

ИНТЕРФЕРОНЫ И ИХ ИНДУКТОРЫ КАК ЭЛЕМЕНТЫ БОРЬБЫ С COVID-19



Анатолий Зинченко,
завлабораторией
молекулярной
биотехнологии
Института
микробиологии
НАН Беларуси,
член-корреспондент



Маргарита Винтер,
младший научный
сотрудник лаборатории
молекулярной
биотехнологии
Института
микробиологии
НАН Беларуси



Илья Казловский,
старший научный
сотрудник лаборатории
молекулярной
биотехнологии
Института
микробиологии
НАН Беларуси, кандидат
биологических наук

COVID-19 – респираторная инфекция, вызываемая коронавирусом SARS-CoV-2, представляет собой опасное заболевание, которое может протекать как в виде ОРВИ легкого течения, так и в тяжелой форме, нередко заканчивающейся летальным исходом. С 11.03.2020 г. распространение этого заболевания было признано Всемирной организацией здравоохранения пандемией, и по состоянию на начало сентября 2022 г. было зарегистрировано уже более 600 млн случаев инфицирования людей, из которых 6,5 млн умерли. За это время для контроля коронавирусной инфекции учеными были предложены вакцины разных поколений, а также другие противовирусные средства: плазма крови переболевших пациентов, ингибиторы вирусных РНК-полимеразы и протеазы, ингибиторы процесса проникновения вируса в клетку, малые интерферирующие РНК, моноклональные антитела, рибонуклеазы, стволовые клетки, квантовые точки, растительные препараты, лекарства традиционной китайской медицины, соли лития, эвкалиптовое эфирное масло, лактоферрин, нанозимы, метиленовый синий и т. д. Широта и разнообразие представленной линейки свидетельствуют о том,

что кардинального способа решения проблемы пандемии еще не найдено, что подтверждается в том числе и продолжающимся ростом количества госпитализаций и смертей.

Сегодня основной путь борьбы с SARS-CoV-2 – иммунизация населения вакцинами, разработанными специалистами многих стран. Однако сосредоточение стратегии только на вакцинации имеет существенные недостатки, в частности:

- *постоянное появление новых мутантных вариантов вируса;*
- *затрудненный доступ к вакцине для значительной части населения мира;*
- *большое количество людей в разных странах, отказывающихся от прививок.*

История разработки вакцин против вирусов гриппа и ВИЧ свидетельствует, что создание эффективного средства против вирусной инфекции (особенно в условиях ограниченного времени) – процесс очень сложный. Что касается SARS-CoV-2, то ряд особенностей данного вируса указывает на то, что побороть его с помощью прививок – задача трудновыполнимая.

Во-первых, как и вирус гриппа, SARS-CoV-2 подвержен мутациям, и антигенный дрейф (основная проблема с нестабильностью

генотипа и фенотипа вируса гриппа) в отношении него весьма вероятен. Во-вторых, прошлый опыт неудачной разработки вакцины против SARS-CoV свидетельствует о том, что вакцины, доказавшие свою эффективность с точки зрения защиты молодых мышей, оказываются небезопасными для старых животных. Этот случай заслуживает самого серьезного внимания, поскольку пожилое население считается группой высокого риска заражения COVID-19, осложнений и смертности.

Еще одной важной проблемой, связанной с безопасностью вакцин, является феномен антителозависимого усиления инфекции – явление, при котором связывание вируса со слабонейтрализующими антителами способствует его проникновению в иммунные клетки инфицированного организма. Кстати, именно это служит препятствием для создания эффективной вакцины против ВИЧ.

Долгосрочная специфическая защита от COVID-19 также сомнительна, поскольку уже было показано, что антитела против SARS-CoV-2 не циркулируют в крови дольше одного года, снижаясь наполовину примерно каждые 73 дня после перенесенной инфекции.

Исходя из приведенной информации, становится очевидным, что альтернативные подходы к защите населения от вирусных заболеваний должны как минимум обсуждаться. В связи с этим внимание некоторых исследователей было обращено на интерфероны – видоспецифичные гормоноподобные противовирусные белки, которые, как известно, вырабатываются клетками позвоночных в ответ на любые вирусные инфекции.

Природа и свойства интерферонов. Интерфероны представляют собой достаточно давно и хорошо изученный класс цитокинов. Первый интерферон был описан в середине прошлого века как вещество, которое способно защищать клетки от вирусной инфекции [1]. Основными функциями интерферонов являются противовирусная активность, противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства.

