

Апротинин — новый препарат-кандидат для профилактики SARS-CoV-2 (COVID-19)

Андрей Александрович Иващенко¹, Андрей Александрович Свистунов², Татьяна Владимировна Хоробрых², Владимир Григорьевич Логинов³, Рубен Навасардович Карапетян⁴, Наталья Петровна Мищенко², Станислав Владимирович Поярков⁵, Максим Владимирович Волгин², Елена Владимировна Якубова⁴, Михаил Александрович Топр⁶, О. В. Пьянков⁷, Анастасия Викторовна Магеррамова⁷, Алексей Александрович Томилов⁷, Александр Васильевич Иващенко⁷

Принадлежность к организациям:

¹ Центр высоких технологий «ХимРар», Химки, Московская область, Российская Федерация

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва, Российская Федерация

³ ОАО «Особые экономические зоны», Москва, Российская Федерация.

⁴ Департамент биологических исследований, Научно-исследовательский институт ХимРар, Химки, Московская область, Российская Федерация.

⁵ Центр стратегического планирования федерального медико-биологического агентства (ФМБА) Москва, 119121, Российская Федерация

⁶ Михаил А. Топр — самозанятый, США

⁷ ФГБУ «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, г. Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация

⁸ Исследовательский Институт Химического Разнообразия, Химки, Московская область, Российская Федерация

Автор для отправки корреспонденции: Рубен Навасардович Карапетян, Департамент биологических исследований, Научно-исследовательский институт ХимРар, Химки, Московская область, Российская Федерация, тел.: +7-495-925-30-74, доб. 572; e-mail: rk@chemrar.ru

1. РЕФЕРАТ

Эффективность Апротинина в качестве профилактического лечения COVID-19 изучалась на экспериментальной модели SARS-CoV-2 у хомяков и у медицинского персонала, работающего с пациентами COVID-19 в стационаре. Показана высокая эффективность Апротинина в пред- и постконтактной профилактике SARS-CoV-2.

Ключевые слова: Апротинин, профилактика, SARS-CoV-2, COVID-19

ВВЕДЕНИЕ

Появление нового вируса SARS-CoV-2 и вызванной им инфекции COVID-19 поставило перед мировым сообществом целый ряд проблем. Во всем мире ведется интенсивный поиск терапевтических средств для профилактики SARS-CoV-2 и/или лечения COVID-19.

Одной из важных задач является создание эффективных средств профилактики у людей с высоким риском инфицирования. В первую очередь это работники здравоохранения, образования и военнослужащие.

Несмотря на активные попытки создания вакцин, большинство жизнеспособных вариантов ожидается в 2021 году. Отметим, что первая в мире вакцина против SARS-CoV-2 была зарегистрирована в России 11 августа 2020 года [1]. Однако требуется время, чтобы оценить эффективность вакцины в профилактике SARS-CoV-2 без обострения инфекции, так называемого феномена АЗУ, антителозависимого усиления инфекции, которое наблюдалось при инфекции SARS-CoV в 2003 году. Все это делает чрезвычайно актуальной разработку эффективных специфических профилактических средств.

Не менее важна разработка профилактических средств для пред- или постконтактной профилактики SARS-CoV-2. Несколько препаратов были исследованы или исследуются в клинических исследованиях, включая лопинавир/ритонавир, эмтрицитабин/тенофовир алафенамид или тенофовир дизопроксил фумарат, хлорохин, гидроксихлорохин, нитазоксанид и добавки, такие как цинк, витамин С, супер-комплекс В и витамин D. Испытания моноклональных антител против SARS-CoV-2 и реконвалесцентной плазмы также находятся в стадии разработки. Однако в настоящее время ни один известный агент не может предотвратить инфекцию SARS-CoV-2 [2].

В нескольких исследованиях было показано, что Апротинин эффективно ингибирует репликацию SARS-CoV-2 в клетках Caco-2 (клетки колоректального рака человека, [3]) и Calu-3 (эпителиальные клетки дыхательных путей человека, [4]) *in vitro*. Апротинин — это природный ингибитор протеиназы, полученный из легких крупного рогатого скота и имеющий долгую историю клинического применения с 1960-х годов. Он оказывает широкое действие на протеолитические ферменты, такие как плазмин, трипсин и калликреин. Недавно было показано, что он ингибирует также трансмембранную сериновую протеазу 2 (TMPRSS2) — протеазу клетки-хозяина, ответственную за расщепление и активацию S-белка SARS-CoV-2 [5]. TMPRSS2 широко экспрессируется в эпителиальных клетках дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта и урогенитального тракта [6, 7] и, как было показано, активирует слияние белков ряда респираторных вирусов, включая метапневмовирус человека, вирусы парагриппа человека, а также SARS-CoV и ближневосточный респираторный синдром (БВРС) — CoV *in vitro* [7, 8].

