УДК 615.03:543.9
https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-387
Оригинальная статья | Original article

Check for updates
CC BY 4.0

Н.М. Фаустова[1] ✉,
С.С. Петлицкая[1],
И.Н. Ампилогова[1],
М.В. Карлина[1],
М.Н. Макарова[2],
В.Г. Макаров[1]

Ингибиторы нейраминидазы: разработка и валидация методики определения ингибирующего действия *in vitro*

[1] *Закрытое акционерное общество «Санкт-Петербургский институт фармации»,*
Заводская ул., д. 3, к. 245, г.п. Кузьмоловский, Всеволожский р-н, Ленинградская обл., 188663, Российская Федерация

[2] *Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ»,*
Заводская ул., д. 3, к. 245, г.п. Кузьмоловский, Всеволожский р-н, Ленинградская обл., 188663, Российская Федерация

✉ ***Фаустова Наталья Михайловна;*** *faustova.nm@doclinika.ru*

РЕЗЮМЕ

Ингибиторы нейраминидазы — класс препаратов, применяемый для лечения инфекции, вызываемой вирусами гриппа. Для скрининга потенциальных ингибиторов нейраминидазы представляет интерес разработка *in vitro* методик без использования вирусов в реакции. **Цель работы:** разработать и валидировать методику определения ингибирующего действия веществ по отношению к ферменту нейраминидаза (КФ 3.2.1.18) с использованием флуоресцентного субстрата 2'-4(4-метилумбеллиферил)-α-D-N-ацетилнейраминовой кислоты (4MU-NANA) *in vitro* на примере хиноидных пигментов — потенциальных ингибиторов нейраминидазы. **Материалы и методы:** в основе метода лежит ферментативное расщепление субстрата 4MU-NANA ферментом нейраминидазой с образованием флуоресцентного маркера 4-метилумбеллиферона с детекцией при длинах волн возбуждения/испускания 360/450 нм. **Результаты:** методика валидирована по параметрам: специфичность, линейность, точность, прецизионность. Линейность методики составила 0,31–80 мкМ 4-метилумбеллиферона. Точность для четырех уровней концентраций, включая нижний предел количественного определения, находилась в пределах 87–114%, т.е. относительная погрешность при оценке точности не превышала 15%. Внутридневная прецизионность составила 1,5–10,4%, междневная прецизионность 2,3–9,6%. При оценке ингибирующего действия на примере занамивира гидрата (0,6–150 нМ) точность составила 89–120%, прецизионность 3,1–11,0%. Для контрольных образцов занамивира гидрата значение IC_{50} составило 27 ± 3 нМ, для осельтамивира IC_{50} = 16 ± 2 нМ. Для тестирования субстанций допустимо использовать растворители: диметилсульфоксид 50%, полисорбата 80 раствор 5%, этанол 50% и метанол 50 и 100%. Для соединений, нерастворимых в перечисленных растворителях, предложено получение комплексов включения с 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином. Для исследуемого вещества биснафтазарина, хиноидного пигмента природного происхождения, IC_{50} составила 273 ± 28 нМ. **Заключение:** методика характеризуется удовлетворительной точностью и воспроизводимостью и может быть использована для скрининга потенциальных ингибиторов нейраминидазы. Для тестирования нерастворимых веществ предложено их применение в виде комплексов включения с циклодекстринами.

Ключевые слова: нейраминидаза; осельтамивир; занамивира гидрат; ингибирующее действие; 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин; биснафтазарин

© Н.М. Фаустова, С.С. Петлицкая, И.Н. Ампилогова, М.В. Карлина, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, 2022

Для цитирования: Фаустова Н.М., Петлицкая С.С., Ампилогова И.Н., Карлина М.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Ингибиторы нейраминидазы: разработка и валидация методики определения ингибирующего действия *in vitro*. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(1):60–76. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-387

N.M. Faustova[1] ✉,
S.S. Petlitskaya[1],
I.N. Ampilogova[1],
M.V. Karlina[1],
M.N. Makarova[2],
V.G. Makarov[1]

Neuraminidase Inhibitors: Development and Validation of a Procedure for *In Vitro* Determination of the Inhibitory Effect

[1] *St.-Petersburg Institute of Pharmacy, 3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky urban-type settlement, Vsevolozhsky district, Leningrad region 188663, Russian Federation*

[2] *Joint Stock Company "Scientific and Production Association HOME OF PHARMACY", 3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky urban-type settlement, Vsevolozhsky district, Leningrad region 188663, Russian Federation*

✉ ***Natalia M. Faustova;*** *faustova.nm@doclinika.ru*

ABSTRACT

Neuraminidase inhibitors are a class of antivirals used to treat influenza infections. Screening assays for potential neuraminidase inhibitors would benefit from the development of *in vitro* procedures that do not require handling viruses. **The aim of the study** was to develop and validate a procedure for *in vitro* determination of inhibitory effects on neuraminidase (EC 3.2.1.18), using 2'-4(methylumbelliferyl)-α-D-N-acetylneuraminic acid (4MU-NANA) as a fluorogenic substrate and quinonoid pigments, potential neuraminidase inhibitors, as a case study. **Materials and methods**: the method is based on neuraminidase cleavage of 4MU-NANA to release fluorescent 4-methylumbelliferone, which is detected at the excitation and emission wavelengths of 360 and 450 nm, respectively. **Results:** the procedure was validated for specificity, range, accuracy, and precision. It remained linear over the range of 0.31–80 μM of 4-methylumbelliferone. The accuracy for four concentration levels (including the LLOQ) was 87–114%; i.e., the relative error of accuracy evaluation was less than 15%. The intra- and inter-day precision ranged from 1.5 to 10.4% and from 2.3 to 9.6%, respectively. Inhibitory effect evaluation using zanamivir hydrate (0.6–150 nM) demonstrated the accuracy of 89–120% and the precision of 3.1–11.0%. The IC_{50} values for positive controls (zanamivir hydrate and oseltamivir) were 27 ± 3 and 16 ± 2 nM, respectively. The following solvents may be used: 50% dimethyl sulfoxide, 5% Polysorbate 80, 50% ethanol, 50 and 100% methanol. If a compound is insoluble in the solvents, it is possible to form inclusion complexes with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin. For bisnaphthazarin, the natural quinonoid pigment used in the study, the IC_{50} amounted to 273 ± 28 nM. **Conclusion:** the procedure demonstrated adequate accuracy and reproducibility and is recommended for screening for potential neuraminidase inhibitors. In order to use the procedure for insoluble substances, the authors suggest forming inclusion complexes with cyclodextrins.

Key words: neuraminidase; oseltamivir; zanamivir hydrate; inhibitory effect; 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin; bisnaphthazarin

For citation: Faustova N.M., Petlitskaya S.S., Ampilogova I.N., Karlina M.V., Makarova M.N., Makarov V.G. Neuraminidase inhibitors: development and validation of a procedure for *in vitro* determination of the inhibitory effect. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2023;13(1):60–76. https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-387

Введение

Грипп — острое респираторное заболевание, вызываемое различными типами (A, B, C) вирусов гриппа. По частоте и количеству случаев грипп и другие острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) занимают первое место среди инфекционных заболеваний. Ежегодно в мире регистрируют от 3 до 5 млн случаев заболевания гриппом [1]. В России грипп и ОРВИ составляют до 90% от всех случаев инфекционных заболеваний [2]. Ежегодные эпидемические вспышки наносят ущерб здоровью населения и требуют затрат на лечение и реабилитацию пациентов [1].

Действие препаратов, используемых при гриппе, направлено на элиминацию возбудителя заболевания, купирование воспаления, уменьшение болевых проявлений, детоксикацию организма и повышение его защитных сил, а также на профилактику осложнений [3]. Поскольку вирус развивает резистентность в отношении лекарственных средств, то поиск новых активных фармацевтических субстанций (АФС) остается актуальным.

Вирус гриппа представляет собой частицы круглой или продолговатой формы размером 80–120 нм, покрытые мембраной, в которую погружены поверхностные белки — гемагглютинин (необходим для связывания с клеточными рецепторами и проникновения вируса внутрь клетки хозяина) и нейраминидазу (для выхода вируса из клетки хозяина) [4].

Применяемые для лечения гриппа химиопрепараты имеют различные молекулярные мишени [3, 5, 6]. Среди препаратов этиотропного действия можно выделить следующие основные группы:
1) блокаторы ионного канала (ингибиторы декапсидации вируса). Механизм действия препаратов заключается в ингибировании белка M2, необходимого для создания ионного канала и регулирующего pH в процессе «раздевания» вируса в эндосомах. Представители группы: амантадин и ремантадин;
2) ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы, блокирующие репликацию вируса. Представители группы: рибавирин, арбидол, фавипиравир;
3) ингибиторы нейраминидазы. Представители группы: занамивир и осельтамивир.

Ингибиторы нейраминидазы широко применяются для терапии гриппозных инфекций. Фермент нейраминидаза (КФ 3.2.1.18) — это экзосиалидаза, расщепляющая α-кетозидную связь между терминальным остатком сиаловой (N-ацетилнейраминовой) кислоты и следующим моносахаридным остатком [5, 7]. В природе нейраминидаза обнаружена не только в составе оболочек некоторых вирусов, в том числе гриппа, но и в ряде патогенных микроорганизмов (*Streptococcus pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Clostridium perfringens* и др.). Нейраминидаза *C. perfringens* часто используется в лабораторной практике, в том числе для скрининга ингибиторов нейраминидаз [8].