В зависимости от клеток, в которых они продуцируются, интерфероны классифицируются на лейкоцитарные (α), фибробластные (β) и иммунные (γ). Кроме того, в соответствии со строением клеточного рецептора, генетической структурой и генной локализацией интерфероны подразделяются на 3 типа. К 1-му типу у человека принадлежат 13 представителей интерферонов- α и по одному – интерферонов- β , - κ , - ϵ и - ω . Ко 2-му типу принадлежит лишь один – интерферон- γ . Относительно недавно (в 2002 г.) стало известно о новом, 3-м типе интерферонов – λ . Именно к нему сейчас привлечено повышенное внимание исследователей.

Как известно, представители 1-го типа интерферонов (в основном - α и - β) характеризуются выраженным противовирусным эффектом в отношении большинства ДНК- и РНК-содержащих вирусов, бактерий и других инфекционных агентов. Эти цитокины действуют на все этапы размножения вирусов – от проникновения в клетку до выхода из нее вирусных частиц – потомства. Но особенно эффективно они блокируют стадии транскрипции и трансляции, что переводит клетку в особое состояние «невосприимчивости» к вирусной инфекции [2].

Недавно открытый 3-й тип интерферонов (интерферон- λ) также обладает выраженной противовирусной активностью, несмотря на то, что использует иной тип рецепторов. Важно подчеркнуть, что, в отличие от интерферонов 1-го типа, основным механизмом действия интерферона- λ является локальный, местный механизм, а системный эффект не имеет большого значения.

Характеризуя иммуномодулирующие свойства интерферонов, следует указать на их способность вмешиваться практически во все функции иммунных клеток. Они активируют многие рецепторы, распознающие патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, стимулируют и усиливают провоспалительные реакции, повышают цитотоксичность натуральных киллеров (NK-клеток), усиливают иммунные ответы, активируя и рекрутируя иммунные клетки.

Анализ полученных к настоящему времени данных позволяет сделать заключение о том, что интерфероны 1-го типа играют центральную, регулируемую роль в системном противовирусном иммунном ответе, а интерфероны 3-го типа выступают ключевыми факторами местного противовирусного ответа; отсутствие у последних системных эффектов, по всей видимости, освободит их от тяжелых побочных реакций, иногда наблюдающихся при терапии хронических вирусных инфекций с применением интерферонов 1-го типа.

Вводить препараты интерферона человеку и животным можно внутримышечно, подкожно, внутривенно, интраназально и местно. Пероральный способ введения изучается только для иммобилизованных форм этих

белков. Внутривенная инфузия приводит к более быстрому распределению и высокой концентрации интерферона в крови, но период полувыведения его при этом значительно сокращается. По этой причине внутримышечное или подкожное введение для терапевтического использования интерферонов более эффективно.

Однако необходимо отметить, что применение высоких доз интерферонов способно привести к выработке в организме (как людей, так и животных) нейтрализующих антител и побочным эффектам, таким как аллергические реакции, гипертермия, потеря аппетита и анемия.

Доклинические исследования интерферонов. РНК-содержащий вирус SARS-CoV-2, вызвавший пандемию COVID-19, использует в качестве рецепторов молекулы ангиотензинпревращающего фермента 2-го типа (ACE2) (рис. 1), которые локализованы на поверхности эпителиальных клеток носовой и ротовой полости, конъюнктивы глаз и других клеток организма, поэтому нарушение дыхания является рано и быстро развивающимся симптомом коронавирусной инфекции. При этом выраженность воспа-

лительного ответа при COVID-19 зависит от дозы проникшего возбудителя и резистентности организма: при относительно низкой дозе SARS-CoV-2 первичная фиксация вируса происходит в клетках мерцательного эпителия верхних дыхательных путей, а своевременный и адекватный иммунный ответ сдерживает распространение и репликацию вируса, следствием чего является развитие легких, а порой и бессимптомных форм заболевания.

Неожиданно оказалось, что экспрессия рецепторов ACE2 стимулируется интерферонами. Так, в одном из экспериментов *in vitro* исследователи показали, что интерфероны 1-го и 2-го типов активируют синтез ACE2 в клетках верхних дыхательных путей, потенциально способствуя проникновению вируса в эти клетки. Примечательно, что интерферон 3-го типа, также изученный в этих исследованиях, эффективно активировал противовирусную защиту и совсем незначительно повышал уровень матричной РНК, кодирующей ACE2.

