

## **Апротинин — эффективный мультитаргетный препарат для комбинированной терапии новой коронавирусной инфекции COVID-19 средней степени тяжести.**

Андрей А. Иващенко<sup>1</sup>, Валерия Н. Азарова<sup>2</sup>, Алина Н. Егорова<sup>2</sup>, Рубен Н. Карапетян<sup>3</sup>, Дмитрий В. Кравченко<sup>4</sup>, Наталья В. Кривонос<sup>2</sup>, Владимир Г. Логинов<sup>5</sup>, Станислав В. Поярков<sup>11</sup>, Елена А. Меркулова<sup>2</sup>, Ольга С. Росинкова<sup>6</sup>, Николай Ф. Савчук<sup>7</sup>, Михаил А. Топр<sup>8</sup>, Елена Н. Симакина<sup>6</sup>, Елена В. Якубова<sup>9</sup>, Александр В. Иващенко<sup>1,10</sup>

Принадлежность к организациям:

<sup>1</sup> Центр высоких технологий «ХимРар», Химки, Московская область, Российская Федерация

<sup>2</sup> ООО «ИФАРМА», Инновационный центр «Сколково», Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> Департамент биологии, Исследовательский институт химического разнообразия, Химки, Московская область, Российская Федерация

<sup>4</sup> Департамент химии и производства, Исследовательский институт химического разнообразия, Химки, Московская область, Российская Федерация

<sup>5</sup> АО «Особые экономические зоны», Москва, Российская Федерация

<sup>6</sup> Клиническая больница №1, Смоленск, Российская Федерация

<sup>7</sup> Исследовательский институт химического разнообразия, Химки, Московская область, Российская Федерация

<sup>8</sup> Самозанятый, США

<sup>9</sup> ООО «Кромис», Инновационный центр «Сколково», Москва, Российская Федерация

<sup>10</sup> «КемДив Инк.» (ChemDiv Inc.), Сан-Диего, шт. Калифорния, США

<sup>11</sup> Центр стратегического планирования федерального медико-биологического агентства (ФМБА) Москва, Российская Федерация

Андрей А. Иващенко, доктор наук, профессор, эл. почта: [ai@chemrar.ru](mailto:ai@chemrar.ru)

Валерия Н. Азарова, дипломированный врач, кандидат наук, эл. почта: [avn@ipharma.ru](mailto:avn@ipharma.ru)

Алина Н. Егорова, эл. почта: [ean@ipharma.ru](mailto:ean@ipharma.ru)

Дмитрий В. Кравченко, доктор наук, эл. почта: [dk@chemrar.ru](mailto:dk@chemrar.ru)

Наталья В. Кривонос, кандидат наук, эл. почта: [nvk@ipharma.ru](mailto:nvk@ipharma.ru)

Владимир Г. Логинов, кандидат наук, эл. почта: [vldqru@me.com](mailto:vldqru@me.com)

Станислав В. Поярков, кандидат наук, эл. почта: [royarkov.stanislav@gmail.com](mailto:royarkov.stanislav@gmail.com)

Елена А. Меркулова, эл. почта: [eam@ipharma.ru](mailto:eam@ipharma.ru)

Ольга С. Росинкова, кандидат наук, эл. почта: [o.peregontseva80@mail.ru](mailto:o.peregontseva80@mail.ru)

Николай Ф. Савчук, кандидат наук, эл. почта: [nsavchuk@chemdiv.com](mailto:nsavchuk@chemdiv.com)

Михаил А. Топр, эл. почта: [mtopr@mfm-ny.com](mailto:mtopr@mfm-ny.com)

Елена Н. Симакина, дипломированный врач, эл. почта: [e.simakina@mail.ru](mailto:e.simakina@mail.ru)

Елена В. Якубова, дипломированный врач, эл. почта: [ey@chemrar.ru](mailto:ey@chemrar.ru)

Александр В. Иващенко, доктор наук, проф., [av@chemdiv.com](mailto:av@chemdiv.com)

Автор для отправки корреспонденции:

Рубен Н. Карапетян, кандидат наук, эл. почта: [rk@chemrar.ru](mailto:rk@chemrar.ru), +7 (495) 925-30-74, доб. 572

### **Резюме**

**Основные сведения:** Новая коронавирусная инфекция COVID-19 — это инфекционное мультисистемное воспалительное заболевание, вызванное тяжелым острым респираторным синдромом вследствие инфицирования коронавирусом SARS-CoV-2, которое не имеет специфического лечения. Нами была изучена эффективность комбинаций препаратов Апротинин

(неспецифический ингибитор сериновых протеаз) и Авифавир или Гидроксихлорохин (НСQ) в лечении новой коронавирусной инфекции COVID-19.

**Методы:** Три проспективных одноцентровых (когорты 1–3) исследования включали участников с пневмонией средней степени тяжести, связанной с новой коронавирусной инфекцией COVID-19, у которых наличие SARS-CoV-2 подтверждено результатами лабораторных исследований и которые были госпитализированы. Пациенты получали комбинации препаратов Апротинин внутривенно (в/в) (1000000 КИЕ ежедневно, в течение 3 дней) и Гидроксихлорохин (НСQ) (когорта 1), ингаляцию препаратом Апротинин (625 КИЕ 4 раза в сутки, в течение 5 дней) и НСQ (когорта 2) или терапию препаратами Апротинин в/в (1000000 КИЕ ежедневно, в течение 5 дней) и Авифавир (когорта 3).

**Результаты:** В когортах 1–3 комбинированная терапия показала 100%-ю эффективность в предотвращении перевода пациентов (n = 30) в отделение интенсивной терапии (ОИТ). Эффект комбинированной терапии в когорте 3 был наиболее выраженным, и медиана времени до выведения SARS-CoV-2 составила 3,5 дня (МКР 3,0–4,0), нормализации уровня СРБ составила 3,5 дня (МКР 3–5), концентрации D-димера — 5 дней (МКР 4–5); температуры тела — 1 день (МКР 1–3), улучшения клинического статуса или выписки из больницы — 5 дней (МКР 5–5), уменьшение поражения легких у пациентов на 14й день — 100 %.

**Интерпретация:** Применение комбинаций с препаратом Апротинин сопровождалось сокращением количества пациентов с COVID-19 средней степени тяжести в отделениях интенсивной терапии для искусственной вентиляции легких (ИВЛ) или неинвазивной вентиляции легких (НИВЛ) и сокращением их пребывания в больнице.

**Финансирование** ООО «Авирон», Инновационный центр «Сколково», Москва, Российская Федерация.

## **Контекст исследования**

Необычайное распространение SARS-CoV-2 по всему миру привело к более чем 46 миллионов зарегистрированных случаев заболевания, и более чем 1,198 миллиона смертей по данным на 1 ноября 2020 года. Появляющиеся доказательства ключевой роли сигнального пути инфламмосомы в патогенезе новой коронавирусной инфекции (COVID-19) позволяют выдвинуть гипотезу о том, что использование препарата Апротинин в комбинации с препаратами Авифавир или HCQ, может быть успешным при лечении COVID-19.