В клинической практике Апротинин применяют для уменьшения кровопотери во время операции и при панкреатите [9, 10]. Апротинин ингибирует высвобождение провоспалительных цитокинов и поддерживает гомеостаз гликопротеинов. В тромбоцитах апротинин уменьшает потерю гликопротеинов (например, GpIb, GpIIb/IIIa), в то время как в гранулоцитах он предотвращает экспрессию провоспалительных адгезивных гликопротеинов (например, CD11b). Благодаря ингибированию многочисленных медиаторов (например, калликреина, плазмина) действие Апротинина приводит к ослаблению воспалительных реакций, фибринолизу и образованию тромбина [11]. Также Апротинин ранее был исследован против вирусов гриппа [12–16] и одобрен для лечения гриппа в виде аэрозоля в России.

Все вместе эти данные свидетельствуют о том, что Апротинин обладает противовирусной и противовоспалительной активностью. Это делает Апротинин привлекательным препаратом-кандидатом для профилактического лечения инфекции SARS-CoV-2. Чтобы подтвердить эту гипотезу, мы протестировали Апротинин на экспериментальной модели SARS-CoV-2 на хомяках. Также его потенциал для профилактического лечения у человека был оценен на медицинском персонале ковидного госпиталя в течение 6 недель лечения в проспективном исследовании.

МЕТОДЫ

Лекарственные препараты

В исследованиях использовали Гордокс® (Апротинин) 10 000 КIU/мл.

Доклиническое исследование

Исследование проводилось в Государственном научно-исследовательском центре вирусологии и биотехнологии «Вектор», г. Кольцово, Новосибирская область, Россия. Штамм SARS-CoV-2 nCov/Victoria/1/2020 был использован в экспериментальной модели на хомяках.

Экспериментальная модель SARS-CoV-2 на хомяках

Самцы сирийских хомяков дикого типа были приобретены у компании «КролИнфор Лтд.» и содержались с неограниченным доступом к пище и воде. Условия размещения и порядок проведения экспериментов были одобрены этическим комитетом по экспериментам на животных.

Хомяки в возрасте 8–10 недель были рандомизированы на две группы – контрольную и группу приема апротинина, по 8 животных в каждой группе. Хомяков анестезировали эфиром и интраназально вводили натриевый физиологический раствор (контроль, 50 мкл/ноздря) или Апротинином (50 мкл = 500 КIU/ноздря, 1000 КIU/животное). Через 1 час после медикаментозной обработки животных заражали $1000 \times \text{CPE}_{50}$ /животное SARS-CoV-2. Лечение животных проводили три раза в день и продолжали в течение 2 дней. Через 2–3 часа после утреннего приема препарата на 3-й день для анализа собирали следующие ткани: смывы из носа и легочные ткани. РНК SARS-CoV-2 измеряли с помощью ПЦР в реальном времени ($\text{Ct} = 40$ при низком пределе количественного определения). Весовые изменения массы тела хомяков определяли на 3-е сутки после введения.

Клиническое исследование

Изучение эффективности профилактического действия Апротинина проводилось в проспективном исследовании «Профилактика и предотвращение прогрессирования Covid-инфекции» (протокол исследования №09-20 от 05.05.2020, утвержденный местным этическим комитетом Первого МГМУ им. И. М. Сеченова 07.05.2020). Оно проводилось у 32 медицинских работников больницы COVID Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова (МГМУ им. И. М. Сеченова), включая медицинский и сестринский персонал, постоянно работавший в «красной зоне» в течение трех

месяцев наблюдения. Среди них: 5 реаниматологов, 2 хирурга, выполнявших трахеостомию и пункцию плевры, 15 врачей и 10 медсестер.