Для вируса гриппа А известно девять подтипов нейраминидазы, для вируса типов B и C — по одному [7]. На антигенных различиях поверхностных гликопротеинов гемагглютинина и нейраминидазы основана классификация вирусов гриппа А. В человеческой популяции циркулируют вирусы гриппа А с нейраминидазами типов N1, N2 и N9[1]. Природным резервуаром вируса гриппа типа А являются птицы, среди которых и циркулирует значительное количество антигенов различных вариантов вируса, в том числе высокопатогенные штаммы, например субтипов H5N1, H5N8, H5N6[2]. У птиц, обитающих на территории Российской Федерации, чаще всего выявляют вирусы гриппа с нейраминидазами следующих типов: N1, N2, N6 и N8 [9].

В качестве потенциальных ингибиторов нейраминидазы представляют интерес хиноидные пигменты, выделенные из панцирей морских ежей. Разнообразие механизмов действия и эффектов, оказываемых, например, эхинохромом А и спинохромом А, привлекло внимание к изучению активности в отношении нейраминидаз вируса гриппа, родственных хиноидным пигментам соединений[3].

Для создания новых препаратов необходима воспроизводимая методика оценки их способности ингибировать активность нейраминидазы.

Цель работы — разработать и валидировать методику определения ингибирующего действия

[1] Кононова АА. Псевдовирусная система на основе вируса везикулярного стоматита для поиска противовирусных средств, действующих на вирусные поверхностные белки: дис. .... канд. биол. наук. Новосибирск; 2020.
[2] Прогнозирование распространения птичьего гриппа в России и Японии для предупреждения и контроля: роль Восточноазиатского-Австралийского пролетного пути в перемещении генов и реассортации вируса гриппа. https://rscf.ru/project/17-44-07001/
[3] Васильева ЕА. Спинохромы морских ежей тихоокеанского региона: распространение и биологическая активность: дис. ... канд. хим. наук. Владивосток; 2019.

веществ по отношению к ферменту нейраминидаза (КФ 3.2.1.18) с использованием флуоресцентного субстрата 2'-4(4-метилумбеллиферил)-α-D-N-ацетилнейраминовой кислоты (4MU-NANA) *in vitro* на примере хиноидных пигментов — потенциальных ингибиторов нейраминидазы.

Существует несколько групп методов оценки активности нейраминидазы. Наиболее широко применяют методы с использованием синтетических субстратов с флуоресцентными или хемилюминесцентными метками. В отличие от методов с использованием культивируемых клеток, результаты таких анализов отличаются лучшей воспроизводимостью и позволяют прогнозировать трансляционность *in vivo* [10, 11]. Применение этих субстратов позволяет использовать данную методику достаточно широко, так как лицензию на работу с вирусами имеет ограниченное количество лабораторий.

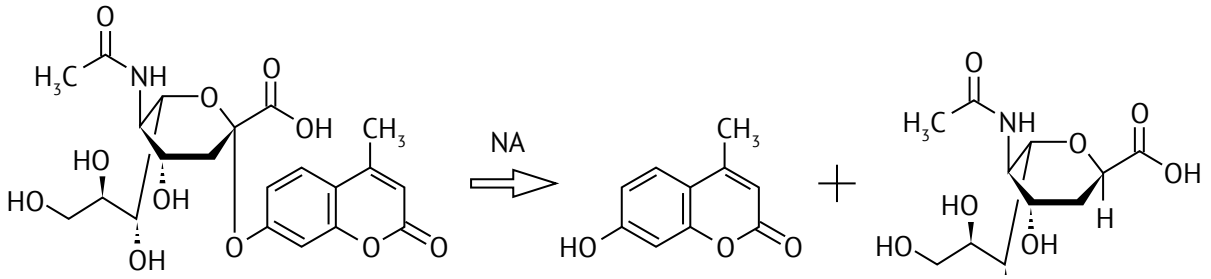
Чувствительность хемилюминесцентного метода определения активности нейраминидазы (субстрат — 2-диоксетановое производное сиаловой кислоты (NA-STAR)) выше, чем флуоресцентного, однако хемилюминесцентный продукт гидролиза нестабилен — время жизни не превышает 5 мин [10].

В качестве субстратов могут быть использованы различные соединения [7, 8, 10–15].

Для разработки методов определения активности нейраминидазы, альтернативных колориметрическим и радиоактивным методам [5, 8], в качестве наиболее часто используемого субстрата применяется 2'-4(4-метилумбеллиферил)-α-D-N-ацетилнейраминовая кислота (MU-Neu5Ac или 4MU-NANA) [13, 14]. Ближайшим аналогом 4MU-NANA является 4-трифторметилумбеллиферил-α-N-ацетилнейраминовая кислота (CF3MU-Neu5Ac). Высокая интенсивность флуоресценции этого вещества позволяет проводить анализ нейраминидаз низкой активности [12].

Для оценки активности нейраминидаз созданы коммерческие доступные наборы, содержащие готовые к использованию реагенты, однако при разработке собственной методики анализа стоимость исследования становится значительно ниже, так как большинство реагентов может быть приготовлено непосредственно в лаборатории в достаточных количествах. Субстраты, затраты на которые ранее составляли основную стоимость проведения анализа, теперь можно приобрести у различных производителей по конкурентоспособным ценам.

В основе выбранного нами метода лежит ферментативное расщепление субстрата 4MU-NANA ферментом нейраминидазой, представленное на схеме:



Под действием нейраминидазы происходит расщепление субстрата с образованием N-ацетил-α-D-нейраминовой кислоты (NANA) и флуоресцентного маркера 4-метилумбеллиферона (4-MU), количество которого определяют при длине волны возбуждения 360 нм и длине волны излучения 465 нм.

В присутствии веществ, оказывающих ингибирующее действие на нейраминидазу, концентрация продуктов реакции снижается. Для сравнения эффективности ингибиторов определяют концентрацию максимального полуингибирования (IC_{50}).

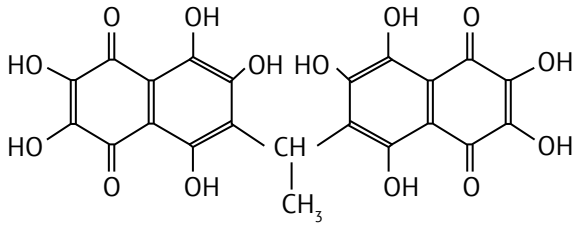
Материалы и методы

Для проведения исследования использовали следующее оборудование и материалы: анализатор микропланшетный CLARIOstar (BMG Labtech, Германия); система получения воды очищенной Simplicity® (Millipore, США); термостатированный шейкер ST-3L (ELMI, Латвия); весы лабораторные AR 2140 (Ohaus, Китай); планшеты 96-луночные черные полистироловые для флюоресценции OptiPlate (PerkinElmer, США).

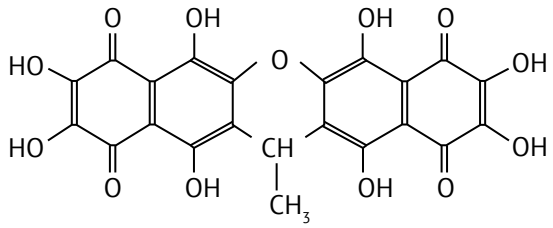
Реактивы. 4-метилумбеллиферон (4-MU) (99%, BLD Pharmatech Ltd, кат. № BD23062); субстрат

2'-4(4-метилумбеллиферил)-α-D-N-ацетилнейраминовой кислоты натриевая соль, гидрат (4MU-NANA) (≥95%, Sigma-Aldrich, кат. № M8639); нейраминидаза *Clostridium perfingens* (*C. wilchii*) 6-го типа, лиофилизированная, 6–10 МЕ/мг белка (Sigma-Aldrich, кат. № 3001); 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин, (Sigma-Aldrich, кат. № 778907); 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (MES) (Sigma-Aldrich, кат. № M3671); кальций хлористый (безводный, ч.д.а., АО «ЛенРеактив»); натрий едкий, (98%, в чешуйках, ООО «НеваРеактив»); диметилсульфоксид (для культур клеток, ООО «БиолоТ», кат. № 1.4.7,); полисорбат 80 (твин 80) (PanReac AppliChem, кат. № 142050.1611); метанол (х.ч., АО «Вектон»).

Объекты исследования. Комплекс 1% биснафтазарина в виде соединения включения в матрицу 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина (БН-β-ЦД) (ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», Россия). Биснафтазарин — хиноидный пигмент природного происхождения, выделенный из панцирей зеленых морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis*. Биснафтазарин является смесью изомеров биснафтазаринов, основными из которых являются этилиденбиснафтазарин и ангидроэтилиден-6,6-bis(2,3,7-тригидроксинафтазарин).