Нами была изучена безопасность и эффективность комбинированной терапии препаратами Апротинин в/в и HCQ (когорта 1), ингаляционной терапии препаратом Апротинин и HCQ (когорта 2), Апротинин в/в и Авифавир (когорта 3) у пациентов с COVID-19 средней степени тяжести. Схема лечения в когорте 3 была наиболее эффективной: препарат Апротинин вводили внутривенно в дозе 1000000 КИЕ ежедневно в течение 5 дней, и препарат Авифавир применяли перорально в дозе 2000 мг дважды в первый день, затем по 800 мг два раза в сутки в течение 10 дней. Мы наблюдали быструю нормализацию уровней СРБ и D-димера в крови пациентов, температуры тела, улучшение клинического статуса и уменьшение повреждения легких. Ни один из пациентов не был переведен в отделение интенсивной терапии для ИВЛ или НИВЛ.

Данные результаты дают основание для начала проведения полноценных клинических исследований препарата Апротинин и ингибитора(-ов) репликации SARS-CoV-2 в комбинированной терапии для пациентов с COVID-19 в острой или тяжелой форме.

## **Введение**

Начиная с декабря 2019 года в г. Ухань, Китай, когда были зарегистрированы первые случаи COVID-19, вызванного SARS-CoV-2, вирус быстро распространился по всему миру. Общее количество случаев заражения в мире превысило 46 миллионов в 190 странах, более 1,198 миллиона человек умерли [1]. С учетом того, что COVID-19 представляет серьезную угрозу для общественного здравоохранения и экономики во всем мире, существует острая необходимость в новых эффективных лекарственных средствах для лечения и профилактики инфекции SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2 использует для заражения рецептор ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2), который экспрессируется на высоком уровне в клетках легких, почек, желудочно-кишечного тракта, печени, эндотелия сосудов. Таким образом, COVID-19 — это мультисистемное заболевание, поскольку все эти органы и системы являются потенциальными мишенями для репликации SARS-CoV-2 [2]. В настоящее время в клинической практике используются две широкие категории препаратов от COVID-19: (1) препараты, которые могут напрямую воздействовать на цикл репликации вируса SARS-CoV-2, и (2) препараты, вызывающие ответ врожденного иммунитета на вирус или уменьшающие поражения, вызванные нерегулируемыми воспалительными ответами [3]. Ингибиторы репликации SARS-CoV-2 фавипиравир (Авифавир) [4, 5] и ремдесивир [4] были среди первых препаратов, репозиционированных для лечения COVID-19. Своевременное начало применения этих противовирусных препаратов (до 3–7 дней после заражения) предотвращает прогрессирование заболевания до более тяжелых форм.

Одним из многообещающих потенциальных лекарственных препаратов для комбинированной терапии COVID-19 является Апротинин, природный ингибитор протеаз с длительной историей клинического применения с 1960-х годов и хорошим профилем безопасности [6]. Во-первых, Апротинин — противовирусный препарат широкого спектра действия, поскольку он является неспецифическим ингибитором сериновых протеаз, особенно трипсина, химотрипсина, плазмина и калликреина. Инактивация калликреина блокирует образование фактора XIIa и оказывает негативное влияние на внутренний путь свертывания крови, фибринолиза и образования тромбина, что приводит к ослаблению провоспалительного ответа [7–9]. Во-вторых, Апротинин обладает специфическим механизмом действия в отношении SARS-CoV-2, поскольку он ингибирует трансмембранную сериновую протеазу 2 (TMPRSS2), протеазу клетки-хозяина, ответственную за расщепление и активацию шиповидного белка SARS-CoV-2. Этот механизм действия Апротинина предполагает, что он может предотвратить проникновение SARS-CoV-2 в клетки [10]. Недавно было показано, что Апротинин также ингибирует репликацию SARS-CoV-2, компенсируя сниженный уровень клеточных протеазных ингибиторов [11].

Эти данные привели нас к гипотезе о том, что Апротинин является типичным мультитаргетным препаратом или «волшебным решением» [12] и может представлять собой эффективное лечение пациентов с COVID-19 средней и тяжелой формы. Наши первые пилотные клинические исследования подтвердили это предположение и показали, что Апротинин эффективен в качестве лекарственного кандидата для профилактики [13] и лечения [14] COVID-19. Поэтому мы провели проспективное клиническое исследование и оценили эффективность комбинированной терапии препаратами Апротинин и HCQ или Авифавир у пациентов с COVID-19 средней степени тяжести.

## **Методы**

### **Дизайн исследования и пациенты**

Открытое несравнительное исследование эффективности и безопасности препарата Апротинин у пациентов, госпитализированных с COVID-19, было основано на рекомендациях программы исследований и разработок ВОЗ [15] и Минздрава России от 23 апреля 2020 г. [16]. Пациенты в возрасте 18 лет и старше, госпитализированные с пневмонией средней степени тяжести, связанной с COVID-19 (таблица 1), с диагнозом SARS-CoV-2, подтвержденным положительным результатом ОТ-ПЦР или КТ легких. Исследование проводилось с 11 июня по 7 августа 2020 г. в Смоленской

клинической больнице, Россия. Протокол исследования COVID-19-Апротинин-01 от 1 июня 2020 г. и поправка к протоколу от 25 июня 2020 г. одобрены независимым этическим комитетом Смоленской клинической больницы (протоколы № 38 от 2 июня и 2 июля 2020 г. соответственно) и зарегистрированы в Национальной медицинской базе США [NCT04527133]. Критерии исключения представлены в приложении 1.

### Конечные точки эффективности

Первичной конечной точкой эффективности в исследовании было время до нормализации следующих параметров: элиминация SARS-CoV-2 (т. е. два отрицательных результата анализа ОТ-ПЦР с интервалом не менее 24 часов), концентрации СРБ и D-димера.

Ключевые вторичные клинические конечные точки: время до нормализации температуры тела (< 37 °С); и изменения лабораторных показателей по сравнению с исходными в течение 14 дней, включая показатели анализа крови: значения СРБ, коагулограммы; изменения паренхимы легких по сравнению с исходным уровнем на КТ органов грудной клетки на 7 и 14 дни; частота улучшения клинического статуса на 2 балла в соответствии с Порядковой шкалой клинического улучшения ВОЗ (ВОЗ-OSCI) или выписка из больницы до 14 дня; частота перевода в отделение интенсивной терапии, частота НИВЛ, частота инвазивной вентиляции; уровень смертности; частота нежелательных явлений и серьезных нежелательных явлений различной степени тяжести в соответствии с субъективными жалобами, объективным осмотром, показателями жизненно важных функций, лабораторными анализами и ЭКГ.

