

© Коллектив авторов, 2018  
УДК 615.281.8+615.036.8

Емельянова А.Г.<sup>1</sup>, Никифорова М.В.<sup>2</sup>, Дон Е.С.<sup>1</sup>, Махмудова Н.Р.<sup>3</sup>, Фалынскова И.Н.<sup>3</sup>,  
Глубокова Е.А.<sup>3</sup>, Петрова Н.В.<sup>1</sup>, Горбунов Е.А.<sup>2</sup>, Тарасов С.А.<sup>2</sup>

## Результаты исследования влияния анаферона детского на жизненный цикл вируса гриппа A/H1N1 *in vitro*

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д.8

<sup>2</sup> ООО «НПФ «Материя Медика Холдинг», 129272, г. Москва, Россия, ул. Трифоновская, д. 47, стр.1

<sup>3</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Россия, Малый Казенный переулок, д. 5а

**Цель** исследования — изучение возможного прямого влияния препарата «Анаферон детский» на жизненный цикл вируса гриппа А в процессе развития инфекции, а также дозозависимости противовирусного эффекта *in vitro*. **Методика.** Исследование противовирусной активности препарата «Анаферон детский» *in vitro* было проведено с использованием культуры клеток MDCK (Madin Darby canine kidney) и эталонных штаммов вируса гриппа А (H1N1) pdm09: A/California/07/09 и A/California/04/09, полученных от ВОЗ. Использовались методы оценки подавления Анафероном детским вирусной репликации (по результатам иммуноферментного анализа по определению экспрессии внутренних белков NP и M1 вируса гриппа А) и его влияние на ультраструктурные особенности морфогенеза вируса гриппа методом электронной микроскопии. В качестве положительного контроля был использован Озельтамивир карбоксилат в концентрации 10 мкМ. Для мониторинга валидности экспериментальной модели в работе использовали клетки, зараженные вирусом без добавления экспериментальных образцов (контроль вируса), а также интактные клетки (клеточный контроль). **Результаты.** В ходе исследования показан дозозависимый противовирусный эффект препарата «Анаферон детский» для 3 тестируемых разведений — 1/8, 1/12, 1/16. Методом электронной микроскопии показано, что применение препарата «Анаферон детский» при сравнении с контрольным образцом влияло на процесс почкования вирионов. **Заключение.** Впервые показана дозозависимость противовирусного действия препарата «Анаферон детский», а также подтверждена его эффективность в отношении двух штаммов вируса пандемического гриппа А/H1N1. Документировано, что применение препарата «Анаферон детский» нарушает жизненный цикл вируса гриппа А. Механизмы развития такого эффекта требуют дополнительного изучения, однако можно предположить их связь с ИФН-индуцирующими свойствами препарата «Анаферон детский», так как было показано, что в начале лечения вирусной инфекции препарат вызывает индукцию синтеза белков системы интерферонов.

**Ключевые слова:** вирус гриппа А; Анаферон детский; интерферон-гамма.

**Для цитирования:** Емельянова А.Г., Никифорова М.В., Дон Е.С., Махмудова Н.Р., Фалынскова И.Н., Глубокова Е.А., Петрова Н.В., Горбунов Е.А., Тарасов С.А. Результаты исследования влияния анаферона детского на жизненный цикл вируса гриппа А/H1N1 *in vitro*. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(3): 87—94.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.03.87-94

**Для корреспонденции:** Емельянова Александра Геннадиевна, науч. сотр. лаб. физиологически активных веществ ФГБНУ НИИОПП, e-mail: agemelianova@gmail.com

**Финансирование.** ООО «НПФ «Материя Медика Холдинг» выступала в роли спонсора описанных исследований.

**Конфликт интересов.** ООО «НПФ «Материя Медика Холдинг» выступала в роли спонсора описанных исследований. Никифорова М.В., Горбунов Е.А. и Тарасов С.А. являются сотрудниками ООО «НПФ «Материя Медика Холдинг». ООО «НПФ «Материя Медика Холдинг» осуществляет производство и продажу препаратов «Анаферон» и «Анаферон детский».

Поступила 17.01.2018

Emelyanova A.G.<sup>1</sup>, Nikiforova M.V.<sup>2</sup>, Don E.S.<sup>1</sup>, Makhmudova N.R.<sup>3</sup>, Falynskova I.N.<sup>3</sup>,  
Glubokova E.A.<sup>3</sup>, Petrova N.V.<sup>1</sup>, Gorbunov E.A.<sup>2</sup>, Tarasov S.A.<sup>2</sup>

## Effect of anaferon for children on the *in vitro* life cycle of influenza virus A/H1N1

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8 Baltiyskaya Str., 125315, Moscow, Russia

<sup>2</sup> LLC NPF Materia Medica Holding, Trifonovskaya Str. 47-1, Moscow, 112927, Russia

<sup>3</sup> I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Serums, Maliy Kazenniy Pereulok 5a, 105064, Moscow, Russia

