты. Гепон тетрадекапептид ТЕККРJRETVEREKE и его структурные фрагменты, соответствующие а.к. 1-5 с N-конца (НР 1-5), а.к.1-9 (НР 1-9), а.к. 1-11 (НР1-11), а.к. 10-14 (НР 10-14), а.к. 6-14 (НР6-14), а.к.4-14 (НР4-14), а.к. 4-11 (НР4-11) и а.к. 3-12 (НР3-12), синтезированы ООО Иммафарма. В качестве препарата сравнения применяли «Ридостин» (НПО Вектор, Новосибирск), известный индуктор интерферонов, обладающий противовирусной активностью.

Исследование противовирусного действия гепона и его гомологов. Клетки линии J-96 или L-41 в концентрации 200000 клеток в 1 мл высевались в 96-луночные плоскодонные культуральные планшеты в среде 199 с добавлением 10% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота, 300 мкг/мл глутамин и 100 Ед/мл пенициллина. Раствор гепона или его пептидного гомолога вносили в культуральные планшеты склетками J-96 и L-41 в концентрации 1 мг/мл и титровали с шагом 1:2 в 24 лунках, по 3 лунки на каждую концентрацию. Эксперименты повторяли 3 раза.

Противовирусный эффект оценивался по минимально эффективной концентрации (максимально эффективное разведение) препарата, защищающей 50% клеток от цитопатогенного действия 100 ТЦД<sub>50</sub> ВЭМК в 1 мл.

## Результаты и обсуждение

### *Противовирусное действие гепона в культурах клеток J-96 и L-41.*

В контрольных культурах клеток J-96, инфицированных 100 ТЦД<sub>50</sub>/мл ВЭМК, имело место цитопатогенное действие вируса, приводящее к гибели 100% клеток. Предварительная инкубация клеток J-96 в присутствии гепона в течение 24 часов приводила к значительному повышению их устойчивости к цитопатогенному действию ВЭМК. Во всех экспериментах гепон подавлял развитие вирусной инфекции, снижая цитопатогенное действие ВЭМК со 100% до 0. Минимальная концентрация гепона, оказывающая противовирусное действие в культуре клеток J-96, составила  $2,2 \pm 1,4$  мкг/мл. Эффекты гепона были сравнимы с противовирусным действием ридостина, известного индуктора интерферонов. Ридостин оказывал противовирусное действие в культуре клеток J-96 в минимальной концентрации  $6 \pm 2$  мкг/мл (таблица 1).

Исследование вещества															Минимальная эффективная концентрация (мкг/мл), оказывающая противовирусное действие.		
Наименование (код)	Структура														Клетки J-96	Клетки L-41	
Гепон	HP1-14	T	E	K	K	R	R	E	T	V	E	R	E	K	E	2.2 ± 1.4	7.5 ± 2.5
Центральная часть	HP3-12			K	K	R	R	E	T	V	E	R	E			3.3 ± 0.8	3.3 ± 0.8
	HP4-11				K	R	R	E	T	V	E	R				1.1 ± 0.7	1.5 ± 0.6
N-концевая часть	HP1-5	T	E	K	K	R										0.5 ± 0.4	1 ± 0.2
	HP1-9	T	E	K	K	R	R	E	T	V						1 ± 0.2	15 ± 5
	HP1-11	T	E	K	K	R	R	E	T	V	E	R				1.3 ± 0.6	1.3 ± 0.6
С-концевая часть	HP10-14										E	R	E	K	E	1 ± 0.2	5 ± 0
	HP6-14						R	E	T	V	E	R	E	K	E	2.1 ± 0.4	2.1 ± 1.4
	HP4-14				K	R	R	E	T	V	E	R	E	K	E	2.9 ± 1.1	10 ± 0
Препарат сравнения "Ридостин"	дсРНК														6 ± 2	90 ± 80	

Таблица 1. Противовирусное действие гепона и его структурных гомологов в модели инфекции ВЭМК.