### Процедуры

Участников разделили на 3 когорты по 10 пациентов: когорта 1 получала комбинацию препаратов Апротинин (в/в) (Гордокс®, 1000000 КИЕ ежедневно, в течение 3 дней) и HCQ (400/200 мг, два раза в сутки, в течение 5–6 дней) в сочетании со стандартом лечения (SOC); когорта 2 получала комбинацию препаратов Апротинин (ингаляция) (Гордокс® 625 КИЕ 4 раза в день, в течение 5 дней) и HCQ (400/200 мг, два раза в сутки, в течение 5–6 дней) в сочетании с SOC; когорта 3 получала комбинацию препаратов Апротинин (внутривенно) (Гордокс®, 1000000 КИЕ ежедневно, в течение 5 дней) и Авифавир (2000 мг дважды в первый день, затем 800 мг два раза в сутки в течение 10 дней) в сочетании с SOC. Пациентам в когортах 1 – 3 проводили профилактику тромбозов антикоагулянтом эноксапарином (40 мг один раз в сутки, в течение 14–15 дней). Пациенты с оценкой 4 по шкале ВОЗ-OSCI (таблица 1) получали поддерживающую кислородную терапию через носовую канюлю или маску для лица. Ни одному из пациентов не проводилось инвазивной или неинвазивной искусственной вентиляции легких на исходном уровне.

Параметр	Когорта 1	Когорта 2	Когорта 3
Возраст			
Лет, среднее (СО)	44,9 (11,2)	48,2 (10,4)	46,7 (10,6)
Возрастная категория, кол-во (%)			
18–44	4 (40)	4 (40)	4 (40)
45–59	6 (60)	3 (30)	5 (50)
≥ 60	0	3 (30)	1 (10)
Мужчины, кол-во (%)	3 (30)	1 (10)	8 (80)
Женщины, кол-во (%)	7 (70)	9 (90)	2 (20)

Параметр	Когорта 1	Когорта 2	Когорта 3
Масса тела, кг (СО)	74,3 (4,7)	76,7 (6,4)	80,7 (6)
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup> (СО)	25,9 (1,7)	26,9 (2,1)	26,4 (1,5)
Положительный мазок ОТ-ПЦР, %	100	100	100
Продолжительность болезни, дни (СО)	3,4 (1,1)	2,7 (0,7)	3,4 (0,8)
≤ 7 дней, кол-во (%)	10 (100)	10 (100)	10 (100)
> 7 дней, кол-во (%)	0	0	0
Порядковая шкала клинического улучшения ВОЗ (ВОЗ-OSCI, от 0 до 8)			
Оценка 3, кол-во (%)	4 (40)	0	0
Оценка 4, кол-во (%)	6 (60)	10 (100)	10 (100)
Насыщение кислородом, % (СО)	96,7 (1,1)	94,3 (0,7)	95,0 (0,9)
SpO <sub>2</sub> ≥ 95 %, кол-во (%)	10 (100)	6 (60)	6 (60)
SpO <sub>2</sub> < 95 %, кол-во (%)	0	4 (40)	4 (40)
Лихорадка, °С (СО)	38,3 (0,1)	38,3 (0,3)	38,5 (0,4)
< 37 °С, кол-во (%)	0	0	0
37–38 °С, кол-во (%)	0	1 (10)	1 (10)
> 38 °С, кол-во (%)	10 (100)	9 (90)	9 (90)
ЧДД, мин (СО) (норма 16–20 мин)	21,4 (1,6)	22,6 (0,7)	21,8 (1)
≤ 22 мин, кол-во (%)	8 (80)	5 (50)	7 (70)
> 22 мин, кол-во (%)	2 (20)	5 (50)	3 (30)
СРБ, мг/л (СО) (норма < 5 мг/л)	21,5 (8,2)	38,9 (8,1)	37,8 (6,7)
Д-димер, нг/мл (СО) (норма < 243 нг/мл)	525,4 (175,7)	820,1 (133,1)	855,5 (142,5)
Число нейтрофилов × 10 <sup>9</sup> клеток/л, кол-во (СО) (норма 1,8–6,5)	3,0 (0,5)	2,2 (0,4)	2,7 (1,0)
Число лейкоцитов × 10 <sup>9</sup> клеток/л, кол-во (СО) (норма 3,2–10,6)	4,4 (0,7)	3,4 (0,4)	3,9 (1,5)
МНО*, кол-во (СО) (норма 0,85–1,15)	1,0 (0,2)	1,0 (0,1)	1,1 (0,1)
Протромбин, % (СО) (экспресс-тест, норма 95–105 %)	103,3 (8,1)	78,5 (5,7)	78,2 (8,7)

Параметр	Когорта 1	Когорта 2	Когорта 3
Фибриноген, г/л (СО) (норма 2–4)	9,8 (2,6)	5,0 (1,2)	5,1 (2,2)
Поражение паренхимы легких, % (СО)	28,3 (7,6)	20,6 (6,8)	21,8 (6,1)
КТ грудной клетки 1 (патология < 25 %), кол-во (%)	4 (40)	3 (30)	6 (60)
КТ грудной клетки 2 (патология 25–50%), кол-во (%)	6 (60)	7 (70)	4 (40)

**Таблица 1. Демографические и исходные характеристики участников**

\* Международное нормализованное отношение или протромбиновое время

Данные для когорт 1–3 были получены из клинических баз данных (ClinCapture, версия 2.2.3) независимо исследователями. Данные были загружены в электронную ИРК, доступную через интернет-браузер с помощью личных учетных записей. Информацию собирали конфиденциально, и компьютеризированная документация для этого исследования велась в соответствии с локальными инструкциями, отвечающими всем нормативным требованиям согласно постановлениям РФ (Федеральный закон от 27 июля 2006 г. № 152-ФЗ, касающийся обработки данных, файлов и свобод) и Генеральному регламенту ЕС о защите персональных данных в отношении информации о пациентах и конфиденциального обращения со всеми данными. Дизайн и протокол исследования были одобрены экспертным советом организации. Все данные контролировались представителями клинической группы ООО «ИФАРМА». База данных была заморожена для статистического анализа 10 августа 2020 г.

Клинические проявления, включая стойкую лихорадку > 38 °С, частоту дыхания, сатурацию кислорода, потребность в оксигенотерапии и биологические показатели, включая уровень СРБ, D-димера, нейтрофилов, лимфоцитов и тромбоцитов, МНО, протромбина и фибриногена, регистрировались на исходном уровне и при выписке из больницы. Медиана времени до улучшения клинического состояния на 2 балла определялась в соответствии со шкалой ВОЗ-OSCI. Отсутствие необходимости в реанимации означало, что пациент не подходил для перевода в отделение интенсивной терапии. КТ грудной клетки проводили с одной фазой вдоха в положении лежа на спине. Радиологи классифицировали результаты КТ как типичные, неоднозначные или отрицательные по отношению к COVID-19 и описали основные характеристики КТ: эффект «матового стекла», симптом «бульжной мостовой» и уплотнение. Для оценки легочного поражения наблюдаемых патологий использовалась полуколичественная система оценки в зависимости от пораженной области: легкое (< 25 %), среднее (25–50 %), тяжелое (51–75 %) или диффузное (> 75%) [17].