Американские исследователи, инфицируя культуру клеток респираторного эпителия человека вирусом SARS-CoV-2, обнаружили

полное отсутствие интерферонного ответа клеток на этот вирус. Однако последующая обработка интерферонами 1-го и 3-го типов значительно снижала репликацию вируса в эпителии этих клеток. Результаты этого изыскания позволили предположить, что SARS-CoV-2 при заражении клеток не вызывает в них интерферонный ответ, но чувствителен к антивирусному действию экзогенных интерферонов. Иначе говоря, профилактика интерферонами 1-го и 3-го типов может оказаться эффективным методом борьбы с COVID-19 [3].

Это предположение подтвердили китайские специалисты, работавшие с пациентами, инфицированными SARS-CoV-2. По их данным, профилактическое применение назальных препаратов, содержащих интерферон-α, снизило заболеваемость COVID-19 среди 2944 врачей города Ухань за 28 дней исследования с 90% до ~ 0% [4].

Немецкие ученые провели сравнительное изучение ингибирующей активности интерферона-α и интерферона-λ против SARS-CoV-2 и SARS-CoV-1, используя две линии эпителиальных клеток млекопитающих (человека и обезьяны). Был обнаружен дозозависимый эффект подавления репликации SARS-CoV-2 обоими интерферонами. Против SARS-CoV-1 в использованных клеточных линиях оказался активным только интерферон-α. Таким образом, вирус SARS-CoV-2 проявил себя более чувствительным к интерферонам, чем SARS-CoV-1.

Эти данные свидетельствуют о том, что интерферон 1-го типа и менее склонный к побочным эффектам интерферон 3-го типа, по-видимому, можно использовать для терапии и профилактики COVID-19.

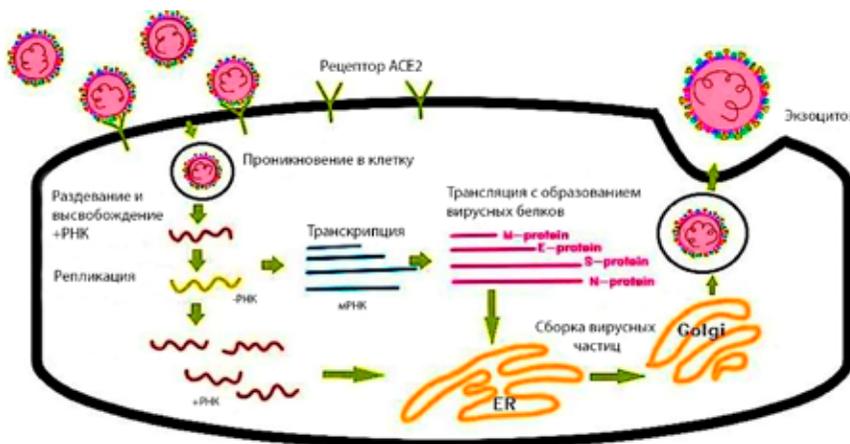


Рис. 1. Цикл репликации SARS-CoV-2

Применение интерферонов для лечения COVID-19. Прежде всего следует отметить, что результаты клинического изучения действия интерферонов на пандемический коронавирус трудно сравнивать из-за высокой variability обнаруженных показателей – исходов лечения, типов и способов введения препаратов интерферонов и, самое главное, сроков терапевтического вмешательства.

Поскольку интерфероны являются частью врожденной иммунной системы, уже в самом начале пандемии COVID-19 у ряда исследователей возникла мысль использовать их для профилактики и терапии SARS-CoV-2. Тем более что уже имелись многообещающие результаты применения интерферонов в отношении других эпидемических коронавирусов – SARS и MERS. Принципиальную возможность терапии интерферонами коронавирусной инфекции обосновывало сообщение [5] о результатах клинических исследований пациентов с COVID-19, показывающих, что подкожное введение интерферона- β было связано с более быстрым выздоровлением от тяжелого респираторного синдрома и снижением смертности пациентов.

Эти результаты подтверждены затем двумя проведенными клиническими испытаниями, в ходе которых интерферон- β вводили либо в комбинации с лопинавиром, ритонавиром и рибавирином, либо отдельно в виде ингаляции. Терапия рекомбинантным интерферонами- β в сочетании с лопинавиром-ритонавиром также вызвала снижение смертности в недавно завершеном рандомизированном клиническом исследовании госпитализированных пациентов с ближневосточным респираторным синдромом (MERS).