**The aim** of this study was to evaluate a possible direct effect of Anaferon for Children on the life cycle of influenza A virus during infection development and a dose response of the antiviral effect *in vitro*. **Methods.** The *in vitro* antiviral activity of Anaferon for Children was studied on cultured MDCK cells and reference strains of influenza virus A (H1N1) pdm09: A/California/07/09 and A/California/04/09, both from the WHO. Inhibition of viral replication by Anaferon for Children and its effect on ultrastructural features of the influenza morphogenesis were evaluated using electron microscopy. **Results.** The study demonstrated a dose dependence of Anaferon for Children antiviral activity for three dilutions — 1/8, 1/12, and 1/16. Anaferon for Children affected the process of virion budding as compared to placebo. **Conclusion.** The study showed that the anti-influenza action of Anaferon for Children was dose-dependent and confirmed that this drug was effective against two strains of pandemic A/H1N1 influenza. Furthermore, Anaferon for children disrupted one or several stages of the virus life cycle.

**Keywords:** influenza A; Anaferon for children; interferon gamma.

**For citation:** Emelyanova A.G., Nikiforova M.V., Don E.S., Makhmudova N.R., Falynskova I.N., Glubokova E.A., Petrova N.V., Gorbunov E.A., Tarasov S.A. Results of the study of the influence of anaferon for children on the life cycle of the influenza virus A/H1N1 *in vitro*. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(3): 87—94. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2018.03.87-94

**For correspondence:** Emelyanova Alexandra Gennadiyevna, Research Associate of The Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315; e-mail: agemelianova@gmail.com

**Conflict of interest.** ООО «NPF «Materia Medica Holding» was sponsor of the described studies. Nikiforova M.V., Gorbunov E.A. and Tarasov S.A. are employees of ООО «NPF «Materia Medica Holding». ООО «NPF «Materia Medica Holding» produces and markets drugs «Anaferon» and «Anaferon for children». The article's materials have not been published anywhere before.

**Fundation.** The study was sponsored by ООО «NPF «Materia Medica Holding».

#### Information about authors:

Don E.S., <https://orcid.org/0000-0001-8219-0482>

Falynskova I.N., <http://orcid.org/0000-0001-9836-9620>

Petrova N.V., <http://orcid.org/0000-0002-2192-7302>

Gorbunov E.A., <https://orcid.org/0000-0001-7547-1008>

Received 17.01.2018

## Введение

Ключевую роль в структуре острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) играет вирус гриппа, способный создавать чрезвычайные эпидемические ситуации, что может вызывать серьезные медицинские и социально-экономические последствия [1]. ВОЗ в качестве основного средства борьбы с гриппозной инфекцией рекомендована вакцинация, однако, в связи со способностью поверхностных белков вируса гриппа гемагглютинина и нейраминидазы подвергаться быстрым и непредсказуемым изменениям, эффективность ее применения ограничена [2]. В дополнение к вакцинации ВОЗ также рекомендовано применение противовирусных препаратов. Тем не менее, перечень таких средств весьма ограничен в связи как с побочными эффектами, так и с лекарственной резистентностью, известной для большинства из них [3—6]. Таким образом, создание эффективного и безопасного противовирусного препарата является одной из приоритетных задач медицинской науки.

Современным препаратом с высоким уровнем эффективности и безопасности, показанным как

в многочисленных доклинических, так и в клинических исследованиях, является препарат Анаферон, созданный на основе релиз-активных антител к интерферону-гамма (ИФН) [7—10]. Для Анаферона и его формы для применения у детей (Анаферона детского) продемонстрирована высокая эффективность в отношении широкого спектра вирусных инфекций, в том числе особо опасных (например, вызванных Озельтамивир-резистентными штаммами вируса гриппа А) [11], а также эффективность, сравнимая с Озельтамивиром [7] — препаратом для лечения потенциально опасного или осложнённого гриппа у пациентов с тяжелыми заболеваниями [12]. Кроме того, для препарата был показан дозозависимый характер противовирусной активности на модели *in vivo* [13]. Ранее для Анаферона было показано влияние на иммунный неспецифический ответ организма хозяина [14].

*Цель исследования* — изучение возможного влияния препарата на жизненный цикл патогена в процессе развития инфекции, а также дозозависимый противовирусный эффект *in vitro*.

## Методика

Использована культура клеток MDCK (Madin Darby canine kidney) — стандартная [15] перевиваемая культура клеток почки собаки, которая позволяет оценить противовирусный эффект тестируемых препаратов в отношении выбранных штаммов вируса гриппа. Клетки MDCK высевали на 96- (в экспериментах по дозозависимости) и 24-луночные (эксперименты по изучению морфогенеза) культуральные планшеты (по  $3,5 \times 10^4$  кл/лун) и выращивали в течение 1 сут. до полного образования клетками монослоя.

Использовали эталонные штаммы вируса гриппа A(H1N1)pdm09: A/California/07/09 и A/California/04/09, полученные из ВОЗ.