### Статистический анализ

Размер выборки был основан на точной одноэтапной оценке в фазе II при одностороннем  $\alpha = 0,05$  и мощности 80 % [18]. Непрерывные переменные с нормальным распределением были выражены через среднее значение (СО), а с неправильным распределением — через медиану с межквартильным размахом (МКР), их сравнивали с использованием двухстороннего парного *t*-критерия для параметрических данных и критерия суммы рангов Уилкоксона для непараметрических данных. Категориальные переменные были представлены как абсолютная и относительная (в процентах) частота и сравнивались с использованием критерия хи-квадрат. Действие препарата Апротинин для пациентов с COVID-19 оценивалось посредством полного

набора анализов (включая всех пациентов, подписавших информированное согласие и получивших хотя бы одно введение исследуемого препарата). Временные точки оценки эффективности (время до выведения вируса, время до нормализации уровня СРБ ( $\leq 10$  мг/л), время до нормализации уровня D-димера ( $< 253$  нг/мл), время до нормализации температуры ( $< 37$  °С), время до улучшения клинического состояния определяли с использованием кривых Каплана — Мейера. Для сравнения групп использовали логранговый критерий (значение  $p < 0,05$  считалось значимым). Мы использовали R (версия 3.6.2) для анализа.

### **Роль источника финансирования**

Спонсор исследования не принимал участия в разработке дизайна исследования, сборе данных, анализе данных, интерпретации данных и написании отчета. Валерия Азарова, Алина Егорова, Наталья Кривонос, Ольга Росинкова и Елена Симакина имели доступ к необработанным данным.

### **Результаты**

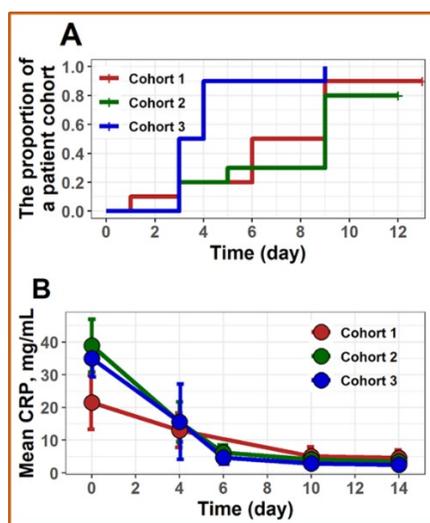
Мы определили, что комбинированная терапия препаратами Апротинин (в/в) + Авифавир в сочетании с SOC представляет пользу для пациентов с COVID-19 по первичным и вторичным точкам эффективности. В частности, медиана времени элиминации SARS-CoV-2 составила 3,5 (МКР 3–4) дня для когорты 3 и 7,5 (МКР 6–9) и 9 (МКР 5–9) дней для когорт 1 и 2 (разница является статистически значимой ( $p = 0,019$  и  $p = 0,006$ ) по сравнению с пациентами из когорты 3, таблица 2, рисунок 1А). Медиана времени до нормализации уровня СРБ ( $\leq 10$  мг/л) составила 3,5 (МКР 3–5) дня для когорты 3, 6 (МКР 6–6) дней и 4 (МКР 3–5) дня для когорт 1 и 2 соответственно. Разница между когортами 1 и 3 статистически значима ( $p < 0,001$ , таблица 2, рисунок 1В).

Эффективность комбинаций с препаратом Апротинин для нормализации маркеров тромбоза (D-димера и фибриногена) в крови пациентов представлена в таблице 2 и на рисунке 2. Первоначально повышенные уровни D-димера (525–855 нг/мл, таблица 1) быстро вернулись к норме в пределах 4,5 (МКР 3–6), 9 (МКР 5–9) и 5 (МКР 4–5) дней для пациентов из когорт 1, 2 и 3 соответственно (таблица 2, рисунок 2А). Разница между когортами 2 и 3 статистически значима ( $p < 0,002$ ). Перед началом комбинированной терапии препаратом Апротинин у пациентов в когортах 1–3 был повышен уровень фибриногена (5,0–9,8 г/л, таблица 1), который нормализовался на 4-й день, предположительно в результате терапии (рисунок 2В). Динамика изменения показателей МНО (протромбина, нейтрофилов, лейкоцитов) определялась нормальной как при поступлении, так и при выписке из больницы (рисунок 3).

Медиана времени до нормализации температуры тела ( $< 37$  °С) у пациентов в когортах 1–3 составила 3,0 (МКР 2–3), 4,5 (МКР 3–5) и 1,0 (МКР 1–3) дней (таблица 2) соответственно. Разница между когортами 2 и 3 статистически значима ( $p < 0,001$ ). Медиана времени до улучшения клинического состояния на 2 балла составила 11,0 (МКР 6–11), 6,0 (МКР 6–6) и 5,0 (МКР 5–5) дней в когортах 1–3 соответственно (таблица 2, рисунок 4). Важно отметить, что ни один из участников когорт 1–3, которому вводили комбинации с препаратом Апротинин, не был переведен в ОИТ для ИВЛ или НИВЛ. Все пациенты из когорт 1–3 были выписаны из больницы, нежелательных явлений зарегистрировано не было.

Динамика изменений МНО и протромбина использовалась для контроля антикоагулянтов, разжижающих кровь, и для проверки проблемы свертывания крови. И МНО, и экспресс-тесты протромбина определили норму при поступлении и выписке пациентов из больницы (рисунки 3А и 3В). У пациентов отмечались нормальные значения нейтрофилов и лейкоцитов при поступлении и выписке из больницы после применения комбинированной терапии препаратом Апротинин (рисунки 3С и 3Д).