этилиденбиснафтазарин (этилиден-6,6-bis-(2,3,7-тригидроксинафтазарин)



ангидроэтилиден-6,6-bis(2,3,7-тригидроксинафтазарин)

Молярная масса биснафтазаринов, входящих в состав анализируемой субстанции, в среднем составляет 490 г/моль [16].

Для повышения растворимости биснафтазарина был получен его комплекс с 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином (β-ЦД) в виде соединения включения одним из наиболее распространенных методов — методом сорастворения с последующим упариванием растворителя [17].

Положительными контролями являлись препарат Тамифлю® (75 мг осельтамивира в виде осельтамивира фосфата 98,5 мг; «Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд», Швейцария) и субстанция занамивира гидрат (≥98%, CAS № 551942-41-7, Китай).

Приготовление калибровочных растворов стандартного образца (СО) 4-метилумбеллиферона (4-MU). Навеску 4-MU массой 0,0113 г растворяли в 10 мл спирта этилового 50%. Из полученного сток-раствора с концентрацией 6,4 мМ с помощью последовательного разбавления в рабочем буферном растворе готовили калибровочные растворы с концентрациями 3,1–3200 мкМ.

С учетом разбавления в реакционной смеси концентрация СО 4-MU составила 0,31–320 мкМ.

Приготовление испытуемых растворов положительного контроля № 1 осельтамивира. Содержимое 1 капсулы препарата Тамифлю® (75 мг в пересчете на осельтамивир) растворяли при перемешивании в 75 мл воды очищенной, фильтровали (фильтр обеззоленный «красная лента») для отделения от нерастворимых в воде вспомогательных компонентов. Полученный сток-раствор имел концентрацию 3,20 мМ (1 мг/мл). Далее путем серии последовательных разведений готовили растворы с концентрациями 0,026–0,64 мкМ. Концентрации положительного контроля № 1 в реакционной смеси с учетом разведения составили 0,001–0,032 мкМ.

Подготовка испытуемых растворов положительного контроля № 2 занамивира гидрата. Навеску занамивира гидрата массой 0,01000 г, взвешенную с точностью до 0,00001 г, растворяли в 10 мл воды, очищенной при периодическом перемешивании. Концентрация полученного сток-раствора составила 1,0 мг/мл (3,0 мМ). Далее путем серии разведений водой очищенной готовили испытуемые растворы положительного контроля № 1 с концентрациями 0,04–15 мкМ (в реакционной смеси 0,002–0,75 мкМ).

Приготовление испытуемых растворов субстанции. Навеску БН-β-ЦД массой 0,20000 г, взвешенную с точностью до 0,00001 г, растворяли в 1 мл метанола. Концентрация комплекса в сток-растворе составила 167 мг/мл, в пересчете на биснафтазарин 1,67 мг/мл (3,40 мМ). Далее путем серии последовательных

разведений в метаноле и в воде очищенной готовили растворы с концентрациями биснафтазарина C_1 = 34 мкМ; C_2 = 3,40 мкМ; C_3 = 0,34 мкМ. С учетом разбавления в реакционной смеси концентрация пигментов составила 1,7, 0,17, 0,02 мкМ соответственно.

Приготовление испытуемого раствора 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина с концентрацией 2 мг/мл. Навеску 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина массой 0,010 г (точная навеска) растворяли в 5 мл растворителя. В качестве растворителей использовали как воду очищенную, так и метанол.

Анализ проводили согласно описанию в статьях [6, 13] с оптимизацией условий процедуры. Измерение интенсивности флуоресценции проводили на анализаторе микропланшетном CLARIOstar.

Для проведения ферментативной реакции использовали рабочий буферный раствор 140 мкМ MES-NaOH (pH 6,5), содержащий 4 мМ $CaCl_2$, 1 мМ раствор субстрата 4MU-NANA в рабочем буферном растворе и раствор нейраминидазы 6 типа с концентрацией 0,7 МЕ/мл.

В лунки планшета для отрицательного контроля вносили по 10 мкл растворителя(-ей), используемых для приготовления испытуемых растворов; в лунки для положительного контроля вносили по 10 мкл растворов положительных контролей № 1 и 2. В следующие лунки вносили по 10 мкл испытуемых растворов субстанции БН-β-ЦД и гидроксипропил-β-циклодекстрина. Каждый анализ выполняли не менее чем в трех повторностях. Во все лунки вносили по 160 мкл рабочего буферного раствора и по 10 мкл рабочего раствора нейраминидазы (0,7 МЕ/мл). Планшет заклеивали пленкой и инкубировали 10 мин при температуре 25 °С и перемешивании 650 об./мин в термостатирующем шейкере. После инкубации во все лунки вносили по 20 мкл рабочего раствора субстрата 4MU-NANA (1,0 мМ). Незамедлительно помещали планшет в прибор, перемешивали 30 с при 650 об./мин и измеряли интенсивность флуоресценции при длинах волн возбуждения/испускания 360 ± 20 / 450 ± 30 нм в кинетическом режиме каждые 60 с в течение 10 мин при температуре 37 °С, усиление сигнала (gain) — 600.

Конечные концентрации реагентов в реакционной смеси составили 0,035 МЕ/мл фермента, 0,1 мкмоль/мл субстрата, 0,133 мкмоль/мл MES, 3,8 мкмоль/мл $CaCl_2$.

В качестве бланк-раствора, не содержащего аналита и фермента, использовали раствор, состоящий из 170 мкл рабочего буферного раствора, 10 мкл растворителя, использованного для приготовления растворов тестируемых соединений, и 20 мкл рабочего раствора субстрата 4MU-NANA (1,0 мМ).

Обработку результатов выполняли с использованием программного обеспечения Mars 3.31 (BMG Labtech, Германия) и программы Statistica 10 (Statsoft, США).

Скорость ферментативной реакции (v, RFU/мин) — изменение интенсивности флуоресценции от времени — при длинах волн возбуждения/испускания 360 ± 20 / 450 ± 30 нм рассчитывали для всех анализируемых образцов по формуле:

$$v = \frac{I_t - I_0}{\Delta t}, \quad (1)$$

где v — скорость реакции, RFU/мин; I_t — интенсивность флуоресценции после инкубации, RFU; I_0 — интенсивность флуоресценции, измеренная до начала инкубации (0 мин), RFU; Δt — длительность инкубации между начальным и конечным измерениями интенсивности флуоресценции, мин.

Ингибирующее действие (ИД, %) анализируемых веществ рассчитывали по формуле:

$$ИД = \frac{v_{отр.к.} - v_т}{v_{отр.к.}} \times 100, \quad (2)$$

где $v_{отр.к.}$ — скорость ферментативной реакции для отрицательного контроля (100% активности фермента), RFU/мин; $v_т$ — скорость ферментативной реакции, определенная для испытуемых образцов БН-β-ЦД или образцов положительного контроля, RFU/мин.

По результатам анализа серии испытуемых растворов с различными концентрациями, для которых значение ИД находилось в диапазоне от 20 до 80%, строили зависимость изменения ИД от концентрации вещества, аппроксимировали подходящей функцией, коэффициент корреляции для которой составлял не менее 0,99. Затем с помощью уравнения полученной зависимости рассчитывали IC_{50} — концентрацию испытуемых/контрольных образцов, вызывающую 50% ингибирование активности нейраминидазы.

Активность фермента нейраминидазы (A_{NA}) рассчитывали в МЕ/л (мкмоль/мин/л) по формуле:

$$A_{NA} = \frac{v \times V_{ал}}{a_{4-MU} \times V_{р.р.}}, \quad (3)$$

где v — значение скорости ферментативной реакции (RFU/мин); a_{4-MU} — значение коэффициента «a», полученного при построении калибровочной зависимости для растворов СО 4-MU (RFU×л/мкмоль); $V_{р.р.}$ — общий объем реакционной смеси в лунках планшета, мл ($V_{р.р.}$ = 0,20 мл); $V_{ал}$ — объем аликвоты раствора нейраминидазы, мл ($V_{ал}$ = 0,01 мл).

Калибровочные, испытуемые и контрольные пробы при определении активности нейраминидазы были проанализированы как единая серия в рамках одного аналитического цикла.

Результаты и обсуждение

При проведении анализов *in vitro* для поиска соединений — потенциальных ингибиторов нейраминидазы применение вирусов гриппа возможно только в специализированных лабораториях, имеющих лицензию на работу с вирусами. Применение для этих же целей рекомбинантного изолированного фермента возможно в условиях практически любой аналитической лаборатории, имеющей соответствующее оборудование. В статьях с описанием метода [6, 8, 13] отсутствует строгая регламентация ряда параметров, например времени и условий инкубации субстрата с тестируемыми образцами, выбора допустимых растворителей. Таким образом, условия испытания для методики с определенным набором реактивов должны быть определены экспериментально.

Несмотря на то что определение ингибирования нейраминидазы считается воспроизводимым методом, существует ряд критических точек (этапов):
1) приготовление испытуемых растворов контрольных и тестируемых образцов: погрешности в процессе приготовления растворов ингибитора нейраминидазы могут сместить кривые ингибирования и изменить значения IC_{50};
2) приготовление буферного раствора: изменение pH буферного раствора для анализа приводит к смещению значений IC_{50}, что может усложнить сравнение данных;
3) точность при дозировании всех растворов в процессе реакции, соблюдение времени и условий инкубации имеют решающее значение для получения воспроизводимых результатов анализов;
4) использование контрольных образцов позволяет отслеживать приемлемость полученных результатов анализа в течение длительного времени.