Здесь следует отметить, что, как и другие члены семейства коронавирусов, SARS-CoV-2 обладает способностью ингибировать в зараженных клетках как синтез самих интерферонов, так и механизмы проявления ими своей противовирусной активности и таким образом частично уклоняться от врожденной иммунной системы организма-хозяина.

К сожалению, кроме интерферопатии, непосредственно индуцированной этим патогеном, имеется и другое препятствие – популяция людей, которые вообще не способны отвечать на заражение SARS-CoV-2 продуцированием интерферонов 1-го типа. Поэтому неудивительно, что у трети пациентов при поступлении в одну из клиник Парижа уровни интерферона- β в сыворотке крови были ниже предела обнаружения этого цитокина. Однако если интерферон выявлялся, его уровни у тех пациентов, которые умерли (до 30-го дня лечения), были выше, чем у выживших [6].

Некоторые исследователи указали на неожиданную корреляцию между уровнем интерферона- β в сыворотке крови и смертностью части пациентов от COVID-19, что, по-видимому, было вызвано развитием так называемого цитокинового шторма.

Важнейший вывод из многих работ, посвященных применению интерферонов для терапии COVID-19, заключается в необходимости учитывать сроки лечения. Другими словами, введение интерферона на ранних стадиях инфекции SARS-CoV-2 приводит к благоприятному клиническому исходу. Напротив, позднее введение (≥ 5 дней после госпитализации) связано с повышенной смертностью, ско-

рее всего, из-за развития цитокинового шторма.

Таким образом, в рамках концепции персонализированной медицины терапия интерферонами 1-го типа не может быть рекомендована пациентам с COVID-19 с высоким уровнем таких интерферонов в крови или позже 5 дней после появления симптомов заболевания [5, 6].

Российские ученые исследовали совместное использование ректальных суппозиторий с интерферонами- α в составе комплексной терапии от коронавирусной инфекции. В группе, получавшей дополнительное лечение интерферонами, выздоровление произошло на семь дней раньше, чем у пациентов, получавших только стандартное лечение.

Некоторые исследователи зарегистрировали повышенную резистентность к интерферону у мутантных вариантов SARS-CoV-2. Это указывает на то, что отклонение от интерфероновой системы защиты является важной движущей силой эволюции SARS-CoV-2, поэтому нужен индивидуальный подбор вида интерферона для лечения пациентов с измененным штаммом вируса.

Фармакотерапевтический потенциал индукторов интерферонов. По современным представлениям, индукторы интерферонов представляют собой разнородную по структуре группу химических соединений, способных при введении в организм позвоночных вызывать образование эндогенных (аутологичных) интерферонов [7]. При этом применение препаратов, которые индуцируют синтез эндогенных интерферонов, имеет ряд преимуществ перед экзогенными интерферонами [8]:

- индукторы относительно стабильны и не обладают антигенностью;
- естественный (хотя и стимулированный) синтез эндогенного интерферона не вызывает гиперинтерферонемии, которая нередко возникает при введении экзогенных (особенно рекомбинантных) интерферонов и приводит к тяжёлым побочным явлениям;
- однократное введение индуктора интерферона обеспечивает длительную циркуляцию интерферона на терапевтическом уровне. Для достижения такого уровня экзогенного интерферона требуется его многократное введение, поскольку время полужизни этого вещества в крови составляет всего порядка 40 мин.

Немаловажно, что широко применяемые сейчас рекомбинантные интерфероны являются в основном препаратами только интерферона- α , что должно ограничивать их противовирусные свойства, так как для эффективной противовирусной защиты необходимо наличие всех трех классов интерферонов, синтез которых и вызывается применением индукторов интерфероногенеза.

Наконец, отдельно следует упомянуть о технологических и практических проблемах, сопряженных с производством и хранением интерферонов как белковых препаратов.

Уже давно и достоверно установлено, что индукция интерферонов 1-го типа играет важную роль в формировании иммунного ответа против различных вирусных инфекций, в том числе коронавирусных. Поэтому уже в самом начале текущей

пандемии было высказано мнение, что противовирусные препараты, способные индуцировать эндогенные интерфероны, могут быть полезны и для борьбы с COVID-19 [9].