В культуре перевиваемых клеток L-41, как и в культуре клеток J-96, под влиянием 100 ТЦД<sub>50</sub>/мл ВЭМК имело место ЦПД, приводящее к гибели 100% клеток в течение 24 часов. Внесение гепона в культуру клеток L-41 за 24 часа до заражения ВЭМК приводило к повышению устойчивости клеток к инфекции. В концентрации 7,5±2,5 мкг/мл гепон защищал все клетки от цитопатогенного действия, индуцированного вирусом. Препарат сравнения - ридостин - защищал клетки L-41 от цитопатогенного действия ВЭМК в концентрации 89,9±80,1 мкг/мл (таблица 1).

*Противовирусное действие гомологов центральной части молекулы гепона.*

Пептиды HP3-12 и HP4-11 представляли центральную часть молекулы гепона. Пептид HP3-12 соответствовал структуре гепона, укороченной на 2 аминокислотных остатка с N-конца и 2 аминокислотных остатка с C-конца. Пептид HP4-11 соответствовал структуре гепона, укороченной на 3 аминокислотных остатка с N-конца и 3 аминокислотных остатка с C-конца. Оба пептида эффективно подавляли инфекцию ВЭМК в культурах клеток J-96 и L-41 (таблица 1). Минимальная эффективная противовирусная концентрация пептида HP3-12 оказалась равной 3,3±0,8 мкг/мл как в культуре клеток J-96, так и в культуре клеток L-41. Пептид HP4-11 оказывал эффективное противовирусное действие в культурах клеток J-96 и L-41 в концентрациях 1,1±0,7 мкг/мл и 1,5±0,6 мкг/мл, соответственно.

Из представленных данных видно, что по противовирусной активности пептиды

HP3-12 и HP4-11 практически не отличались от гепона. То есть укорочение молекулы гепона на 2 или 3 аминокислотных остатка с обоих концов полипептидной цепи не нарушало его противовирусных свойств.

*Противовирусная активность гомологов N-концевой части молекулы гепона.*

В модели инфекции ВЭМК в культуре клеток J-96 пептиды HP 1-5, HP 1-9 и HP1-11, копирующие N-конец гепона, обладали высокой противовирусной активностью. Минимальные эффективные концентрации этих пептидов оказались равными  $0,5 \pm 0,4$  мкг/мл для пептида HP 1-5,  $1 \pm 0,2$  мкг/мл для пептида HP 1-9 и  $1,3 \pm 0,6$  мкг/мл для пептида HP1-11 (таблица 1). В культуре клеток L-41, инфицированной ВЭМК, M-концевые гомологи гепона тоже оказывали выраженное противовирусное действие. Минимальные эффективные концентрации пептидов HP1-5, HP1-9 и HP1-11 составили  $1 \pm 0,2$  мкг/мл,  $15 \pm 5$  мкг/мл и  $1,3 \pm 0,6$  мкг/мл, соответственно. Следовательно, исследованные M-концевые пептиды не уступали гомону по противовирусной активности. Даже HP1-5, довольно короткий фрагмент N-концевой части гепона, в полной мере проявлял противовирусную активность.

*Противовирусная активность гомологов C-концевой части гепона.*

В модели противовирусного действия в культурах клеток J-96 и L-41 гомологи C-концевой части молекулы гепона HP 10-14, HP6-14 и HP4-14 эффективно защищали клетки человека от цитопатогенного действия ВЭМК (таблица 1). В культуре клеток J-96 минимальные эффективные концентрации HP 10-14, HP6-14 и HP4-14 составили  $1 \pm 0,2$  мкг/мл,  $2,1 \pm 0,4$  мкг/мл и  $2,9 \pm 1,1$  мкг/мл, соответственно. В культуре клеток L-41 те же пептиды оказывали противовирусное действие при концентрациях не меньше 5 мкг/мл,  $2,1 \pm 1,5$  мкг/мл и 10 мкг/мл, соответственно. Сравнение с эффективными противовирусными концентрациями гепона показывает, что исследованные пептиды C-концевой части молекулы гепона не уступали полной молекуле гепона по своей противовирусной активности.