Препараты тестировали в зашифрованном виде (слепое исследование), в качестве водных растворов, готовых к использованию. В обоих экспериментах, по изучению как дозозависимости эффектов, так и влияния тестируемых образцов на морфогенез вируса, были сформированы следующие экспериментальные группы: клетки, в среду для инкубации которых вносили соответственно — Анаферон детский и плацебо. В качестве исходной дозы для подтверждения наличия противовирусной активности тестируемых образцов было выбрано разведение 1/8, а затем для выявления их дозозависимости — 1/8, 1/12, 1/16; для изучения влияния на морфогенез гриппозной инфекции — 1/5, из расчета в объемных долях от общего объема среды на лунку. Данные дозы были выбраны как максимально переносимые для данной клеточной культуры, не оказывающие цитотоксического действия на клетки, различие доз в обоих экспериментах связано с особенностями использованной культуры клеток и методик определения цитотоксичности в разных лабораториях (данные не представлены). В качестве препарата сравнения был использован Озелтамивир карбоксилат в концентрации 10 мкМ [5]. Для мониторинга валидности экспериментальной модели в работе использовали клетки, зараженные вирусом без добавления экспериментальных образцов (контроль вируса), а также интактные клетки (клеточный контроль).

В экспериментах по изучению дозозависимого характера противовирусной активности клетки инкубировали с препаратами в течение 4 ч при 37°C, а затем заражали вирусом A/California/04/09(H1N1)pdm09 в дозе 0,1 и 1 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на клетку. Планшеты инкубировали в течение 24 ч (5% CO<sub>2</sub>, 37°C), отсутствие цитотоксических и цитопатических изменений фиксировали под инвертированным микроскопом. Затем удаляли инкубационную среду, клетки фиксировали (в 0,01M растворе фосфатно-солевого буфера (ФСБ)) в течение 20 мин, высушивали и трижды

отмывали раствором ФСБ с 0,05% Твин-20. Все дальнейшие процедуры проводили в соответствии с техникой постановки ИФА для выявления антигена. К клеткам добавляли по 100 мкл раствора ФСБ с 1% фетальной сывороткой и 0,05% Твин-20 и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После удаления раствора к клеткам вносили моноклональные антитела к внутренним белкам вируса гриппа А (NP+M1), разведенным 1:1000 в ИФА-растворе. После инкубации с антителами (1 ч, 37°C) и необходимой отмывки, в лунки вносили меченные пероксидазой хрена IgG козы против IgG мыши, в разведении 1:5000 и инкубировали (1 ч, 37°C). Связанную пероксидазу выявляли добавлением в лунки раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, являющегося её субстратом и дающего при окислении цветной продукт. Оптическую плотность (ОП) измеряли на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Каждая точка эксперимента была поставлена в 5 повторах. Процент ингибирования вирусной репродукции определяли по формуле:

$$\text{Ингибирование, \%} = \frac{100 - (\text{ОП}_{\text{опыт}} - \text{ОП}_{\text{клет. контроль}})}{(\text{ОП}_{\text{вирусный контроль}} - \text{ОП}_{\text{клет. контроль}})}$$

Статистический анализ проводился с помощью статистического пакета R 3.2.1 [16]. Статистическую значимость различий оценивали при помощи критерия Краскела—Уоллиса с апостериорным критерием Данна. Статистически значимыми считали различия между группами, если параметр  $p$  не превышал 0,05. Результаты представлены в виде % и нормированы на соответствующие клеточные контроли.

Далее изучали влияние Анаферона детского на ультраструктурные особенности морфогенеза вируса гриппа: за 1 сут до заражения клетки MDCK обрабатывали тестируемыми образцами, а затем за 1 ч до заражения раствор препарата заменяли на свежий и инфицировали культуру вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в дозе 100 ЦТД50 (50% цитотоксическая доза) на клетку. В качестве клеточного контроля использовали интактные клетки, в качестве вирусного — клетки, зараженные вирусом, и не получавшие препаратов. Эксперимент был выполнен в 3 повторах. Через 3 ч и 16 ч после заражения контрольные и опытные клетки удаляли со дна лунок, осадки фиксировали в растворе тетроксид осмия, приготовленном на какодилатном буфере, в течение 30 мин, затем обезживали растворами этанола и ацетона различной концентрации. Для приготовления твердых блоков клеточный осадок выдерживали последовательно в те-

чение ночи при комнатной температуре в смеси равных объемов ацетона и смолы для заливки (приготовленной на основе смеси для заливки Epon-Araldit), а затем только в смоле, после чего формы переносили в термостат t 56°C для полимеризации. Из полученных блоков на ультрамикротоме Ultracut (Reichert, Austria) готовили ультратонкие срезы, контрастировали цитратом свинца и просматривали на электронном микроскопе JEM-100S (JEOL, Japan) при увеличении 5000—50000. Для каждой исследованной группы просматривали 15—20 клеток.

### Результаты

В первой части эксперимента Анаферон детский в разведении 1/8 продемонстрировал высокий уровень ингибирования вирусной инфекции, сравнимый с таковым для Озельтамивира карбоксилата (таблица).