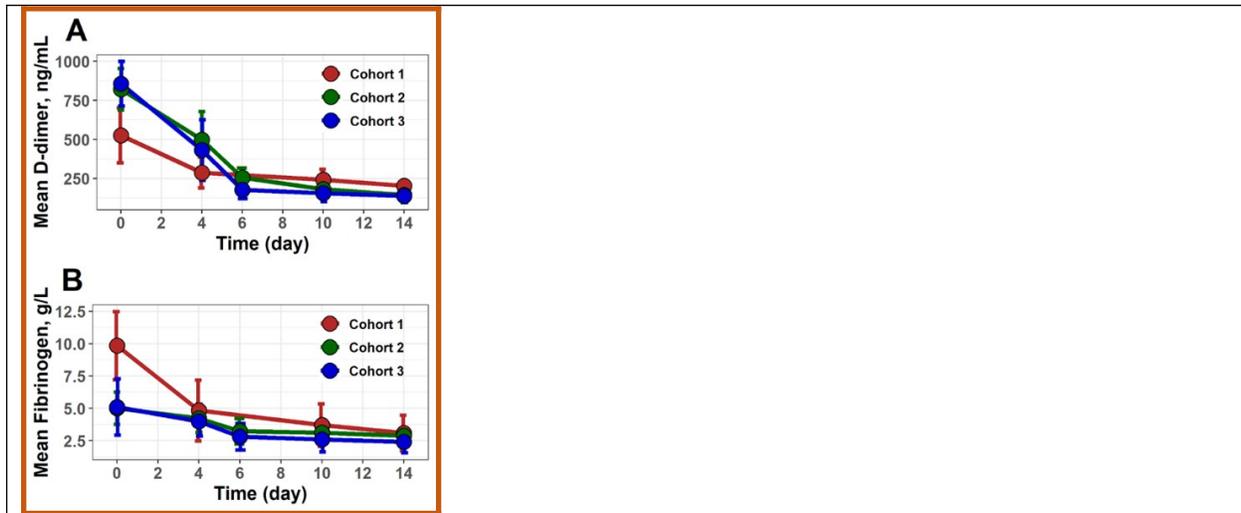
Когорта 1	Когорта 2	Когорта 3
Медиана времени до элиминации вируса SARS-CoV-2, подтвержденной методом ОТ-ПЦР, дни (МКР), $p^*$		
7,5 (6–9), $p = 0,019$	9,0 (5–9), $p = 0,006$	3,5 (3–4)
Медиана времени до нормализации концентрации СРБ ( $\leq 10$ мг/л) в крови пациента, дни (МКР)		
6,0 (6–6), $p < 0,001$	4,0 (3–5), $p = 0,821$	3,5 (3–5)
Медиана времени до нормализации концентрации D-димера ( $< 253$ нг/мл) в крови пациента, дни (МКР)		
4,5 (3–6), $p = 0,675$	9,0 (5–9), $p < 0,002$	5,0 (4–5)
Медиана времени до нормализации температуры тела ( $< 37$ °С), дни (МКР)		
3,0 (2–3), $p = 0,090$	4,5 (3–5), $p < 0,001$	1,0 (1–3)
Медиана время до улучшения клинического состояния на 2 балла по шкале ВОЗ-OSCI, дни (МКР)		
11,0 (6–11), $p = 0,004$	6,0 (6–6), $p = 0,036$	5,0 (5–5)
Динамика поражения легких по данным КТ органов грудной клетки на 14-е сутки после госпитализации		
Улучшение, кол-во (%)		
6 (60)	10 (100)	10 (100)
Без изменений, кол-во (%)		
4 (40)	0	0
* $p < 0,05$ , сравнение характеристик пациентов из когорт 1 и 2 и пациентов из когорты 3 (Апротинин (в/в) + Авифавир + SOC) с использованием логрангового критерия.		
<b>Таблица 2. Эффективность комбинированной терапии препаратами Апротинин и НСQ или Авифавир у пациентов с COVID-19</b>		



**Рисунок 1. Влияние комбинированной терапии препаратами Апротинин и НСQ или**

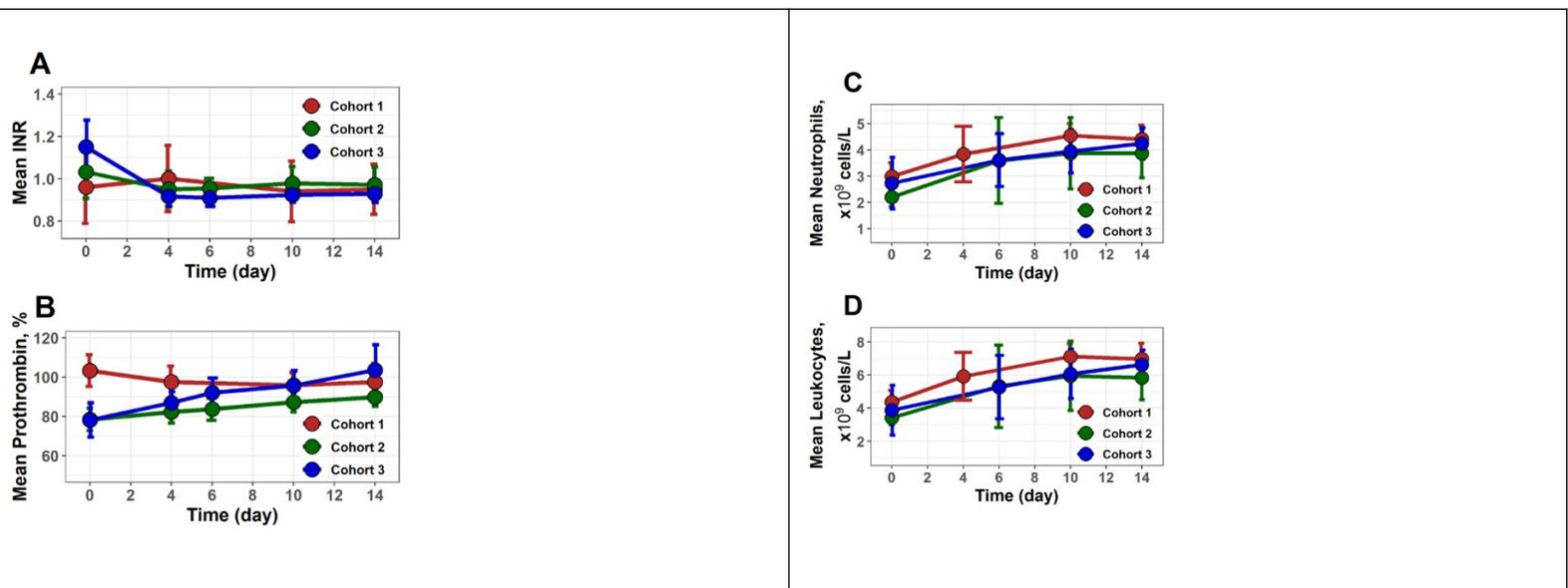
**Авифавир (когорты 1–3) на время до элиминации SARS-CoV-2 (А) и динамику нормализации уровня СРБ (В) у пациентов с COVID-19**

Нормальная концентрация СРБ составляет  $\leq 10$  мг/л. График А показывает время с момента начала лечения (дни). На графике В показано время с момента включения (дни).



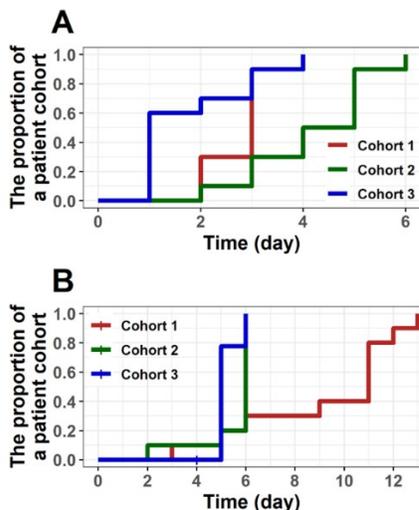
**Рисунок 2.** Влияние комбинированной терапии препаратами Апротинин и НСQ или Авифавир (когорты 1–3) на динамику нормализации концентраций D-димера (А) и фибриногена (В) у пациентов с COVID-19

Нормальная концентрация СРБ составляет  $\leq 253$  мг/л. Нормальный уровень фибриногена составляет 2–4 г/л. На графике показано время с момента включения (дни).