В целом, проведенное исследование показало, что пептиды, гомологичные центральной части, а также N- и C-концам молекулы гепона, подобны цельной молекуле гепона по своему противовирусному действию. Как и гепон, все исследованные пептидные гомологи эффективно защищали клетки человека *in vitro* от цитопатогенного действия ВЭМК. Сходные результаты были получены нами при изучении иммуномодулирующих свойств структурных гомологов гепона [3]. В указанной работе

пептидные фрагменты гепона, копирующие центральную часть молекулы, а также ее С- и N-концы, усиливали продукцию антител к Т-зависимым антигенам, как и полная молекула гепона. Подобие тетрадекапептида гепона и его структурных фрагментов по биологическим эффектам - иммуноадьювантному и противовирусному - в принципе возможно. Это может происходить, если оригинальный тетрадекапептид и его фрагменты взаимодействуют с одним и тем же клеточным рецептором.

### Литература

1. Бибичева Т.В., Силина Л В Иммуномодулятор Гепон для местной терапии герпес вирусной инфекции, В кн.: Тезисы докладов IX Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, 2002, с 55.
2. Бибичева Т.В., Силина Л.В. Лечение рецидивирующего генитального герпеса иммуномодулятором Гепон - В кн.: Тезисы докладов IX Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, 2002, с. 56.
3. Катлинский А.В., Р.И.Атауллаханов, Р.Л.Холмс, А.В.Пичугин, Т.Б.Мастернак, Е.Ю.Малкина, Н.М.Шишкова. Иммуноадьювантное действие структурных гомологов иммуномодулятора «Гепон». - Иммунология, 2002.
4. Кладова О.В., Ф.С.Харламова, А.А.Щербакова, Т.П.Легкова, Л.И.Фильдфикс, А.А.Знаменская, Г.С.Овчинникова, В.Ф.Учайкин. Первый опыт интраназального применения гепона у детей с респираторными заболеваниями, - Педиатрия, 2002, 2, 86-88.
5. Osgood E.E., J.H. Brooke, Continuous tissue culture of leucocytes from human leukernic bloods by application of "gradient" principles.-Blood 1955, 10(10), 1010-1022.

## Реферат

В работе изучалось влияние иммуномодулятора «Гепон» и его пептидных гомологов на размножение и цитопатогенное действие вируса энцефаломиокардита (ВЭМК) в культуре клеток человека *in vitro*. Клетки перевиваемых линий J-96 и L-41 заражали 100 ТЦД<sub>50</sub>/мл ВЭМК. Цитопатогенное действие вируса учитывали путем световой микроскопии через 24 часа после заражения. Противовирусную активность препаратов определяли по их способности повышать устойчивость клеток к цитопатогенному действию вируса. Клетки инкубировали в присутствии различных концентраций препаратов в течение 24 часов, затем заражали вирусом. Установлено, что гепон обладает выраженным противовирусным действием, снижая цитопатогенное действие ВЭМК с 100% до 0. Минимальные концентрации гепона, оказывающие противовирусное действие, составили  $2,2 \pm 1,4$  мкг/мл и  $7,5 \pm 2,5$  мкг/мл в культурах клеток J-96 и L-41, соответственно. Эффекты гепона были сравнимы с противовирусным действием ридостина, известного индуктора интерферонов. Ридостин оказывал противовирусное действие в культурах клеток J-96 и L-41 в минимальных концентрациях  $6 \pm 2$  мкг/мл и  $89,9 \pm 80,1$  мкг/мл, соответственно.

Сравнение противовирусной активности гепона тетрадекапептида ТЕККRRRETVEREKE и его структурных фрагментов, соответствующих а.к. 1-5 с N-конца (НР 1-5), а.к. 1-9 (НР 1-9), а.к. 1-11 (НР 1-11), а.к.10-14 (НР 10-14), а.к. 6-14 (НР6-14), а.к.4-14 (НР4-14), а.к. 4-11 (НР4-11) и а.к. 3-12 (НР3-12), позволило исследовать связь между структурой гепона и его противовирусным действием. Показано, что пептиды, гомологичные центральной части, а также N- и C-концам молекулы гепона, подобны цельной молекуле гепона по своему противовирусному действию. Как и гепон, все исследованные пептидные гомологи эффективно защищали клетки человека от цитопатогенного действия ВЭМК.

Предполагается, что оригинальный тетрадекапептид гепон и его структурные фрагменты взаимодействуют с одним и тем же клеточным рецептором и потому обладают сходной противовирусной активностью.