При разработке методики определения ингибирующего действия веществ в отношении фермента исследователю, как правило, необходимо решить ряд задач:
1) оценить аналитический диапазон определения продукта ферментативной реакции 4-MU, оценить валидационные характеристики методики определения 4-MU в реакционной смеси;
2) выбрать подходящие для проведения тестирования растворители;
3) отработать методику с использованием известных специфических ингибиторов фермента (положительных контролей), оценить валидационные характеристики методики определения ингибирующего действия;
4) оценить влияние тестируемых соединений на активность фермента.

Для разработки методики и проверки пригодности условий постановки ферментативной реакции были использованы два известных ингибитора нейраминидазы, использующиеся в клинической практике (положительные контроли): занамивира гидрат и осельтамивира фосфат.

Выбор диапазона концентраций для приготовления испытуемых растворов положительных контролей занамивира гидрата и осельтамивира фосфата для пилотных экспериментов был основан на анализе данных литературы [6, 8, 13].

Для определения влияния занамивира гидрата на активность нейраминидазы предложена стадия предварительной инкубации фермента и тестируемой субстанции при комнатной температуре или 37 °C в течение 30–60 мин [6, 13]. Результаты пилотных экспериментов не соответствовали данным литературы, полученным при использовании тест-систем с вирусами [13]. При проведении длительной предварительной инкубации занамивира гидрата и осельтамивира (в течение 30 мин) их ингибирующее действие на активность фермента нейраминидазы не превышало 20–25%, а при увеличении длительности инкубации до 60 мин отсутствовало (результат измерения ИД был меньше погрешности методики, а скорость ферментативной реакции с ингибитором не отличалась от скорости реакции отрицательного контроля). Поэтому в дальнейшем проводили ряд экспериментов с различными условиями инкубации *(табл. 1)*.

При тестировании растворов положительных контролей занамивира гидрата и осельтамивира без предварительной инкубации ИД составило 12–48% в зависимости от концентрации противовирусного препарата.

На основании дальнейших экспериментов было установлено, что предварительная инкубация

Таблица 1. *Варианты условий проведения ферментативной реакции с нейраминидазой*

Table 1. *Variants of conditions for the enzymatic reaction with neuraminidase*

№ варианта условий *Reaction conditions No.*	Условия предварительной инкубации фермента и положительного контроля *Conditions for pre-incubation of the enzyme and a positive control*			Условия ферментативной реакции (с субстратом) *Conditions for the enzymatic reaction (with the substrate)*		Ингибирующее действие, % *Inhibitory action, %*
	Время, мин *Time, min*	Температура, °С *Temperature, °C*	Перемешивание, об./мин *Shaking, rpm*	Время, мин *Time, min*	Температура, °С *Temperature, °C*	
1*	60**	37	Без перемешивания *No shaking*	10	37	Не ингибирует *No*
2	30		650			Менее 25 *Less than 25*
3	10					Менее 30 *Less than 30*
4	10**	37		10	25	Не ингибирует *No*
5	Без предварительной инкубации *No pre-incubation*		650	10	37	11–55
6	5**	25	650	10	37	18–42
7	10					22–82

* *Условия № 1 соответствовали литературным данным [12].*
** *Эксперименты проведены только с растворами положительного контроля занамивира гидрата.*
* *Conditions No. 1 corresponded to the literature data [12].*
** *These experiments were carried out using only positive control solutions of zanamivir hydrate.*

фермента с растворами положительных контролей в реакционной смеси при комнатной температуре (23–25 °С) в течение 10 мин является оптимальной. Увеличение длительности инкубации до 15 мин не приводило к статистически значимому изменению величины ИД, поэтому все последующие эксперименты проводили в условиях № 7 *(табл. 1)*, описанных в методической части.

Экспериментально полученное для осельтамивира значение IC_{50} составило 16 ± 2 нМ, для занамивира гидрата — 27 ± 3 нМ, что сопоставимо с данными литературы [6, 8, 13].

Для получения достоверных данных при анализе методика должна быть валидирована. Валидация аналитической или биоаналитической методики — это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения предполагаемой задачи. В качестве параметров валидации согласно рекомендациям были выбраны: специфичность, линейность, точность и прецизионность внутри одной аналитической серии и между сериями[4].

Специфичность (реже селективность) — способность однозначно оценивать анализируемое вещество в присутствии других компонентов, которые могут содержаться в образце (примеси, вспомогательные вещества, продукты деградации, матрица (среда)). Подобное определение специфичности содержится в большинстве руководств по валидации аналитических/биоаналитических методик. В «Руководстве по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств»[5] содержатся дополнительные указания: «Процедуры подтверждения специфичности зависят от целевого назначения аналитической методики».

При разработке и валидации методики определения ингибирующего действия специфичность методики подтверждается специфичностью

[4] Guidance for industry: Bioanalytical method validation. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine; 2018.
Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009, London, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2011.
ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.
Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 № 113.

[5] Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 № 113.

используемых в работе фермента и субстрата. Для работы были выбраны фермент и специфичный для него субстрат на основании характеристик производителя.

При оценке ингибирующего действия субстанций в отношении того или иного фермента сравнивают соотношение скоростей ферментативной реакции испытуемых проб с тестируемым соединением с пробами отрицательного контроля (растворителя).

В случае тестирования различных субстанций (не в составе лекарственной формы) специфичность сводится к проверке специфичности детектируемого продукта ферментативной реакции, наличию/отсутствию ингибирующего влияния матрицы (растворители, вспомогательное вещество для растворения тестируемых соединений 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин), а также наличию ингибирования (снижения скорости ферментативной реакции) в пробах положительного контроля, содержащих известные ингибиторы ферментов.

Для проверки специфичности детектирования окрашенного продукта ферментной реакции были получены спектры флуоресценции (возбуждения и испускания) бланк-раствора, калибровочного раствора 4-MU, модельных проб с добавками 4-MU в диапазоне длин волн от 320 ± 10 до 400 ± 10 / 450 ± 16 нм *(рис. 1)*.

Для детектируемой области на спектрах 4-MU характерно наличие максимумов в области возбуждения при λ = 320–330 нм, а также в области испускания при λ = 450 ± 16 нм. Аналогичные спектры имеют модельные смеси с 4-MU, а также продукты ферментативной реакции. Бланк-раствор не имеет максимумов поглощения и не искажает спектры растворов детектируемого вещества 4-MU, являющегося продуктом ферментативной реакции, и не мешает его определению. Таким образом, флуориметрическое определение целевого продукта ферментативной реакции 4-MU является специфичным.

Для оценки специфичности проведения ферментативной реакции были построены кинетические кривые для растворов отрицательного контроля № 1 (метанола) и отрицательного контроля № 2 (воды очищенной), а также испытуемых растворов ингибиторов — осельтамивира и занамивира гидрата *(рис. 2)*.

На протяжении всего периода проведения кинетической реакции характерно линейное изменение интенсивности флуоресценции от времени реакции. В присутствии специфических ингибиторов — осельтамивира и занамивира гидрата скорость увеличения интенсивности флуоресценции и, соответственно, скорость ферментативной реакции снижается. Анализ полученных данных свидетельствует об адекватности постановки ферментативной реакции, подтверждает специфичность методики по определению ингибирующего действия веществ на активность нейраминидазы.

В ходе валидации методики оценки биологической активности веществ проводили валидацию методики определения детектируемого продукта в реакционной смеси и валидацию определения ингибирующего действия.

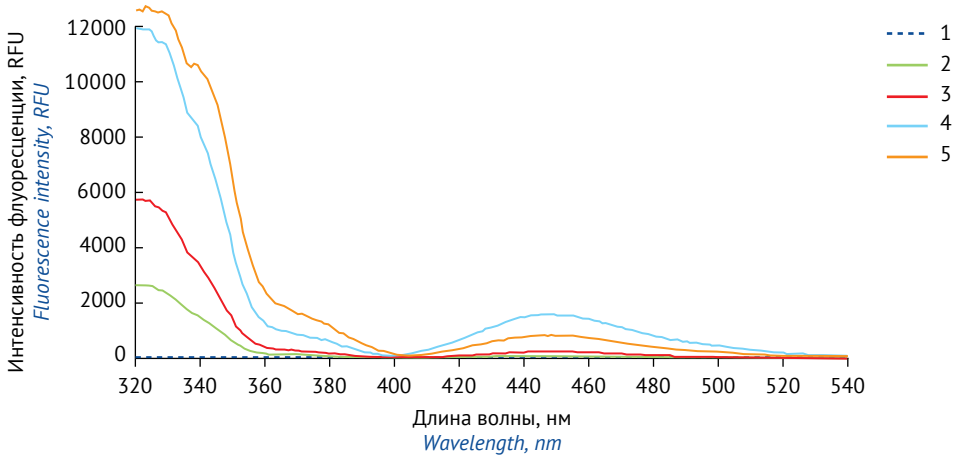


Рис. 1. *Примеры спектров флуоресценции бланк-раствора (1), калибровочных растворов стандартных образцов 4-MU с концентрациями 0,1 мМ (2) и 1,42 мМ (5), модельной смеси с 4-MU на уровне среднего контроля качества (3) и продуктов ферментативной реакции (4)*