В начале исследования использовалась фармакологическая профилактика SARS-CoV-2 (COVID-19) у взрослых, рекомендованная Министерством здравоохранения Российской Федерации [17]. Однако после первой недели приема гидроксихлорохина в качестве профилактического средства медицинские работники ковидного госпиталя были вынуждены прекратить прием препарата из-за значительных побочных эффектов. Через 3 недели после открытия больницы COVID сотрудники из группы COVID hospital начали использовать назальный спрей Апротинин два раза в день: утром, перед входом в красную зону и вечером, после выхода из красной зоны, 400 KIU два раза в день, всего 800 KIU ежедневно. В качестве поддерживающей терапии персоналу больницы COVID вводили Галавит, иммуномодулирующее средство, 2 таблетки × 25 мг, два раза в день сублингвально, и Кипферон®, индуктор рекомбинантного человеческого интерферона-α2, по 1 суппозиторию два раза в день.

Все испытуемые еженедельно тестировались на наличие SARS-CoV-2 с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). На 6-й неделе все сотрудники были протестированы на специфический IgG.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Интраназальное введение Апротинина достоверно снижало титр РНК SARS-CoV-2 через 3 дня после введения в смывах из носа по сравнению с контрольной группой (рис.1B). РНК SARS-CoV-2 отсутствовала в тканях легких 5 животных из группы Апротинина и была значительно снижена у 3 других хомяков по сравнению с контрольной группой (рис. 1A). Это означает, что профилактическое лечение Апротинином предотвратило размножение и распространение SARS-CoV-2 в легкие. Некоторая разница в массе тела хомяков (рис. 1C) не является статистически значимой и, скорее всего, не связана с влиянием Апротинина.

Проспективное исследование профилактического лечения Апротинином у медицинского персонала МГМУ показало, что только 2 из 30 работников (6,7 %) были инфицированы SARS-CoV-2. Прогрессирование заболевания протекало бессимптомно и определялось только на 6-й неделе с помощью анализа IgG.

ОБСУЖДЕНИЕ

Профилактическое интраназальное введение аprotитина хомякам за 1 час до инфицирования SARS-CoV-2 предотвратило его распространение в легкие и существенно снизило титр РНК SARS-CoV-2 в смывах из носа и легочных тканях (рисунок 1). Это хорошо согласуется с результатами назначения Аprotинина медицинским работникам в ковидной больнице МГМУ — только 2 (6,7 %) человека из 30 были инфицированы и имели легкую степень тяжести симптомов или вообще не имели их. В то же время средний уровень инфицированности медицинских работников может достигать 29 % [14].

У добровольцев, принимавших Аprotинин, в рамках исследования в клинике по лечению COVID МГМУ нежелательные эффекты установлены не были. Все эти данные дают основание для дальнейшего изучения и утверждения Аprotинина в качестве препарата фармакологической профилактики SARS-CoV-2 (COVID-19).

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ. Доклинические исследования проводились в Государственном научно-исследовательском центре вирусологии и биотехнологии «Вектор». Клиническое исследование проводилось Первым Московским государственным медицинским университетом имени И. М. Сеченова.

БЛАГОДАРНОСТЬ. Авторы выражают благодарность также членам независимой комиссии по мониторингу данных, в том числе доктору медицинских наук, профессору Алексею Владимировичу Кравченко из Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии (Москва, Россия), доктору медицинских наук, профессору Российской академии наук, профессору Кириллу Александровичу Зыкову из Московского государственного медикостоматологического университета им. А. И. Евдокимова (Москва, Россия) и доктору медицинских наук, профессору Владимиру В. Рафальскому Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта (Калининград, Россия).

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Министерство промышленности и торговли Российской Федерации