**Рисунок 3.** Влияние комбинированной терапии препаратами Апротинин и НСQ или Авифавир (когорты 1–3) на

**динамику МНО (А), концентрации протромбина (В), нейтрофилов (С) и лейкоцитов (D) у пациентов с COVID-19**  
 МНО — это отношение протромбинового времени пациента (ПВ) к контрольному ПВ, стандартизованное по активности реагента тромбопластина, разработанного Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), по следующей формуле:  $\text{МНО} = \text{ПВ пациента} \div \text{Контрольное ПВ}$ . Нормальный диапазон МНО составляет 0,85–1,15. Анализ на определение уровня протромбина по Квику (РС) используется для расшифровки коагулограммы и сравнения коагулограммы пациента с эталонным значением для нормальной плазмы крови. Нормальный уровень протромбина при определении по анализу на протромбин по Квику составляет 75–140 %. Нормальный уровень нейтрофилов составляет  $1,8\text{--}6,5 \times 10^9$  клеток/л. Нормальный уровень лейкоцитов составляет  $3,2\text{--}10,6 \times 10^9$  клеток/л. На графике показано время с момента включения (дни).



**Рисунок 4. Влияние комбинированной терапии препаратами Апротинин и HCQ или Авифавир (когорты 1–3) на медиану времени до достижения нормальной температуры тела (< 37 °C) (А) и среднее время до улучшения клинического состояния на 2 балла (В) у пациентов с COVID-19**

Клиническое состояние оценивали по шкале ВОЗ-OSCI. График показывает время с момента начала лечения (дни).

### Обсуждение

В настоящее время не существует специфической противовирусной терапии для пациентов, госпитализированных из-за пневмонии, связанной с COVID-19, и которым требуется кислородная терапия, для сокращения случаев перевода в ОИТ для ИВЛ или НИВЛ. Несколько исследований были сосредоточены на репозиционировании существующих противовирусных препаратов; это также относится к противовирусным препаратам Веклури (ремдесивир) и Авифавир (фавипиравир), которые оказались первыми известными лекарственными препаратами, перепрофилированными для лечения COVID-19 и зарегистрированными Управлением США по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) [19] и Минздравом России [20] соответственно.

Компания «Глеад Сайенсис Инк.» (Gilead Sciences Inc.) инициировала несколько клинических исследований для оценки эффективности ремдесивира в качестве препарата для лечения COVID-19. Однако не существует достаточных опубликованных данных, свидетельствующих об

эффективности ремдесивира против COVID-19. Первое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование ремдесивира у пациентов с COVID-19 было проведено в Китае; применение ремдесивира не было связано со статистически значимой клинической пользой, вероятно, из-за неполного набора участников. Еще одно рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование 237 госпитализированных пациентов с COVID-19 в тяжелой форме также не выявило связи ремдесивира с клиническим улучшением по сравнению с плацебо [21]. Предварительные результаты рандомизированных клинических исследований ремдесивира показали, что из 1059 взрослых, госпитализированных с признаками инфекции нижних дыхательных путей, у 538 пациентов, получавших ремдесивир, медиана времени выздоровления составляла 11 дней по сравнению с 15 днями в группе плацебо ( $n = 521$ ) [22]. Рандомизированное открытое исследование 397 госпитализированных пациентов с подтвержденной инфекцией SARS-CoV-2 и пневмонией не выявило значимой разницы между 5-дневным курсом (200 пациентов) и 10-дневным курсом (197 пациентов) приема ремдесивира. Значимым ограничением этих клинических исследований является отсутствие плацебо-контролируемых групп, поэтому эффективность ремдесивира нельзя было оценить должным образом [23]. Параллельно с этими исследованиями было проведено рандомизированное открытое многоцентровое исследование для оценки эффективности и побочных эффектов ремдесивира, назначенного 596 госпитализированным пациентам с COVID-19 средней степени тяжести в течение 5 или 10 дней, по сравнению со стандартным лечением [24]. У пациентов с COVID-19 средней степени тяжести, получавших ремдесивир в течение 10 дней, не наблюдалось статистически значимой разницы по клиническому состоянию по сравнению со стандартным лечением через 11 дней после начала терапии [24]. Пациенты, получавшие ремдесивир в течение 5 дней, демонстрировали статистически значимую разницу по клиническому состоянию по сравнению со стандартным протоколом, но различие имело неопределенное клиническое значение [24]. Вышеупомянутые клинические исследования ремдесивира не доказали его эффективность в лечении пациентов с COVID-19, и вероятнее всего, ремдесивир не станет основным противовирусным препаратом для победы над этой инфекцией.

Противовирусные препараты на основе фавипиравира показали многообещающие результаты в нескольких клинических исследованиях. В частности, в пилотном клиническом исследовании II/III фазы среди госпитализированных пациентов с пневмонией средней степени тяжести, связанной с COVID-19, на ранней стадии инфицирования ( $< 7$  дней) применение Авифавира приводило к элиминации вируса SARS-CoV-2 у 62,5 % пациентов в течение 4 дней терапии, и являлось безопасным и хорошо переносимым [5].

Мы не нашли убедительных клинических доказательств влияния препаратов Веклери и Авифавир на концентрацию СРБ и D-димера в крови пациентов (маркеры тяжести течения COVID-19).

СРБ является значимым маркером для прогнозирования возможности обострения у взрослых пациентов с легким течением COVID-19 с оптимальным пороговым значением 26,9 мг/л. Пациенты с обострением имеют гораздо более высокие уровни СРБ (медиана 43,8 мг/л, МРК 12,3–101,9) по сравнению с пациентами с легким течением COVID-19 (медиана 12,1 мг/л, МРК 0,1–91,4) [5]. Более высокий уровень СРБ в плазме крови указывает на пневмонию, связанную с COVID-19, в тяжелой форме и более длительную госпитализацию [25].