Fig. 1. *Examples of fluorescence spectra of the blank solution (1), calibration solutions of 4-methylumbelliferone standard (0.1 mM (2) and 1.42 mM (5)), model mixture containing 4-MU (at the middle quality control level) (3), and enzymatic reaction products (4)*

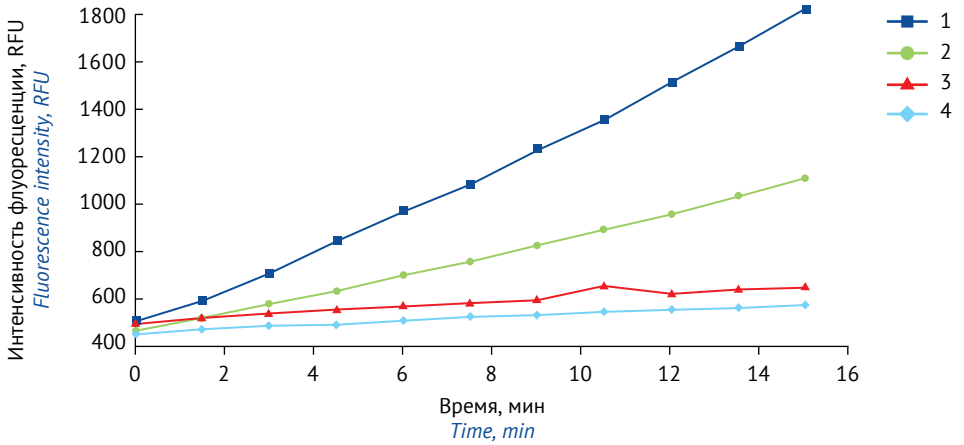


Рис. 2. *Типичные изменения интенсивности флуоресценции в зависимости от времени реакции для растворов отрицательных контролей метанола (1), воды очищенной (2) и растворов положительных контролей занамивира гидрата (3), осельтамивира (4)*

Fig. 2. *Typical changes of fluorescence intensity as a function of reaction time for negative control solutions of methanol (1) and purified water (2) and for positive control solutions of zanamivir (3) and oseltamivir (4)*

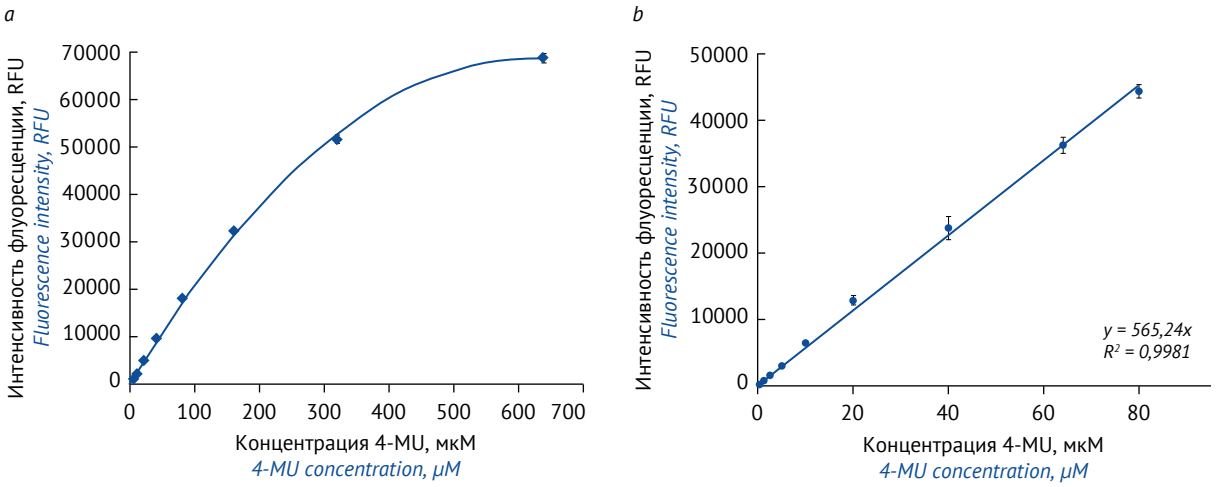


Рис. 3. *Пример изменения интенсивности флуоресценции в зависимости от концентрации 4-MU в диапазоне 0,16–640 мкМ (a) с линейным участком в аналитическом диапазоне методики 0,31–80 мкМ (b)*

Fig. 3. *An example of fluorescence intensity changes as a function of 4-MU concentrations ranging from 0.16 to 640 μM (a); and the linear portion of the curve, representing the analytical range (0.31–80 μM) (b)*

При оценке линейности (аналитической области) требуется показать, что аналитические сигналы пропорциональны концентрации анализируемого вещества в образце в пределах диапазона применения методики. На основании полученных данных методом наименьших квадратов проводят расчет уравнения регрессии и дополнительных статистических показателей.

Для выбора области линейности были проанализированы растворы 4-MU в широком диапазоне концентраций 0,16–640 мкМ *(рис. 3а)*. Линейная зависимость интенсивности от концентрации 4-MU характерна для концентраций 0,31–80 мкМ *(рис. 3b)*. Далее изменение сигнала становится нелинейным и выходит на плато. Интенсивность флуоресценции в соответствии с данными литературы измеряли при длинах волн возбуждения/испускания 360/465 нм при значениях усиления сигнала 300, 500 и 600. Для дальнейшего проведения эксперимента значение усиления сигнала было выбрано равным 600.

Таким образом, линейная (аналитическая) область методики детектирования 4-MU составила 0,31–80 мкМ. Полученное по результатам трех аналитических циклов калибровочное уравнение *(рис. 3b)* $y = 565{,}24x$ (где y — интенсивность флуоресценции, RFU; x — содержание СО 4-MU в реакционной смеси, мкМ; коэффициент корреляции $r = 0{,}9990$) было в дальнейшем использовано для расчета валидационных параметров. Концентрация 4-MU 0,31 мкМ, соответствующая нижней точке на калибровочной зависимости, была принята в качестве нижнего предела количественного определения (НПКО).

Таблица 2. *Валидационные параметры методики определения 4-MU в реакционной смеси*

Table 2. *Validation parameters of the procedure for determination of 4-MU in a reaction mixture*

Валидационный параметр *Validation parameters*	**Результаты** *Results*
Линейная (аналитическая) область методики, мкМ *Linearity (analytical range), μM*	0,31–80,00
Калибровочное уравнение* *Calibration equation*	$y = 565{,}24x$
Коэффициент корреляции (*r*) *Correlation coefficient (r)*	0,9990
НПКО *LLOQ*	0,31
Точность, % (в одном цикле // между циклами) *Accuracy, % (intra-cycle // inter-cycle)*	
• 80 мкМ (ВПКО)	
• *80 mM (ULOQ)*	95,3–102,1 // 97,9
• 40 мкМ (средний КК)	
• *40 mM (MQC)*	91,7–113,7 // 104,6
• 0,63 мкМ (низкий КК)	
• *0.63 mM (LQC)*	86,6–106,4 // 90,8
• 0,31 мкМ (НПКО)	
• *0.31 mM (LLOQ)*	93,6–107,8 // 98,4
Прецизионность, % (внутридневная // междневная) *Precision, % (intra-day // inter-day)*	
• 80 мкМ (ВПКО)	
• *80 mM (ULOQ)*	1,5–3,2 // 2,3
• 40 мкМ (средний КК)	
• *40 mM (MQC)*	4,2–10,4 // 7,4
• 0,63 мкМ (низкий КК)	
• *0.63 mM (LQC)*	1,5–8,9 // 9,6
• 0,31 мкМ (НПКО)	
• *0.31 mM (LLOQ)*	1,5–5,6 // 5,4
Стабильность раствора стандартного образца *Stability of the Standard Solution*	
• при комнатной температуре	До 4 сут
• *at room temperature*	*up to 4 days*
• при температуре 2–8 °С	до 24 ч
• *at a temperature of 2–8 °C*	*up to 24 h*
• при температуре ниже –20 °С	не менее 7 сут
• *at a temperature below –20 °C*	*minimum 7 days*

Примечание. *НПКО — нижний предел количественного определения; ВПКО — верхний предел количественного определения.*
**y — относительная интенсивность флуоресценции, RFU; x — концентрация 4-MU в реакционной смеси, мкМ.*
Note. *LLOQ — lower limit of quantitation; MQC — middle quality control level; LQC — low quality control level; ULOQ — upper limit of quantitation.*
**y — relative fluorescence intensity, RFU; x — 4-MU concentration in the reaction mixture, mM.*

На основании полученной зависимости *(рис. 3b)* проводили обратный расчет концентраций калибровочных растворов. Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по графику, от фактических значений находились в пределах 0,2–13,8%, для НПКО 13,7–16,2%. Полученные отклонения соответствуют требованиям — не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% — для остальных точек. Этому критерию должны соответствовать не менее чем 75% калибровочных стандартов не менее шести концентраций[6]. По итогам проведенных испытаний этому критерию соответствовали 78–100% калибровочных стандартов.