К вопросу о создании универсального противовирусного средства. Относительно недавно выяснилось, что центральную роль во врожденных механизмах защиты позвоночных от разнообразных микробных патогенов играет адаптерный белок STING (от англ. STimulator of INterferon Genes), ранее известный как TMEM 173, MPYS, MITA и ERIS [10]. Активация этого белка циклическим динуклеотидом цикло-ГМФ-АМФ – продуктом соответствующей синтазы – приводит к индукции как интерферонов 1-го ($-\alpha$ и $-\beta$) и 3-го ($-\lambda$) типов, так и многочисленных цитокинов и хемокинов, которые супрессируют репликацию патогенов и способствуют развитию адаптивного иммунитета. Другими словами, STING служит эволюционно сложившейся первой линией защиты организма от любых инфекций, в том числе от широкого спектра респираторных вирусов. Следовательно, вещества-агонисты STING могут рассматриваться в качестве профилактических и терапевтических средств борьбы с любыми известными (а также и еще не известными) патогенными вирусами [11].

В этой связи принципиально важно подчеркнуть, что агонистами STING (а следовательно, индукторами эндогенных интерферонов) являются не только

эукариотические циклические динуклеотиды, но и циклические динуклеотиды цикло-ди-АМФ и цикло-ди-ГМФ бактериального происхождения [12] (рис. 2).

Таким образом, в качестве эффективных средств, ингибирующих различные вирусы, в том числе SARS-CoV-2, могут выступать не только препараты самих интерферонов 1-го и 3-го типов, но и три известных на сегодняшний день агониста адаптерного белка STING – циклические динуклеотиды эукариотического (сAGMP) и прокариотического (цикло-ди-АМФ и цикло-ди-ГМФ) происхождения.

Поскольку адаптерный белок STING при активации включает эволюционно сформированную у позвоночных систему защиты от любых вирусов, природные агонисты (активаторы) этого белка, в частности циклические динуклеотиды бактериального происхождения – цикло-ди-АМФ и цикло-ди-ГМФ, могут рассматриваться в качестве реальных кандидатов на роль универсального противовирусного средства.

Введение в организм позвоночных (человека или животного) бактериального циклического динуклеотида (цикло-ди-ГМФ или цикло-ди-АМФ) имитирует внедрение инфекционного агента, что должно приводить к включению эволюционно сформированной системы универсальной противовирусной защиты, основанной на синтезе интерферона.

То, что активация STING может представлять собой многообещающую терапевтическую страте-

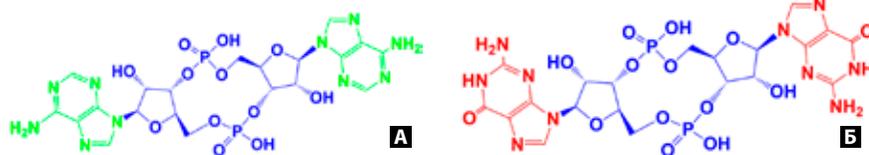


Рис. 2. Структурная формула цикло-ди-АМФ (А) и цикло-ди-ГМФ (Б)

гию для контроля над SARS-CoV-2, следует также из сообщения [13], авторы которого показали, что введение однократной интраназальной (1–10 мкг за 6–24 ч до заражения) дозы димерного амидобензимидазола трансгенным мышам (экспрессирующим человеческий рецептор АПФ2) оказывает защитное действие.

В плане развития рассматриваемого направления с помощью методов генетической инженерии нами созданы бактериальные штаммы – продуценты ферментов, которые катализируют реакции синтеза цикло-ди-ГМФ и цикло-ди-АМФ в одну стадию из, соответственно, двух молекул ГТФ и АТФ. Относительно редко встречающейся особенностью этих штаммов является то, что они экспрессируют рекомбинантную дигуанилатциклазу [14] и диаденилатциклазу [15] в виде каталитически активных так называемых телец включения. В отличие от водорастворимых ферментов, такие тельца включения можно использовать в качестве биокатализаторов неоднократно, что, безусловно, должно значительно снизить затраты на получение целевых динуклеотидов.

В настоящее время нами разрабатываются биологические технологии препаративного (на уровне сотен граммов) получения цикло-ди-АМФ с целью его доклинического изучения в качестве профилактики и терапии COVID-19.

Заключение. Несмотря на создание большого количества специфических вакцин и ряда противовирусных химиопрепаратов прямого действия (ремдесивир, молнупиравир, паксловид), идеального средства борьбы с пандемическим коронавирусом (в отношении активности, безопасности, технологичности в производстве, доступ-

ности для широких слоев населения и т.д.) еще не найдено. В связи с этим представляется оправданным обратить внимание на систему интерферона, которую создала природа в ходе тысячелетнего противостояния позвоночных и вирусов. Эта система предусматривает синтез (в ответ на обнаружение патогенов в своем организме) особых белков-интерферонов, которые индуцируют множество различных механизмов защиты, приводящих в конце концов к элиминации внедрившихся инфекционных патогенов.