Полученные результаты позволили перейти к исследованию потенциального дозозависимого характера противовирусного эффекта препарата. Для этого был проведен дополнительный эксперимент с увеличением количества тестируемых доз Анаферона детского до 3 разведений — 1/8, 1/12, 1/16. В экспе-

Таблица

Противовирусная активность образцов в культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа A/California/04/09(H1N1)pdm09

Экспериментальная группа	% ингибирования вирусной репродукции (от клеточного контроля)	
	Доза вируса 1 БОЕ/клетку	Доза вируса 0,1 БОЕ/клетку
Анаферон детский	100%**	100%*
Плацебо	9,8%	27,7%
Озельтамивир карбоксилат	100%**	100%*
Вирусный контроль	0%	0%

Примечание. \* — p<0,05 по сравнению с группой плацебо; \*\* — p<0,01 по сравнению с группой плацебо.

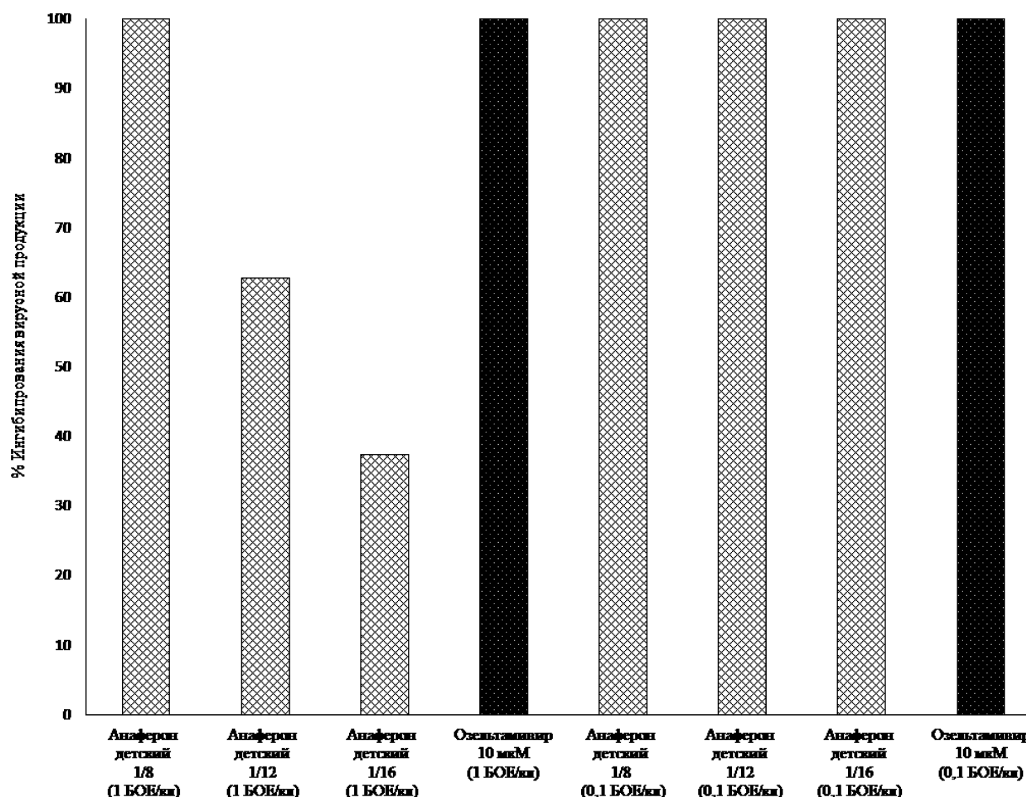


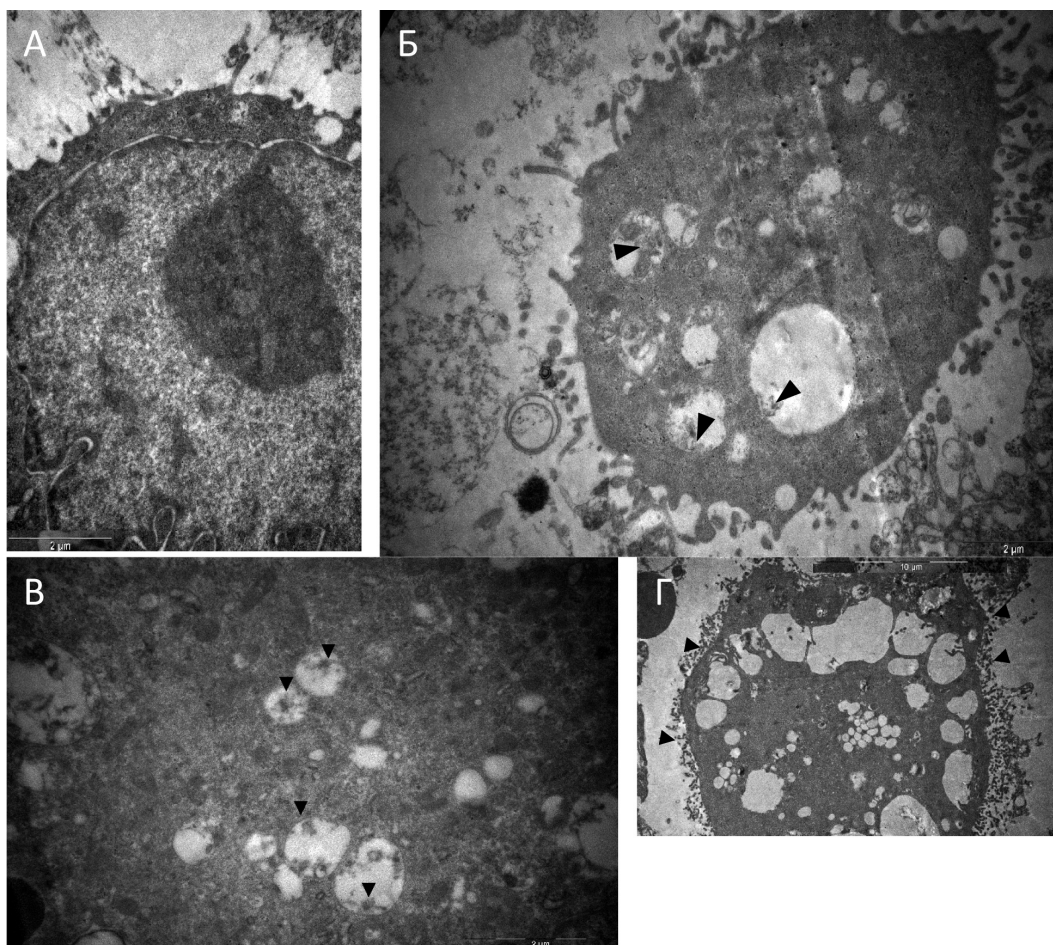
Рис. 1. Ингибирующая активность исследуемых препаратов. Результаты представлены в виде % ингибирования продукции вирусных белков препаратами Анаферон детский и Озельтамивир и нормированы на соответствующие значения оптической плотности для контроля клеток. Ось абсцисс: представлены различные протестированные разведения Анаферона детского при двух использованных заражающих дозах (0,1 БОЕ/клетку, 1 БОЕ/клетку). Ось ординат: представлен % ингибирования продукции вирусных белков.

риментах этой серии при заражении клеток вирусом в дозе 0,1 БОЕ/кл во всех изученных дозах Анаферон детский показал высокий уровень эффективности, сравнимый с Озельтамивира карбоксилатом (рис. 1).

Что касается эксперимента на клетках, заражённых вирусом в более высокой дозе — 1 БОЕ/кл — то в них была показана высокая активность препарата в исследуемых дозах 1/8 и 1/12, сравнимая и статистически значимо не отличающаяся от активности Озельтамивира карбоксилата (рис. 1). Более того, в клетках наблюдалось дозозависимое снижение ингибирования продукции белков вируса при применении исследуемого препарата.

В следующей серии экспериментов изучали особенности морфогенеза вируса гриппа в тестируемой