В ходе валидации был определен предел обнаружения по величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика. Данный способ хорошо применим к инструментальным методам анализа. Предел обнаружения 4-MU составил 0,11 мкМ.

Оценка точности и прецизионности выполнена по результатам анализа модельных растворов с 4-MU в необходимом количестве повторностей на четырех уровнях концентраций: нижний

[6] Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 № 113.

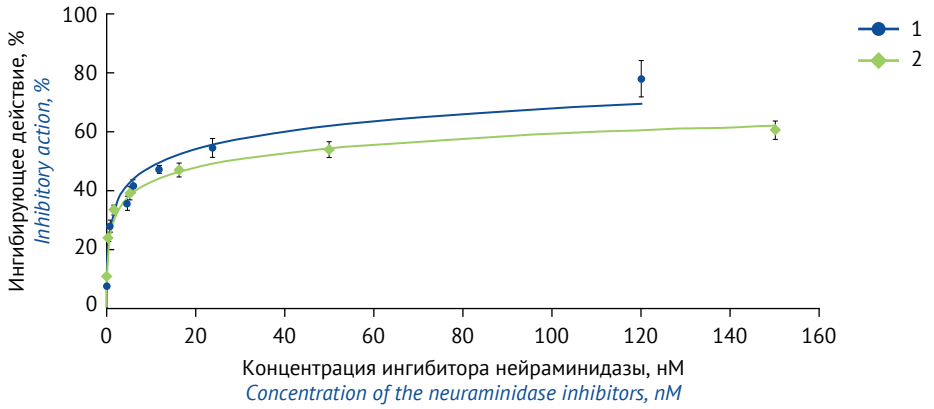


Рис. 4. *Влияние на активность нейраминидазы осельтамивира (1) в диапазоне концентраций 0,038–120 нМ и занамивира гидрата (2) в диапазоне концентраций 0,2–150 нМ*

Fig. 4. *Effects of oseltamivir at concentrations of 0.038–120 nM (1) and zanamivir hydrate at concentrations of 0.2–150 nM (2) on neuraminidase activity*

и верхний пределы количественного определения (ВПКО), контроли качества (КК) нижнего и среднего уровней концентраций *(табл. 2)*.

Точность в общем случае должна составлять 85–115%, для нижнего предела количественного определения — 80–120%. Полученные результаты (86,6–113,7%, для НПКО 93,6–107,8%) соответствовали этим требованиям. Прецизионность также должна быть не более 15%, полученные значения на четырех уровнях концентраций (1,5–10,4%, для НПКО 1,5–5,6%) соответствовали требованиям, предъявляемым для биоаналитических методов анализа[7].

Методика пригодна для оценки активности фермента нейраминидазы в диапазоне 0,015–4,0 МЕ/л.

Таким образом, по всем критериям получены результаты, свидетельствующие о специфичности, линейности, прецизионности и достаточно высокой чувствительности предлагаемой методики.

Для подтверждения корректности использованной методики были проанализированы растворы положительных контролей известных ингибиторов нейраминидазы осельтамивира и занамивира гидрата. Для расчета показателя IC_{50} были построены зависимости вида $y = b \times \ln x + a$ для диапазона концентраций, соответствующих дозозависимому изменению ИД от концентрации ингибиторов *(рис. 4)*. Для осельтамивира значение IC_{50} составило 16 ± 2 нМ, для занамивира гидрата — 26,5 ± 3,3 нМ.

По данным литературы при тестировании *in vitro* IC_{50} занамивира в отношении вирусов гриппа в зависимости от его типа в среднем составляет от 0,2 до 10,7 нМ, IC_{50} осельтамивира — от 0,34 до 15,2 нМ[8] [12–14]. Полученные данные не противоречат данным литературы. Отличия представленных в различных источниках литературы значений IC_{50} могут быть обусловлены не только различием метода анализа, но и особенностями восприимчивости вирусов и ферментов различных типов, использованных в тестах, к воздействию ингибиторов. В работах [8, 15] указано, что бактериальные нейраминидазы отличаются большей устойчивостью к действию занамивира гидрата и осельтамивира и, соответственно, бóльшими значениями IC_{50}.

На примере субстанции занамивира гидрата были оценены валидационные характеристики методики оценки ингибирующего действия в используемой тест-системе *(рис. 5, табл. 3)*.

После усреднения результатов, полученных в трех аналитических циклах, была построена общая зависимость ИД (y) от концентрации субстанции (x): $y = 6{,}56802 \times \ln x + 28{,}32$ ($r = 0{,}9986$), которая далее была использована для валидационных расчетов.

За номинальную была принята концентрация 25 нМ, наиболее близкая к значению IC_{50}. Оценка валидационных параметров проведена для диапазона концентраций 0,6–150 нМ (диапазон концентраций, для которого характерно дозозависимое изменение ингибирующего действия), соответствующих ингибирующему действию занамивира гидрата 22,5–62,5%. По отношению к номинальному значению ИД = 50% аналитический диапазон составил 45–125%.

[7] Там же.
[8] Тамифлю®. Инструкция по применению. Видаль (Vidal). https://www.vidal.ru/drugs/tamiflu__37267

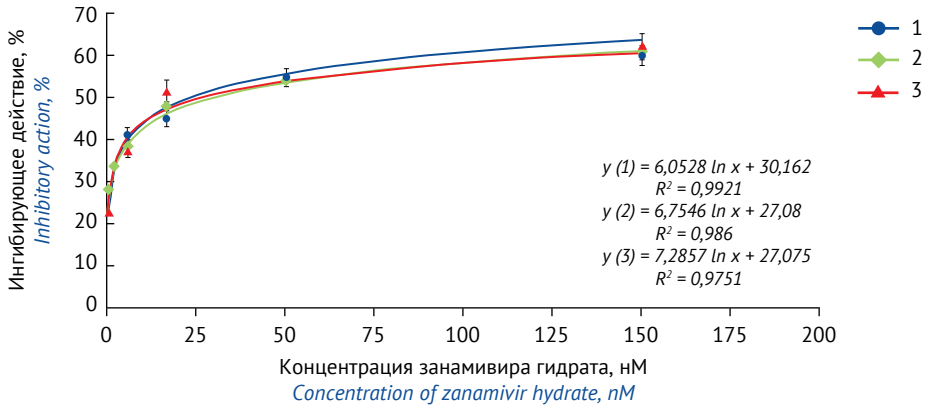


Рис. 5. *Зависимости ингибирующего действия от концентрации занамивира гидрата, полученные в трех аналитических циклах*

Fig. 5. *The inhibitory action as a function of zanamivir hydrate concentrations observed in 3 runs*

Таблица 3. *Валидационные параметры методики определения ингибирующего действия занамивира гидрата*

Table 3. *Validation parameters of the procedure for determination of the inhibitory action of zanamivir hydrate*

Валидационный параметр *Validation parameters*	**Результаты** *Results*		
Аналитическая область, нМ *Analytical range, nM*	0,6–150 (соответствует ИД 22,6–62,5%) *0.6–150 (corresponds to inhibitory action of 22.5–62.5%)*		
Калибровочное уравнение* *Calibration equation*	y = 6,56802 × ln *x* + 28,32		
Коэффициент корреляции (*r*) *Correlation coefficient (r)*	0,9986		
Прецизионность, % (внутридневная // междневная) *Precision, % (intra-day // inter-day)*			
150 нМ / *nM*	3,1–7,0 // 5,5		
25 нМ / *nM* **	2,9–8,1 // 6,0		
5,5 нМ / *nM*	4,6–8,9 // 6,7		
0,6 нМ / *nM*	4,3–11,0//9,0		
Точность, % (в одном цикле // между циклами) ***Accuracy, % (intra-cycle (n = 3) // inter-cycle (n = 9))***	**Теоретическое значение ИД, %** ***Expected inhibitory action, %***	**Полученные значения ИД, %** ***Observed inhibitory action, %***	**Точность, %** ***Accuracy, %***
150 нМ / *nM*	62,5	56,3–67,0 // 61,4 ± 3,4	90–107 // 98
25 нМ / *nM* **	49,4	45,3–54,0 // 50,2 ± 3,0	92–109 // 102
5,5 нМ / *nM*	38,6	35,2–41,2 // 38,7 ± 2,6	91–107 // 100
0,6 нМ / *nM*	22,6	20,2–27,2 // 23,6 ± 2,1	89–120 // 105

* *y – ИД (ингибирующее действие), %; x – концентрация занамивира гидрата, нМ.*
** *концентрация занамивира гидрата (25 нМ), принятая за номинальную, для которой ИД наиболее близко к значению 50%.*
* *y – inhibitory action, %; x – zanamivir hydrate concentration, nM.*
** *This concentration of zanamivir hydrate (25 nM) was taken as the nominal value; its inhibitory action was the closest to 50%.*

Точность в общем случае должна составлять 85–115%, для НПКО – 80–120%. Полученные результаты (90–109%, для НПКО 89–120%) соответствовали этим требованиям. Прецизионность также должна быть не более 15%, полученные значения (3,1–8,9%, для НПКО 4,3–11,0%) соответствовали требованиям, предъявляемым для биоаналитических методов анализа[9].