Прогноз COVID-19 в значительной степени зависит от поражения нескольких органов, в основном из-за повышенной концентрации фибриногена и D-димера в крови пациентов, что активирует гиперкоагуляцию. Фибриноген расщепляется тромбином с образованием растворимого

фибринового мономера, который нековалентно накапливается с образованием полимера. Последний ковалентно сшивается фактором XIIIa с образованием нерастворимого сгустка, который далее расщепляется плазмином с образованием продуктов распада фибрина (ПРФ) или D-димера. D-димер обычно не присутствует в плазме крови человека, его уровень повышается из-за образования и разрушения фибринового сгустка *in vivo*, когда система свертывания крови активирована, например, из-за наличия тромбоза или диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС), тромбоза глубоких вен (ТГВ), тромбоэмболии легочной артерии, хирургического вмешательства, злокачественных новообразований и цирроза печени. Таким образом, фибриноген и особенно D-димер являются полезными показателями при оценке пациента с подозрением на ДВС-синдром. Кроме того, D-димер обычно используется для диагностики или исключения тромботических процессов, таких как ТГВ или тромбоэмболия легочной артерии [26]. Повышенный уровень D-димера вместе с СРБ имеют высокую прогностическую ценность для ВТЭ у тяжелобольных пациентов с COVID-19. Пациенты, инфицированные SARS-CoV-2, с более высоким уровнем D-димера, которым требуется оротрахеальная интубация (ОТИ), имеют повышенный риск развития тромбоэмболии легочной артерии (ТЭЛА) [27]. В ряде исследований авторы контролировали связь между пневмонией при COVID-19 и венозным тромбоэмболизмом (ВТЭ) [28]. Было высказано предположение, что распространенность ВТЭ составляет 25 %, при этом чувствительность, специфичность и отрицательная прогностическая ценность порогового значения D-димера составляют 1,5 мкг/мл [29].

Комбинированная терапия препаратом Апротинин была достоверно связана с нормализацией уровня СРБ у пациентов с COVID-19 средней степени тяжести (медиана 3,5–6 дней, МКР 3,5–6) (таблица 2, рисунок 1В). Первоначально у всех пациентов был повышенный уровень СРБ в день 0 (таблица 1). Комбинация препаратов Апротинин (в/в) и Авифавир у пациентов когорты 3 оказалась наиболее эффективной. Медиана времени до нормализации уровня СРБ составила 3,5 дня (МКР 3–5).

У пациентов в этом клиническом исследовании были повышенные, но не критические уровни D-димера (525–855 нг/мл, таблица 1), которые быстро вернулись к нормальным значениям (медиана 4,5 дня, МКР 3–6), (9 дней, МКР 5–9) и (5 дней, МКР 4–5) в когортах 1, 2 и 3 соответственно (таблица 2, рисунок 2А). Аналогичная динамика наблюдалась в случае с фибриногеном (рис. 2В).

Это клиническое исследование впервые показало высокую активность и эффективность комбинированной терапии препаратом Апротинин у пациентов, госпитализированных с пневмонией, связанной с COVID-19, средней степени тяжести. Комбинация препаратов Апротинин и Авифавир значительно сократила время до нормализации концентраций СРБ и D-димера в крови пациентов и в целом улучшила клинический исход, а именно:

медиана времени до элиминации SARS-CoV-2 составляла 7,5 (МКР 6–9), 9,0 (МКР 5–9) и 3,5 (МКР 3–4) дня в когорте 1, 2 и 3 соответственно (таблица 2, рисунок 1); повышенные уровни фибриногена вернулись к нормальным значениям (< 5,0 г/л) на 4-й день (рисунок 2В); динамика изменения показателей МНО (протромбина, нейтрофилов, лейкоцитов) была нормальной как при поступлении, так и при выписке пациентов из больницы (рисунок 3); медиана времени до нормализации температуры тела составила 3,0 (МКР 2–3), 4,5 (МКР 3–5) и 1,0 (МКР 1–3) дня (таблица 2) в когорте 1, 2 и 3 соответственно; медиана времени до улучшения клинического состояния на 2 балла составила 11,0 (МКР 6–11), 6,0 (МКР 6–6) и 5,0 (МКР 5–5) дня в когортах 1–3 соответственно (таблица 2, рисунок 4). Важно отметить, что ни один из участников когорт 1–3, которому вводили комбинации с препаратом Апротинин, не был переведен в ОИТ для ИВЛ или

НИВЛ. Все пациенты из когорт 1–3 были выписаны из больницы, нежелательных явлений зарегистрировано не было.

Результаты, полученные в этом пилотном клиническом исследовании, являются многообещающими и открывают возможность для начала многоцентрового плацебо-контролируемого рандомизированного исследования комбинированной терапии препаратом Апротинин у пациентов со средним и тяжелым течением COVID-19, которое мы планируем начать в декабре 2020 г. — январе 2021 г.

### **Вклад авторов**

Ольга С. Росинкова и Елена Н. Симакина были основными исследователями, ответственными за набор пациентов, исследуемое лечение и сбор данных в соответствии с протоколом. Андрей А. Иващенко, Владимир Г. Логинов, Елена В. Якубова и Александр В. Иващенко предложили идею данного проекта, варианты его организации и контролировали реализацию. Валерия Н. Азарова, Николай П. Савчук, Станислав В. Поярков и Алина Н. Егорова разработали протокол клинического исследования, проработали статистические аспекты исследования и анализ результатов. Елена А. Меркулова и Наталья В. Кривонос организовали клинические исследования и сбор данных. Рубен Н. Карапетян разработал дизайн доклинического исследования, организовал его выполнение, провел поиск литературы и отредактировал рукопись. Дмитрий В. Кравченко разработал технологию и скоординировал производство субстанции. Александр В. Иващенко осуществлял научное руководство проектом, составил и отредактировал рукопись. Все авторы прочли и одобрили окончательную рукопись.

### **Конфликт интересов**

Спонсор исследования: ООО «Авирон», Инновационный центр «Сколково», Москва, Российская Федерация. Андрей А. Иващенко, Александр В. Иващенко, Николай П. Савчук и Дмитрий В. Кравченко сообщают о патенте RU 2731932 (09.09.2020). Другие авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Приложение.**

Критерии исключения: отказ пациента от участия, пациенты с ЧДД > 35 уд/мин, которая не снижается после снижения температуры тела до нормальных или субфебрильных значений; насыщение крови кислородом  $\leq 93\%$  в состоянии покоя; парциальное давление кислорода в артериальной крови ( $SpO_2$ ) < 60 мм рт. ст.; индекс оксигенации,  $SpO_2$  на фракцию вдыхаемого кислорода ( $SpO_2/FiO_2$ )  $\leq 200$  мм рт. ст.; септический шок; хронические заболевания печени и почек в терминальной стадии; отказ других органов, требующий контроля и лечения в отделении интенсивной терапии; пациенты с ВИЧ; использование препарата Апротинин в течение 6 месяцев до скрининга; повышенная чувствительность к любому из компонентов исследуемой терапии; пациенты, участвующие в других клинических исследованиях или принимающие другие исследуемые препараты в течение 28 дней до скрининга; беременные или кормящие женщины или женщины, планирующие беременность во время клинического исследования; женщины, способные к деторождению, не использующие соответствующие методы контрацепции; пациенты, не умеющие читать или писать; нежелание понимать и соблюдать процедуры протокола исследования; несоблюдение схемы приема лекарственных препаратов или выполнения процедур, которые, по мнению исследователя, могут повлиять на результаты исследования или безопасность пациента и помешать дальнейшему участию пациента в исследовании; пациенты с любыми другими сопутствующими заболеваниями или серьезными психическими заболеваниями, которые лишают их права на участие в клинических исследованиях, ограничивают их возможность получить информированное согласие или могут повлиять на их способность участвовать в исследовании.