клеточной культуре MDCK. Интактные клетки (рис. 2, А) имели округлую или продолговатую форму и содержали крупное центрально расположенное лопастевидное ядро, имели типичную для интактных клеток структуру органелл. Заражение клеток приводило к формированию в цитоплазме через 3 ч после инфицирования большого количества вакуолей, содержащих вирионы на разных стадиях слияния с мембраной эндосом (рис. 2, Б, В). Через 16 ч процессы цитодеструкции достигали максимальных показателей: в цитоплазме отчетливо прослеживались признаки цитотоксического действия вируса; сама цитоплазма содержала большое число вакуолей; на поверхности клеток отмечались вирионы потомства, почкующиеся от плазматической мембраны, а также зрелые внеклеточные вирусные частицы (рис. 2Г).



**Рис. 2.** Фотографии ультратонких срезов культуры клеток MDCK интактной и инфицированной вирусом гриппа.

А. Клетка интактной культуры MDCK (Ув.  $\times 6000$ ). Масштабный отрезок — 2 мкм.

Б. Вакуолизация цитоплазмы клетки MDCK через 3 часа после инфицирования вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 (Ув.  $\times 6000$ ). Вирионы в вакуолях указаны стрелками. Масштабный отрезок — 2 мкм.

В. Вирионы в эндосомах клетки MDCK (указаны стрелками) через 3 ч после инфицирования вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 (Ув.  $\times 20000$ ). Масштабный отрезок — 2 мкм.

Г. Вакуолизация цитоплазмы и почкование вирионов потомства от поверхности клетки MDCK через 16 ч после заражения вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 (Ув.  $\times 10000$ ). Почкующиеся вирионы указаны стрелками. Масштабный отрезок — 10 мкм.

### Обсуждение

Применение препарата Анаферон детский и плацебо не изменило наблюдаемой картины при оценке через 3 ч (рис. 3, А, Б), тогда как позднее — через 16 ч — процесс почкования вирионов в присутствии Анаферона детского протекал менее интенсивно (рис. 3, В) по сравнению с группой плацебо (рис. 3, Г). Известно, что часто клеточный дебрис может быть ошибочно принят за вирусы, однако, ключевыми факторами для отличия одного от другого является единая форма и размер вирусных частиц [17]. На рис.3 В и Г стрелками указаны почкующиеся вирионы, форма и размеры которых не различаются, что подтверждает их вирусное (а не клеточное) происхождение.