При использовании тест-систем *in vitro / ex vivo*, содержащих ферменты, для соединений, практически нерастворимых в воде, исследователи часто сталкиваются с проблемой выбора растворителей, совместимых с данной тест-системой.

Решение данной проблемы возможно двумя путями:

[9] Guidance for industry: Bioanalytical method validation. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine; 2018.
Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009. London: Committee for Medicinal Products for Human Use; 2011.

Таблица 4. *Влияние растворителей на активность нейраминидазы ($\bar{X}$ ± SD, n = 3)*

Table 4. *Solvent effects on neuraminidase activity ($\bar{X}$ ± SD, n = 3)*

Растворитель* *Solvent**	**Активность нейраминидазы, мМЕ/л** *Neuraminidase activity, mIU/L*
Вода очищенная / рабочий буферный раствор *Purified water / assay buffer solution*	141 ± 9
2-гидроксипропил-β-циклодекстрин в воде (2 мг/мл) *(2-Hydroxypropyl)-β-cyclodextrin in water*	157 ± 12
Диметилсульфоксид 100% *100% Dimethyl sulfoxide*	111 ± 1**
Диметилсульфоксид 50% *50% Dimethyl sulfoxide*	193 ± 31
Этанол 50% *50% Ethanol*	301 ± 36**
Метанол 100% *100% Methanol*	463 ± 24**
Метанол 50% *50% Methanol*	435 ± 5***
2-гидроксипропил-β-циклодекстрин в метаноле (2 мг/мл) *(2-Hydroxypropyl)-β-cyclodextrin in methanol (2 mg/mL)*	413 ± 16***
Полисорбат 80 5% *5% Polysorbate 80*	193 ± 23

* *Концентрация растворителя указана без учета разбавления в реакционной смеси.*
** *Полученные значения скорости ферментативной реакции имеют статистические отличия от значений, полученных для воды очищенной.*
*** *Полученные значения скорости ферментативной реакции имеют статистические отличия от значений, полученных для воды очищенной ($p < 0,05$), но не имеют отличий от значений, полученных для метанола ($p \geq 0,05$). Оценка влияния растворителя на активность фермента была проведена при помощи однофакторного дисперсионного анализа с последующим апостериорным сравнением критерия Тьюки при $p < 0,05$.*
* *The concentrations of solvents in the table do not account for dilution in the reaction mixture.*
** *The values of enzymatic reaction rate are significantly different from the values obtained with purified water.*
*** *The values of enzymatic reaction rate are significantly different from the values obtained with purified water ($p < 0.05$), but do not differ from the values obtained with methanol ($p \geq 0.05$). The effect of solvents on enzyme activity was evaluated using one-way analysis of variance followed by Tukey's test at $p < 0.05$.*

1) предварительная оценка влияния растворителя на активность фермента;
2) получение водорастворимых комплексов нерастворимого соединения при использовании различных полимеров.

В качестве возможных растворителей были выбраны диметилсульфоксид (ДМСО) 50 и 100%, спирт этиловый 50%, метанол 50 и 100%, полисорбата 80 раствор 5% *(табл. 4)*. Также было оценено возможное влияние 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина, на основе которого был получен комплекс включения биснафтазарина, на активность нейраминидазы.

Среднее значение скорости ферментативной реакции для воды очищенной было принято в качестве номинальной скорости реакции.

На основании полученных данных необходимо отметить следующее:

- ДМСО 50% и полисорбата 80 раствор 5% не оказывают статистически значимого влияния на скорость ферментативной реакции по сравнению с водой очищенной. Данные растворители могут быть рекомендованы для приготовления растворов тестируемых субстанций;
- β-ЦД не оказывает влияния на активность нейраминидазы;
- ДМСО 100% ингибирует действие нейраминидазы в среднем на 27%, что больше допустимого уровня 15%, поэтому в дальнейшем для приготовления растворов тестируемых субстанций его применение было признано нецелесообразным;
- спирт этиловый 50%, метанол 50 и 100% повышают активность нейраминидазы, что может быть обусловлено лучшей растворимостью флуоресцентной метки 4-MU в буферных растворах в присутствии этих растворителей. Их применение может быть целесообразным, если тестируемые соединения невозможно растворить иными способами. Ингибирующее действие тестируемых образцов оценивается

Таблица 5. *Влияние тестируемых образцов на активность фермента нейраминидазы, ингибирующее действие, % ($\overline{X}$ ± SD, n = 3)*

Table 5. *The impact of tested samples on neuraminidase activity, expressed as inhibitory action, % ($\overline{X}$ ± SD, n = 3)*

Название испытуемого образца *Name of the tested sample*	**Концентрация в реакционной смеси** *Concentration in the reaction mixture*		**Ингибирующее действие, %** *Inhibitory action, %*
	мкг/мл *μg/mL*	**нМ** *nM*	
Комплекс 1% биснафтазарина с 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином* *1% complex of bisnaphthazarin with 2-hydroxypropyl-b-cyclodextrin**	0,008	17,0	30 ± 5
	0,084	170	42 ± 2
	0,84	1700	67 ± 2
Занамивира гидрат** *Zanamivir hydrate***	0,56	550	75 ± 9
Осельтамивир** *Oseltamivir***	0,002	6,0	42 ± 3
	0,010	32,0	76 ± 5

* *Концентрация комплекса приведена в пересчете на субстанцию, т.е. в реакционной смеси концентрация комплекса в целом в 100 раз больше и составила 0,8; 8,4 и 84 мкг/мл.*
** *Положительные контроли, ингибиторы нейраминидазы.*
* *Concentrations of the complex are expressed as active substance concentrations; i.e., the overall concentration of the complex in the reaction mixture was 100 times higher and amounted to 0.8; 8.4, and 84 mg/mL, respectively.*
** *Positive controls, neuraminidase inhibitors.*

по отношению к соответствующему отрицательному контролю, т.е. выбранный растворитель используется в качестве отрицательного контроля.

Для тестирования водорастворимых соединений, в том числе положительных контролей (занамивира гидрата, осельтамивира) в качестве растворителя выбрана вода очищенная.

В *таблице 5* представлены результаты определения влияния контрольных веществ (занамивира и осельтамивира) и БН-β-ЦД на активность фермента нейраминидазы.

Тестирование субстанции природного биснафтазарина без комплекса включения затруднительно, так как субстанция нацело не растворяется ни в одном из предложенных растворителей. Поэтому было принято решение о тестировании этой субстанции в составе комплекса с 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином. Особенности технологии получения такого комплекса описаны в литературе [17].

1% комплекс БН-β-ЦД оказывает выраженное ингибирующее действие на активность фермента нейраминидазы, IC_{50} которого составило 273 ± 28 нМ (n = 3). Пигменты биснафтазарины могут быть рекомендованы для дальнейшего изучения как перспективные субстанции для создания препаратов для лечения инфекционных заболеваний.

Эффективность ингибитора значительно зависит от биологического происхождения фермента. В нашем исследовании использовали бактериальную нейраминидазу. В ряде работ [8, 15, 18] для *in vitro* тестирования были использованы нейраминидазы как бактериального, так и вирусного происхождения. В целом было показано ингибирующее действие ряда соединений, в том числе занамивира и осельтамивира, против как вирусной, так и бактериальной нейраминидазы, но в бóльших концентрациях. Для соединений, ингибирующих бактериальную нейраминидазу, можно прогнозировать наличие ингибирующего действия в отношении вирусной нейраминидазы.

Использованная в работе валидированная методика является доступной для большинства аналитических лабораторий и пригодной для скрининга и выбора для дальнейшего тестирования соединений — ингибиторов нейраминидаз, потенциальных кандидатов в лекарственные средства.

Заключение

Разработана и валидирована быстрая, воспроизводимая и достаточно простая методика определения ингибирующего действия веществ по отношению к ферменту нейраминидазе с использованием флуоресцентного субстрата 2'-4(4-метилумбеллиферил)-α-D-N-ацетилнейраминовой кислоты (4MU-NANA). Методика валидирована по показателям специфичности, линейности, точности и прецизионности, удовлетворяет современным валидационным требованиям и может быть использована в дальнейшем

для оценки ингибирующего действия различных веществ на изучаемый фермент — потенциальных кандидатов в лекарственные средства.

Для контрольного образца занамивира гидрата значение IC_{50} составило 27 ± 3 нМ, для контрольного образца осельтамивира IC_{50} = 16 ± 2 нМ. Полученные данные не противоречат данным литературы, что подтверждает корректность постановки методики.

Для тестирования субстанции рекомендуется использовать следующие растворители: ДМСО 50%, полисорбата 80 раствор 5%, спирт этиловый 50% и метанол 50 и 100%. При применении таких растворителей, как этанол и метанол, *in vitro* отмечено повышение активности нейраминидазы по сравнению с другими растворителями, однако при расчете ингибирующего действия их влияние как отрицательных контролей учитывается и не искажает получаемых данных. Для тестирования труднорастворимых соединений возможно рекомендовать получение комплексов включения с 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином. Раствор 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина не оказывает статистически значимого влияния на активность нейраминидазы.