ЛИТЕРАТУРА

1. Первая зарегистрированная в России вакцина от коронавируса Interfax.RU 11 августа 2020 года. <https://www.interfax.ru/news/2020/08/11>. https://sia.ru/?section=484&action=show_news&id=399342
2. Профилактика и предотвращение инфицирования SARS-CoV-2. Последнее обновление: 17 июля 2020 года. Доступно на сайте: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/overview/prevention-of-sars-cov-2/>.
3. Bojkova D, McGreig JE, McLaughlin K-M, Masterson SG, Widera M, Krahling V, Ciesek S, Wass MN, Michaelis M, Cinati jr J. SARS-CoV-2 и SARS-CoV отличаются по клеточному тропизму и профилям чувствительности к препаратам. BioRxiv, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.03.024257>.
4. Bestle D, Heindl MR, Limburg H, et al. TMPRSS2 и фурин являются важными факторами для протеолитической активации SARS-CoV-2 в клетках легочных путей человека. *Life Sci Alliance*. 2020;3(9):e202000786. Published 2020 Jul 23. doi:10.26508/lsa.202000786
5. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. Проникновение клеток SARS-CoV-2 зависит от ACE2 и TMPRSS2 и блокируется клинически доказанным ингибитором протеазы. *Cell*. 2020;181(2):271-280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052
6. Bugge TH, Antalis TM, Wu Q. Трансмембранные сериновые протеазы типа II. 2009. *J Biol Chem* 284:23177-81. Review.
7. Böttcher-Friebertshäuser E. 2018. Связанные с мембранами сериновые протеазы: факторы клетки-хозяина в протеолитической активации вирусных гликопротеинов. В: Böttcher-Friebertshäuser E., Garten W., Klenk H. (eds) Активация вирусов протеазами хозяев. Springer, Cham, p.153-203. Review
8. Hoffmann M, Hofmann-Winkler H, Pöhlmann S. 2018. Время прайминга: как клеточные протеазы вооружают коронавирусные спайковые белки. В: Böttcher-Friebertshäuser E., Garten W., Klenk H. (eds) Активация вирусов протеазами хозяев. Springer, Cham, p.71-98. Review
9. Moggia E, Koti R, Belgaumkar AP, Fazio F, Pereira SP, Davidson BR, Gurusamy KS. Фармакологические вмешательства при остром панкреатите. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Apr 21;4:CD011384.
10. Kapadia BH, Torre BB, Ullman N, Yang A, Harb MA, Grieco PW, Newman JM, Harwin SF, Maheshwari AV. Уменьшение периоперационной кровопотери с помощью антифибринолитиков и антифибринолитикоподобных средств для

пациентов, перенесших тотальное эндопротезирование тазобедренного и коленного суставов. *Orthop.* 2019 Jul 2;16(6):513-516.

11. Trasylol package insert 12/03 ©2003 Bayer Pharmaceuticals Corporation

12. O.P. Zhirnov, H. D. Klenk, P. F. Wright. Апротинин и аналогичные ингибиторы протеаз в качестве лекарственных средств против гриппа. *Antiviral. Res.* 2011, 92(1), 27-36. doi: 10.1016/j.antiviral.2011.07.014

13. O. P. Zhirnov, P. B. Golyando, A. V. Ovcharenko. Репликация вируса гриппа В в куриных эмбрионах подавляется экзогенным апротинином. *Archives of Virology* 1994, 135, 209–216. <https://doi.org/10.1007/BF01309780>

14. Ovcharenko, A. V., & Zhirnov, O. P. (1994). Лечение гриппа и парамиксовирусной бронхопневмонии мышей аэрозолем апротинина. *Antiviral research*, 23(2), 107-118. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(94\)90038-8](https://doi.org/10.1016/0166-3542(94)90038-8).

15. Ovcharenko, A. V., & Zhirnov, O. P. (1994). Лечение гриппа и парамиксовирусной бронхопневмонии мышей аэрозолем апротинина. *Antiviral research*, 23(2), 107-118. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(94\)90038-8](https://doi.org/10.1016/0166-3542(94)90038-8).

16. Shen LW, Mao HJ, Wu YL, Tanaka Y, Zhang W. TMPRSS2: Потенциальная цель для лечения вируса гриппа и коронавируса. *Biochimie.* 2017 Nov;142:1-10.

17. Медицинская профилактика COVID-19 у взрослых. Временные рекомендации Профилактика, диагностика и терапия новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Министерство здравоохранения Российской Федерации, версия 7, стр. 71 (03.06.2020).

https://static-0.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/050/584/original/03062020_%D0%9CR_COVID-19_v7.pdf.

Рисунок 1

Профилактическая эффективность апротинина в отношении заболеваемости хомячков, инфицированных вирусом SARS-CoV-2. Хомячков (n = 8/группа) слегка анестезировали эфиром, а апротинин (1000 КIU/животное) вводили интраназально два раза в день в течение трех дней. Контрольные (нелеченные) животные получали натриевый физиологический раствор по тому же графику. Через час после первой дозы апротинина каждому хомяку интраназально вводили 10^3 СРЕ₅₀ SARS-CoV-2 (100 мкл/животное). Репликацию вируса из образцов, полученных из легочных тканей (а) и смывов из носа (В) хомячков на 3-е сутки после введения, определяли методом количественной ПЦР в режиме реального

времени (предел обнаружения, $C_t = 40$). Изменения массы тела хомяков определяли на 3-е сутки после введения (С). $*P < 0.05$ относительно контрольной группы (t-критерий).