Ранее в ряде работ была показана эффективность Анаферона детского в отношении штаммов вируса гриппа А/Н1N1, А/Н3N2, А/Н3N8 *in vivo* [7, 11, 18, 19]. В данной работе на разных штаммах вируса гриппа А/Н1N1 Анаферон детский продемонстрировал дозозависимый характер своего противовирусного эффекта при заражении клеток высокой дозой вируса, а также нарушал почкование вирионов гриппа через 16 ч после заражения.

Результаты 1-й серии экспериментов согласуются с данными, полученными ранее для Анаферона дет-

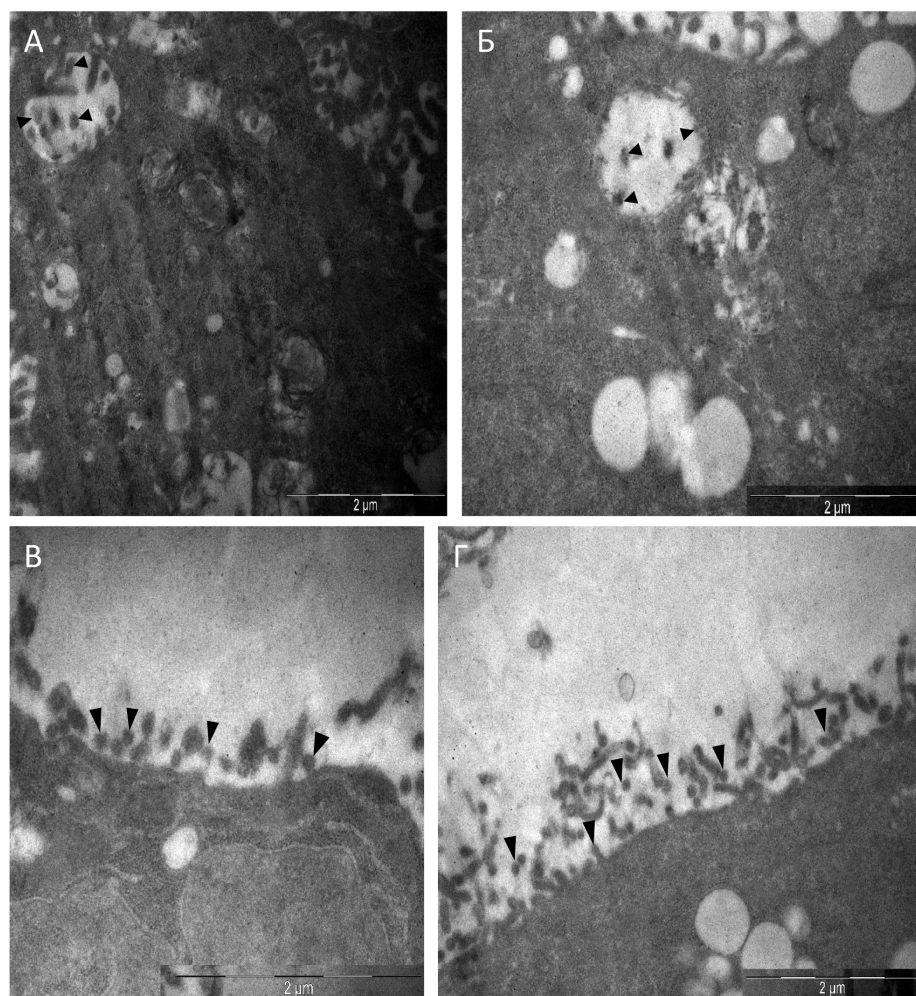


Рис. 3. Фотографии ультратонких срезов культуры клеток MDCK, инфицированной вирусом гриппа и обработанной исследуемыми препаратами.

А. Вакуолизация цитоплазмы и вирионы в эндосомах клетки MDCK через 3 ч после инфицирования вирусом гриппа А/California/07/09 (H1N1)pdm09 в присутствии анаферона детского (Ув. x20000). Вирионы в вакуолях указаны стрелками. Масштабный отрезок — 2 мкм.

Б. Вакуолизация цитоплазмы и вирионы в эндосомах клетки MDCK через 3 ч после инфицирования вирусом гриппа А/California/07/09 (H1N1)pdm09 в присутствии плацебо (Ув. x20000). Вирионы в вакуолях указаны стрелками. Масштабный отрезок — 2 мкм.

В. Почкование вирионов (указано стрелками) потомства от поверхности клетки MDCK через 16 ч после заражения вирусом гриппа А/California/07/09 (H1N1)pdm09 в присутствии анаферона детского (Ув. x20000). Масштабный отрезок — 2 мкм.

Г. Почкование вирионов (указано стрелками) потомства от поверхности клетки MDCK через 16 ч после заражения вирусом гриппа А/California/07/09 (H1N1)pdm09 в присутствии плацебо (Ув. x20000). Масштабный отрезок — 2 мкм.