## Список литературы

- 1 COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University. November 1, 2020. <https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6/>.
- 2 Zheng KI, Feng G, Liu W-Y, et al. Extrapulmonary complications of COVID-19: A multisystem disease? *J Med Virol* 2020 Jul 22; 10.1002/jmv.26294, doi: 10.1002/jmv.26294.
- 3 Tu Y-F, Chien C-H, Yarmishun AA, et al. A Review of SARS-CoV-2 and the Ongoing Clinical Trials. *Int J Mol Sci* 2020, 21(7), 2657. <https://doi.org/10.3390/ijms21072657>.
- 4 Scavone C, Brusco S, Bertini M, et al. Current pharmacological treatments for COVID-19: What's next? *Br J Pharmacol* 2020 Apr 24; 10.1111/bph.15072. doi: 10.1111/bph.15072.
- 5 Ivashchenko AA, Dmitriev KA, Vostokova NV et al. AVIFAVIR for Treatment of Patients with Moderate COVID-19: Interim Results of a Phase II/III Multicenter Randomized Clinical Trial. *Clin Infect Dis* 2020 Aug 9; ciaa1176, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1176>.
- 6 Scheule AM, Beierlein W, Wendel HP, et al. Aprotinin in fibrin tissue adhesives induces specific antibody response and increases antibody response of high-dose intravenous application. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999, 118(2), 348-353.
- 7 Ascenzi P, Bocedi A, Bolognesi M. The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein. *Curr Protein Pept Sci* 2003 Jun; 4(3), 231–251.
- 8 Engles L. Review and application of serine protease inhibition in coronary artery bypass graft surgery *Am J Health Syst Pharm* 2005 Sep 15; 62(18 Suppl 4), S9–14.
- 9 Solun B, Shoefeld Y. Inhibition of metalloproteinases in therapy for severe lung injury due to COVID-19. *Med Drug Discov* 2020 Sep; 7, 100052.
- 10 Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 2020, 181(2), 271-280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
- 11 Bojkova D, Bechtel M, McLaughlin K-M, et al. Aprotinin Inhibitors SARS-CoV-2 Replication. *Cells* 2020, 9(11), 2377; <https://doi.org/10.3390/cells9112377>.
- 12 Science News. Cancer's next magic bullet may be magic shotgun. University of California - San Francisco, June 15, 2012. <https://www.sciencedaily.com/releases/2012/06/120615141716.htm>.
- 13 Ivashchenko AA, Svistunov AA, Khorobryh TV, et al. Aprotinin - a New Drug Candidate for The Prevention of SARS-CoV-2 (COVID-19). *COVID19-PREPRINTS* 2020-09-13. <https://covid19-preprints.microbe.ru/files/140>.
- 14 Ivashchenko AA, Svistunov AA, Khorobryh TV, et al. Aprotinin - a new multi-target drug candidate or "magic shotgun" for the therapy of COVID-19. *COVID19-PREPRINTS* 2020-10-03. <https://covid19-preprints.microbe.ru/files/148>.
- 15 WHO R&D Blueprint novel Coronavirus COVID-19 Therapeutic Trial Synopsis. February 18, 2020, Geneva, Switzerland.
- 16 Minister of Health of the Russian Federation. Interim guidelines prevention, diagnostics and treatment of new coronavirus infection (2019-nCoV) Version 7 (2020.06.03) (*Russian language*). [https://static-0.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/050/584/original/03062020\\_%D0%9CR\\_COVID-19\\_v7.pdf](https://static-0.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/050/584/original/03062020_%D0%9CR_COVID-19_v7.pdf).
- 17 Huet T, Beaussier H, Voisin O, et al. Anakinra for severe forms of COVID-19: a cohort study. *Lancet Rheumatology* 2020, 2(7), e393-e400. [www.thelancet.com/rheumatology](http://www.thelancet.com/rheumatology).
- 18 Thorlund K, Dron L, Park J, et al. A real-time dashboard of clinical trials for COVID-19. *Lancet Digital Health* 2020, 2(6), e286-e287. [https://doi.org/10.1016/S2589-7500\(20\)30086-8](https://doi.org/10.1016/S2589-7500(20)30086-8).
- 19 FDA approves first treatment for COVID-19. *FDA news release* October 22, 2020. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-treatment-covid-19>.

- 20 Khrennikov I. Russian Health Ministry Approves Anti-Coronavirus Drug Avifavir. *Bloomberg.com* 2020. <https://www.bloomberg.com/news/articles/2020-05-31/russian-health-ministry-approves-anti-coronavirus-drug-avifavir>.
- 21 Wang Y, Zhang D, Du G, et al. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet* 2020, 395(10236), 1569-1578. doi:10.1016/S0140-6736(20)31022-9.
- 22 Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, et al; ACTT-1 Study Group Members. Remdesivir for the treatment of Covid-19—preliminary report. *N Engl J Med* 2020, Published online May 22. doi: 10.1056/NEJMoa2007764.
- 23 Goldman JD, Lye DCB, Hui DS, et al; GS-US-540-5773 Investigators. Remdesivir for 5 or 10 days in patients with severe Covid-19. *N Engl J Med* 2020, Published online May 27. doi:10.1056/NEJMoa2015301.
- 24 Spinner CD, Gottlieb RL, Criner GF, et al. Effect of Remdesivir vs Standard Care on Clinical Status at 11 Days in Patients With Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2020, e2016349. doi: 10.1001/jama.2020.16349. <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2769871>.
- 25 Wang G, Wu C, Zhang O, et al. C-Reactive Protein Level May Predict the Risk of COVID19 Aggravation. *OFID* 2020, 7(5), ofaa153, <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa153>.
- 26 Hayıroğlu MI, Çınar T, Tekkeşin AI. Fibrinogen and D-dimer variances and anticoagulation recommendations in Covid-19: current literature review. *Rev Assoc Med Bras* 2020, 66(6). <https://doi.org/10.1590/1806-9282.66.6.842>.
- 27 Garcia-Olivé I, Sintes H, RaduaJ, et al. D-dimer in patients infected with COVID-19 and suspected pulmonary embolism. *Respir Med* 2020, 169, 106023. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0954611120301633>.
- 28 Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res* 2020, 191, 145-147. doi: 0.1016/j.thromres.2020.04.13
- 29 Cui S, Chen S, Li X, et al. Wang. Prevalence of venous thromboembolism in patients with severe novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost* 2020, 18(6), 1421-1424. doi: 10.1111/jth.14830..