Следует отметить, что все современные патогенные вирусы для своего существования «вынуждены» в той или иной степени подавлять эту систему. Так, иммунопатогенез новой коронавирусной инфекции COVID-19 проявляется, в частности, в дефиците в организме пациентов противовирусных эндогенных интерферонов в начале заболевания с последующей гиперпродукцией их и других провоспалительных цитокинов, приводящей к развитию губительного цитокинового шторма. Из этого следует, что рациональная стратегия применения интерферонов заключается в профилактике или во введении интерферонов 1-го (α и β) и 3-го (λ) типов пациентам в первые пять суток заболевания.

Нам представляется логичным вместо самого интерферона использовать его индукторы, поскольку введение в организм человека или животного, например, циклических динуклеотидов бактериального происхождения должно имитировать атаку инфекционного агента и приводить к практически мгновенному включению эволюционно сформированной системы универсальной защиты от всех без исключения инфекционных патогенов. ■

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. A. Isaacs. Virus interference. I. The interferon / A. Isaacs, J. Lindenmann // Proc. R. Soc. Lond. Series B Biol. Sci. 1957. Vol. 147. №927. P. 258–267.
2. L. Ye. Interferon-orchestrate innate and adaptive mucosal immune responses / L. Ye, D. Schnepf, P. Staeheli // Nat. Rev. Immunol. 2019. Vol. 19. P. 614–625.
3. Increased sensitivity of SARS-CoV-2 to type III interferon in human intestinal epithelial cells / C. Metz-Zumaran [et al.] // J. Virol. 2022. Vol. 96. №7. Art. e0170521.
4. The effect of recombinant human interferon alpha nasal drops to prevent COVID-19 pneumonia for medical staff in an epidemic area / Z. Meng [et al.] // Curr. Topics Med. Chem. 2021. Vol. 21. №10. P. 920–927.
5. A randomized clinical trial of the efficacy and safety of interferon β -1a in treatment of severe COVID-19 / E. Davoudi-Monfared [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. 2020. Vol. 64. №9. Art. e01061–20.
6. Considering personalized interferon beta therapy for COVID-19 / K. Dorgham [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. 2021. Vol. 65. №4. Art. e00065–21.
7. Л.Л. Рошина. Аптечный ассортимент препаратов группы интерферонов и индукторов интерферонов для профилактики и лечения инфекционных заболеваний / Л.Л. Рошина // Инновации. Наука. Образование. 2021. №29. С. 395–404.
8. А.И. Зинченко. Основы молекулярной биологии вирусов и антивирусной терапии: учеб. пособие / А.И. Зинченко, Д.А. Паруль. – Минск, 2005.
9. Interferon-inducer antivirals: Potential candidates to combat COVID-19 / A. Bagheri [et al.] // Int. Immunopharmacol. 2021. Vol. 91. Art. 107245.
10. G. N. Barber. STING: infection, inflammation and cancer / G. N. Barber // Nat. Rev. Immunol. 2015. Vol. 15, №12. P. 760–770.
11. Exploiting natural antiviral immunity for the control of pandemics: Lessons from Covid-19 / E. Arico [et al.] // Cytokine Growth Factor Rev. 2022. Vol. 63. P. 23–33.
12. STING-dependent cytosolic DNA sensing promotes radiation-induced type I interferon-dependent antitumor immunity in immunogenic tumors / L. Deng [et al.] // Immunity. 2014. Vol. 41. №5. P. 843–852.
13. Pharmacological activation of STING blocks SARS-CoV-2 infection / M. Li [et al.] // Sci. Immunol. 2021. Vol. 6. Art. eabi9007.
14. Enzymatic synthesis of 2'-ara and 2'-deoxy analogues of c-di-GMP / A. S. Shchokolova [et al.] // Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids. 2015. Vol. 34. №6. P. 416–423.
15. М.А. Винтер. Гетерологичная экспрессия диаденилатциклазы в виде телец включения, обладающих ферментативной активностью / М.А. Винтер, И.С. Казловский, А.И. Зинченко // Доклады Национальной академии наук Беларуси. 2022. Т. 66. №5. С. 509–516.