ского с использованием других экспериментальных моделей [13, 20]. Добавление Анаферона детского в данных экспериментах приводило к снижению продукции вирусных белков NP и M1, что может свидетельствовать о подавлении под действием препарата транскрипции кодирующих данные белки генов по пока невыясненному механизму. Поскольку данные белки критически важны для правильного формирования и сборки вирусных частиц, можно сделать вывод о подавляющем влиянии препарата на вирусную репродукцию.

Результаты 2-й серии экспериментов подтверждают полученные в первой части работы результаты, демонстрируя снижение почкования вирионов потомства от инфицированной клетки, обработанной Анафероном детским. Если ранее в ряде работ для Анаферона детского были показаны свойства индуктора интерферона [9], то результаты этой работы позволяют полагать, что препарат — прямо или опосредованно — препятствует одной или нескольким стадиям вирусной репродукции. Нарушение процесса почкования вирионов может быть объяснено и меньшим количеством синтезируемых белков вируса в присутствии препарата, и последующим нарушением сборки вирионов в условиях низкой продукции вирусных белков, и другими возможными причинами, связанными с влиянием Анаферона детского непосредственно на процесс выхода вирионов.

Стоит отметить, что данная работа является первой, где изучается роль препарата в морфогенезе вируса гриппа, в связи с чем обладает рядом ограничений. В частности, дополнительного детального изучения требуют конкретные этапы жизненного цикла вируса, которые нарушаются в присутствии препарата, а также пути реализации данного эффекта. Однако уже сейчас можно предположить их связь с показанными ранее ИФН-индуцирующими свойствами Анаферона детского: в начале лечения вирусной инфекции препарат вызывает индукцию ИФН — что может приводить к нарушению жизненного цикла вируса в зараженных клетках. Всё это является предметом дальнейшего детального изучения с привлечением не только качественных, но и количественных методов исследования.

Таким образом, представленные эксперименты подтвердили наличие выраженного дозозависимого противовирусного действия препарата Анаферон детский, а также показали его влияние на жизненный цикл вируса на модели гриппозной инфекции *in vitro*. Данные результаты показывают, что применение Анаферона детского является целесообразным в медицинской практике терапии гриппа, а также описывают его влияние на репродукцию вируса гриппа, что может обосновывать противогриппозное действие Анаферона детского.

## References

1. WHO. *Influenza (Seasonal): World Health Organization (2016)*. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/> (accessed 02 August 2016).
2. European Medical Agency. *Vaccines for pandemic influenza* [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/special\\_topics/general/general\\_content\\_000462.jsp&mid=WC0b01ac058004b9ac](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/special_topics/general/general_content_000462.jsp&mid=WC0b01ac058004b9ac) (accessed 07 August 2016).
3. Gubareva L., Okomo-Adhiambo M., Deyde V., Fry A.M., Sheu T.G., Garten R., Smith C., Barnes J., Myrick A., Hillman M., Shaw M., Bridges C., Klimov A., Cox N. Update: drug susceptibility of swine-origin influenza A (H1N1) viruses. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2009; 58: 433-435.
4. Monto A. Viral susceptibility and the choice of influenza antiviral. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; 47: 346-348.
5. Leneva I., Roberts N., Govorkova E., Goloubeva O., Webster R.G. The neuraminidase inhibitor GS4104 (oseltamivir phosphate) is efficacious against A/Hong Kong/156/97 (H5N1) and A/Hong Kong/1074/99 (H9N2) influenza virus. *Antiviral Research*. 2000; 48 (2): 101-115.
6. Leneva I., Goloubeva O., Fenton R., Tisdale M., Webster R.G. Efficacy of zanamivir against avian influenza A viruses that possess genes encoding H5N1 internal proteins and are pathogenic in mammals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001; 45(4): 1216-1224.
7. Tarasov S.A., Zarubaev V.V., Gorbunov E.A., Sergeeva S.A., Epstein O.I. Activity of ultra-low doses of antibodies to gamma-interferon against lethal influenza A(H1N1)2009 virus infection in mice. *Antiviral Research*. 2012; 93(2): 219-24.
8. Petrova N.V., Emelyanova A.G., Gorbunov E.A., Edwards M.R., Walton R.P., Bartlett N.W., Aniscenko J., Gogsadze L., Bakhsoliani E., Khaitov M.R., Johnston S.L., Tarasov S.A., Epstein O.I. Efficacy of novel antibody-based drugs against rhinovirus infection: In vitro and in vivo results. *Antiviral Research*. 2017; 142: 185-92.
9. Epstein O.I. *Ultralow doses (history of one research) [Sverhmaluye dozy (Istoriya odnogo issledovaniya)]*. Moscow; Publishing Office of the Russian Academy of Medical Sciences; 2008. (in Russian)
10. Tarasov S.A., Kachanova M.V., Gorbunov E.A., Zabolotneva J.A., Ertuzun I.A., Belopolskaya M.V. et al. Anaferon, released-active form of antibodies to IFN $\gamma$ , as an effective medicine for treatment and prophylaxis of a wide spectrum of infections. *Clinical Research and Trials*. 2016; 2(5): 229-32.
11. Press release of APCis. Pasteur Institute Flu laboratory and APCis make collaborative research with Materia Medica Holding (2016). Available at: <http://www.ap6.fr/2016/01/27/> (accessed 20 November 2017).
12. World Health Organization. Report of the 21st WHO Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines (2017). Available at: [http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML\\_2017\\_Executive-Summary.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML_2017_Executive-Summary.pdf?ua=1).
13. Don E.S., Emelyanova A.G., Yakovleva N.N., Petrova N.V., Nikiforova M.V., Gorbunov E.A., Tarasov S.A., Morozov S.G., Epstein O.I. Dose-Dependent Antiviral Activity of Released-Active Form of Antibodies to Interferon-Gamma against influenza A/California/07/09(H1N1) in Murine Model. *Journal of Medical Virology*. 2016; 89(5): 759-66.
14. Tarasov S.A., Kachanova M.V., Gorbunov E.A., Zabolotneva J.A., Ertuzun I.A., Belopolskaya M.V., Borodavkina M.V., Dugina J.L., Epstein O.I. Anaferon, released-active form of antibodies to IFN $\gamma$ , as an effective medicine for tre-