Комплекс 1% биснафтазарина природного происхождения с 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином является ингибитором нейраминидазы, IC_{50} которого составило 273 ± 28 нМ, и может быть рекомендован для дальнейшего изучения как фармацевтическая субстанция, активная в отношении инфекционных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Лусс ЛВ. Современные принципы диагностики и терапии гриппа. *Русский медицинский журнал*. 2007;(5):407. [Luss LV. Modern principles of diagnosis and therapy of influenza. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*. 2007;(5):407 (In Russ.)]
2. Митрофанова ВН, Мельников ВЛ, Юрина НВ, Бурко ПА. Сравнительный анализ клинико-эпидемиологических особенностей течения гриппа A (H1N1/2009) в период эпидемиологического подъема заболеваемости. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2010;15(3):74–5. [Mitrofanova VN, Mel'nikov VL, Yurina NV, Burko PA. Comparative analysis of clinical and epidemiological features of influenza A (H1N1/2009) during the epidemic rise in cases. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Meditsinskie nauki. = University Proceedings. Volga Region. Medical Sciences*. 2010;15(3):74–5 (In Russ.)]
3. Якимов СС. Рациональный подход к комплексной терапии гриппа. *Медицинский совет*. 2013;1–2:26–31. [Yakimov SS. Rational approach to complex treatment of influenza. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*. 2013;1–2:26–31 (In Russ.)]
4. Филдс Б, Найп Д, ред. *Вирусология*. Т. 2. М.: Мир; 1989. [Fields B, Knipe D, eds. *Virology*. V. 2. Moscow: Mir; 1989 (In Russ.)]
5. Ohuchi M, Feldmann A, Ohuchi R, Klenk HD. Neuraminidase is essential for fowl plague virus hemagglutinin to show hemagglutinating activity. *Virology*. 1995;212(1):77–83. https://doi.org/10.1006/viro.1995
6. Jagadesh A, Salam AA, Madgal PP, Arunkumar G. Influenza virus neuraminidase (NA): a target for antivirals and vaccines. *Arch Virol*. 2016;161(8):2087–94. https://doi.org/10.1007/s00705-016-2907-7
7. Штыря ЮА, Мочалова ЛВ, Бовин НВ. Нейраминидаза вируса гриппа: структура и функция. *Acta Naturae*. 2009;1(2):28–34. [Shtyrya YA, Mochalova LV, Bovin NV. Influenza virus neuraminidase: structure and function. *Acta Naturae*. 2009;1(2):28–34] https://doi.org/10.32607/20758251-2009-1-2-26-32
8. Jeong HJ, Ryu YB, Park SJ, Kim JH, Kwon HJ, Kim JH, at al. Neuraminidase inhibitory activities of flavonols isolated from Rhodiola rosea roots and their in vitro anti-influenza viral activities. *Bioorg Med Chem*. 2009;17(19):6816–23. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.08.036
9. Sharshov KA, Yurlov AK, Li X, Wang W, Li L, Bi Yu, et al. Avian influenza virus ecology in wild birds of Western Siberia. *Avian Res*. 2017;8(12):1–5. https://doi.org/10.1186/s40657-017-0070-9
10. Buxton RC, Edwards B, Juo RR, Voyta JC, Tisdale M, Bethell RC. Development of a sensitive chemiluminescent neuraminidase assay for the determination of influenza virus susceptibility to zanamivir. *Anal Biochem*. 2000;280(2):291–300. https://doi.org/10.1006/abio.2000.4517
11. Potier M, Mameli L, Belisle M, Dallaire L, Melancon SB. Fluorometric assay with a sodium (4-methylumbelliferyl-α-D-N-acetylneuraminate) substrate. *Anal Biochem*. 1979;94(2):287–96. https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90362-2
12. Engstler M, Talhouk JW, Smith RE, Shauner R. Chemical synthesis of 4-trifluoromethylumbelliferyl-α-D-N-acetylneuraminic acid glycoside and its use for the fluorometric detection of poorly expressed natural and recombinant sialidases. *Anal Biochem*. 1997;250(2):176–80. https://doi.org/10.1006/abio.1997.2205
13. Leang SK, Hurt AC. Fluorescence-based neuraminidase inhibition assay to assess the susceptibility of influenza viruses to the neuraminidase inhibitor class of antivirals. *J Vis Exp*. 2017;(122):55570. https://doi.org/10.3791/55570
14. Wetherall NT, Trivedi T, Zeller J, Hodges-Savola C, McKimm-Breschkin JL, Zambon M, Hayden FG. Evaluation of neuraminidase enzyme assays using different substrates to measure susceptibility of influenza virus clinical isolates to neuraminidase inhibitors: report of the neuraminidase inhibitor susceptibility network. *J Clin Microbiol*. 2003;41(2):742–50. https://doi.org/10.1128/JCM.41.2.742-750.2003
15. Nishikawa T, Shimizu K, Tanaka T, Kuroda K, Takayama T, Yamamoto T, et al. Bacterial neuraminidase rescues influenza virus replication from inhibition by a neuraminidase inhibitor. *PLoS One*. 2012;7(9):e45371. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045371

16. Pozharitskaya ON, Shikov AN, Makarova MN, Ivanova SA, Kosman VM, Makarov VG, et al. Antiallergic effects of pigments isolated from green sea urchin (Strongylocentrotus droebachiensis) shells. *Planta Med*. 2013;79(18):1698–704. https://doi.org/10.1055/s-0033-1351098
17. Никитин НА. Циклодекстрины и их комплексы включения. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2015;(6):3–11. [Nikitin NA. Cyclodextrins and their inclusion complexes. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2015;(6):3–11 (In Russ.)]
18. Quosdorf S, Schuetz A, Kolodziej H. Different inhibitory potencies of oseltamivir carboxylate, zanamivir, and several tannins on bacterial and viral neuraminidases as assessed in a cell-free fluorescence-based enzyme inhibition assay. *Molecules*. 2017;22(11):1989. https://doi.org/10.3390/molecules22111989

Вклад авторов. *Н.М. Фаустова* — планирование исследования, разработка и валидации методики, обработка и систематизация экспериментальных данных, подготовка и доработка рукописи; *С.С. Петлицкая* — анализ образцов, валидация методики; *И.Н. Ампилогова* — получение образцов биснафтазарина, критическая переработка текста, проверка и коррекция перевода на английский язык; *М.В. Карлина* — обсуждение и интерпретация результатов, доработка рукописи; *М.Н. Макарова* — критический пересмотр текста и представленных данных, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; *В.Г. Макаров* — концепция исследования.

Благодарности. Работа выполнена как инициативное исследование без финансовой поддержки. Авторы выражают признательность и благодарность ст. научн. сотруднику Ю.В. Дадали (ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации») за получение и предоставление для тестирования 1% комплекса биснафтазарина с 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином.

Конфликт интересов. М.Н. Макарова является членом редакционной коллегии журнала *«Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств»*, остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. *Natalia M. Faustova* — research planning, development and validation of the method, processing and organisation of experimental data, drafting and editing of the article; *Seraphima S. Petlitskaya* — samples testing and method validation; *Irina N. Ampilogova* — obtaining of bisnaphthazarin samples, revision of the text, checking and correction of the translation; *Marina V. Karlina* — discussion and interpretation of the results, revision of the paper; *Marina N. Makarova* — revision of the text and illustrative material, approval of the final version of the article for publication; *Valery G. Makarov* — design of the study concept.

Acknowledgements. The research was author-initiated and received no financial support. The authors are grateful to Yu.V. Dadali (St.-Petersburg Institute of Pharmacy) for obtaining and providing 1% complex of bisnaphthazarin with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin for testing.

Conflict of interest. Marina N. Makarova is a member of the Editorial Board of *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*, the other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Фаустова Наталья Михайловна, канд. хим. наук.
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6866-5741
faustova.nm@doclinika.ru
Петлицкая Серафима Сергеевна.
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4735-3079
petlitskaya.ss@doclinika.ru
Ампилогова Ирина Николаевна, канд. хим. наук.
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0833-3371
ampilogova.in@doclinika.ru
Карлина Марина Валерьевна, канд. биол. наук.
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6292-8934
karlina.mv@doclinika.ru
Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук.
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3176-6386
makarova.mn@doclinika.ru
Макаров Валерий Геннадьевич, д-р мед. наук.
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2447-7888
makarov.vg@doclinika.ru

Natalia M. Faustova, Cand. Sci. (Chem.).
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6866-5741
faustova.nm@doclinika.ru
Seraphima S. Petlitskaya.
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4735-3079
petlitskaya.ss@doclinika.ru
Irina N. Ampilogova, Cand. Sci. (Chem.).
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0833-3371
ampilogova.in@doclinika.ru
Marina V. Karlina, Cand. Sci. (Biol.).
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6292-8934
karlina.mv@doclinika.ru
Marina N. Makarova, Dr. Sci (Med.).
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3176-6386
makarova.mn@doclinika.ru
Valery G. Makarov, Dr. Sci (Med.).
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2447-7888
makarov.vg@doclinika.ru

Статья поступила 29.09.2021
После доработки 10.01.2022
Принята к печати 07.06.2022
Online first 16.06.2022

Article was received 29 September 2021
Revised 10 January 2022
Accepted for publication 7 June 2022
Online first 16 June 2022