atment and prophylaxis of a wide spectrum of infections. *Clinical Research and Trials*. 2016; 2(5): 229-32.

15. Rimmelzwaan G.F., Baars M., Claas E.C., Osterhaus A.D. Comparison of RNA hybridization, hemagglutination assay, titration of infectious virus and immunofluorescence as methods for monitoring influenza virus replication in vitro. *Journal of Virological Methods*. 1998; 74(1): 57-66.

16. Team R.C. R: *A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing (2015)*. Available at: <https://www.r-project.org/> (accessed 20 November 2017).

17. Miller S.E. Detection and identification of viruses by electron microscopy. *Journal of electron microscopy technique*. 1986; 4: 265-301.

18. Shishkina L.N., Skarnovich M.O., Kabanov A.S., Sergeev A.A., Olkin S.E., Tarasov S.A., Belopolskaya M.V.,

Sergeeva S.A., Epstein O.I., Malkova E.M., Stavsky E.A., Drozdov I.G. Antiviral Activity of Anaferon (Pediatric Formulation) in Mice Infected with Pandemic Influenza Virus A(H1N1/09). *Bulleten Eksperimentalnoy Biologii i Meditsiny*. 2007; 149(5): 612-4.

19. Shishkina L.N., Sergeev A.N., Belopolskaya M.V., Kheyfets I.A., Dugina J.L., Sergeeva S.A., Epstein O.I. Study of efficacy of Anaferon detskiy on treatment and prophylactic regime in mice with influenza infection. *Fiziologiya i patologiya immunnoy sistemy*. 2008; 12(1): 10-4 (in Russian)

20. Gavrilova E.S., Bobrovnik S.A., Sherriff G., Myslivets A.A., Tarasov S.A., Epstein O.I. Novel Approach to Activity Evaluation for Release-Active Forms of Anti-Interferon-Gamma Antibodies Based on Enzyme-Linked Immunoassay. *PLoS One*. 2014; 9(5): e97017.

### Сведения об авторах:

Емельянова Александра Геннадиевна, науч. сотр. лаб. физиологически активных веществ ФГБНУ НИИОПП, e-mail: [agemelianova@gmail.com](mailto:agemelianova@gmail.com)

Никифорова Марина Владимировна, руководитель проектов по фармацевтическим технологиям научно-аналитического отдела ООО «НПФ «Материя Медика Холдинг», e-mail: [NikiforovaMV@materiamedica.ru](mailto:NikiforovaMV@materiamedica.ru)

Дон Елена Сергеевна, ст. науч. сотр. лаб. физиологически активных веществ ФГБНУ НИИОПП, e-mail: [don-nelenas@gmail.com](mailto:don-nelenas@gmail.com)

Махмудова Наиля Рамилевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, e-mail: [makhmudova\\_nr@mail.ru](mailto:makhmudova_nr@mail.ru)

Фалынская Ирина Николаевна, науч. сотр. лаб. экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова), e-mail: [falynskova@mail.ru](mailto:falynskova@mail.ru)

Глубокова Екатерина Андреевна, лаборант-исследователь лаб. экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова; студентка ФГБОУ ВО МГАВМиБ — МВА им. К.И. Скрябина, e-mail: [prototy\\_re73.ake@yandex.ru](mailto:prototy_re73.ake@yandex.ru)

Петрова Наталия Владимировна, науч. сотр. лаб. физиологически активных веществ ФГБНУ «НИИОПП», e-mail: [nataliyaapetrova89@gmail.com](mailto:nataliyaapetrova89@gmail.com);

Горбунов Евгений Александрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. научно-аналитического отдела ООО «НПФ «Материя Медика Холдинг», e-mail: [GorbunovEA@materiamedica.ru](mailto:GorbunovEA@materiamedica.ru)

Тарасов Сергей Александрович, канд. мед. наук, начальник научно-аналитического отдела ООО «НПФ «Материя Медика Холдинг», e-mail: [TarasovSA@materiamedica.ru](mailto:TarasovSA@materiamedica.ru)