

Перспективы клинического применения препарата Камелин® для лечения и профилактики вирусных инфекций

А.Тацкий¹, А.Печенка², М.Пруидзе³

1–Международный институт Биотерапии, Киев, Украина

2–Кафедра инфекционных болезней НМАПО имени П.Л.Шупика, Киев, Украина

3– ООО “Камелин”, Тбилиси, Грузия

РЕЗЮМЕ

Исследователи Международного института Биотерапии (г.Киев, Украина) провели плацебо-контролируемое исследование противовирусной эффективности субстанции препарата Камелин® на модели L929 с использованием вируса везикулярного стоматита (РНК-вирус). Полученные данные свидетельствуют о значительной противовирусной активности препарата Камелин в условиях его применения против РНК-содержащих вирусов, в том числе семейства Rhabdoviridae. Доказанная противовирусная эффективность Камелина именно в отношении РНК-геномных вирусов важна для перспектив применения препарата при актуальных заболеваниях, таких как гепатит С, болезнь Лайма, Коксаки, геморрагическая лихорадка, коронавирусная инфекция, сезонные риновирусные инфекции. Противовирусное действие препарата Камелин обусловлено преимущественно активностью натуральных антиинфекционных пептидов, противовирусные свойства которых естественным образом сформировались в ходе эволюции по отношению к более эволюционно древним РНК-вирусам.

Prospects for the clinical use of Camelyn® for the treatment and prevention of viral infections

A.Tatskyy¹, A.Pechenka², M.Pruidze³

1 – International Institute of Biotherapy, Kiev, Ukraine

2 – Department of Infectious Diseases P.L. Shupik, Kiev, Ukraine

3– “Camelyn” LLC, Tbilisi, Georgia

SUMMARY

Researchers at the International Institute of Biotherapy (Kiev, Ukraine) conducted a placebo-controlled study of the antiviral efficacy of the substance of the drug Camelyn® on the L929 model using the vesicular stomatitis virus (RNA virus). The data obtained indicate a significant antiviral activity of the drug Camelyn in the conditions of its use against RNA-containing viruses, including the family Rhabdoviridae. Camelyn's proven antiviral efficacy against RNA-genomic viruses is important for the prospects of using the drug for actual diseases such as hepatitis C, Lyme disease, Coxsackie, hemorrhagic fever, coronavirus infection, seasonal rhinovirus infections. The antiviral effect of the drug Camelyn is mainly due to the activity of natural anti-infectious peptides, the antiviral properties of which were naturally formed during evolution in relation to more evolutionarily ancient RNA viruses.

В ходе исследований в лабораториях разных стран, в том числе в Японии, Южной Корее, Великобритании и США, было установлено, что пептиды натурального происхождения, в частности - RJP-1, apidaecin, defensin – имеют давние, сложившиеся в ходе эволюции свойства: активировать иммунитет и уничтожать вирусы. Понимание этих механизмов обоснованно привело к внедрению в медицинскую практику препаратов на основе натуральных пептидов.

В последние годы для лечения и профилактики сезонных вирусных инфекций (ОРВИ) с успехом применяется Камелин® – иммуотропный препарат, содержащий антиинфекционные пептиды природного происхождения. [1-4]

Дизайн плацебо-контролируемого исследования противовирусной эффективности Камелина® был разработан группой инфекционистов в рамках противовирусной программы Международного института Биотерапии (г.Киев, Украина). В работе использовались клетки линии L929 (фибробласты мышей) и РНК-содержащий вирус везикулярного стоматита (ВВС, ATCC №VR-158) с инфекционным титром не менее 10^5 ТЦД₅₀/0,1 мл. Приведенные тест-системы соответствуют требованиям USP «Draft Guidance for Industry on Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics; Availability, 2014». Оценка антивирусного действия различных концентраций препарата Камелин, приготовленных *ex tempore* на физиологическом растворе проведена путем определения количества живых клеток в лунке, после их окрашивания кристаллическим фиолетовым [Saotome K, Morita H, Umeda M. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its

application to injection drugs // Toxicol In Vitro. – 1989. – Vol.3, № 4. – P. 317–321. PMID: 20702298].

Через 24 ч после инфицирования проводили учет цитопатического действия вируса: после удаления из лунок надосадочной жидкости в дезраствор и к клеткам вносили 0,2% раствор красителя Crystal Violet («Sigma», США) в 2 % этаноле. Через 15 мин краситель удаляли, а окрашенный монослой клеток промывали под проточной водой. Оптическую плотность окрашенных клеток измеряли при длине волны 540 нм. Полученные результаты принимали во внимание только в том случае, когда в контрольных культурах, не содержащих вируса (плацебо – изотонический 0,9% раствор натрия хлорида), цитодеструктивные изменения отсутствовали, а в контроле вируса наблюдали полную деструкцию клеток. Изучение антивирусного действия проводили при 24-часовом контакте клеток с препаратом, который вносили через 40 мин после инфицирования тест-вирусом. (Таблица 1)

З	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	КВ	Вирус + Плацебо	Вирус + А 1230	Вирус + А 1230	Вирус + А 1230	Вирус + А 1230	Плацебо	А 1230	А 1230	А 1230	А 1230	КК
В	КВ	Вирус + Плацебо	Вирус + А 123	Вирус + А 123	Вирус + А 123	Вирус + А 123	Плацебо	А 123	А 123	А 123	А 123	КК
С	КВ	Вирус + Плацебо	Вирус + А 12,3	Вирус + А 12,3	Вирус + А 12,3	Вирус + А 12,3	Плацебо	А 12,3	А 12,3	А 12,3	А 12,3	КК
Д	КВ	Вирус + Плацебо	Вирус + А 1,23	Вирус + А 1,23	Вирус + А 1,23	Вирус + А 1,23	Плацебо	А 1,23	А 1,23	А 1,23	А 1,23	КК
Е	КВ	Вирус + Плацебо	Вирус + А 0,123	Вирус + А 0,123	Вирус + А 0,123	Вирус + А 0,123	Плацебо	А 0,123	А 0,123	А 0,123	А 0,123	КК
Ф	КВ	Вирус + Плацебо	Вирус + А 0,012	Вирус + А 0,012	Вирус + А 0,012	Вирус + А 0,012	Плацебо	А 0,012	А 0,012	А 0,012	А 0,012	КК
Г	КВ	Вирус + Плацебо	Вирус + А 0,001	Вирус + А 0,001	Вирус + А 0,001	Вирус + А 0,001	Плацебо	А 0,001	А 0,001	А 0,001	А 0,001	КК
Н	КВ	Вирус + Плацебо	Вирус + А 0,0001	Вирус + А 0,0001	Вирус + А 0,0001	Вирус + А 0,0001	Плацебо	А 0,0001	А 0,0001	А 0,0001	А 0,0001	КК

* Условные обозначения: КВ - контроль вируса; КК - контроль клеток; Плацебо - растворитель (0,9% раствор натрия хлорида, изотоничен) А 1230 – субстанция препарата Камелин в концентрации 1230 мкг/мл культуральной среды.

В исследовании определено антивирусное действие препарата Камелин против РНК-содержащего вируса везикулярного стоматита (ВВС) и установлена ЕС50 – эффективная концентрация препарата (мкг/мл), необходимая для подавления цитопатического эффекта вируса на 50%, которая составила 10 мкг/мл. В концентрации 16 мкг/мл Камелин способствует выживаемости 96% клеток, а в концентрации 500 мкг/мл 100% клеток культуры L929 (рис. 1-2).

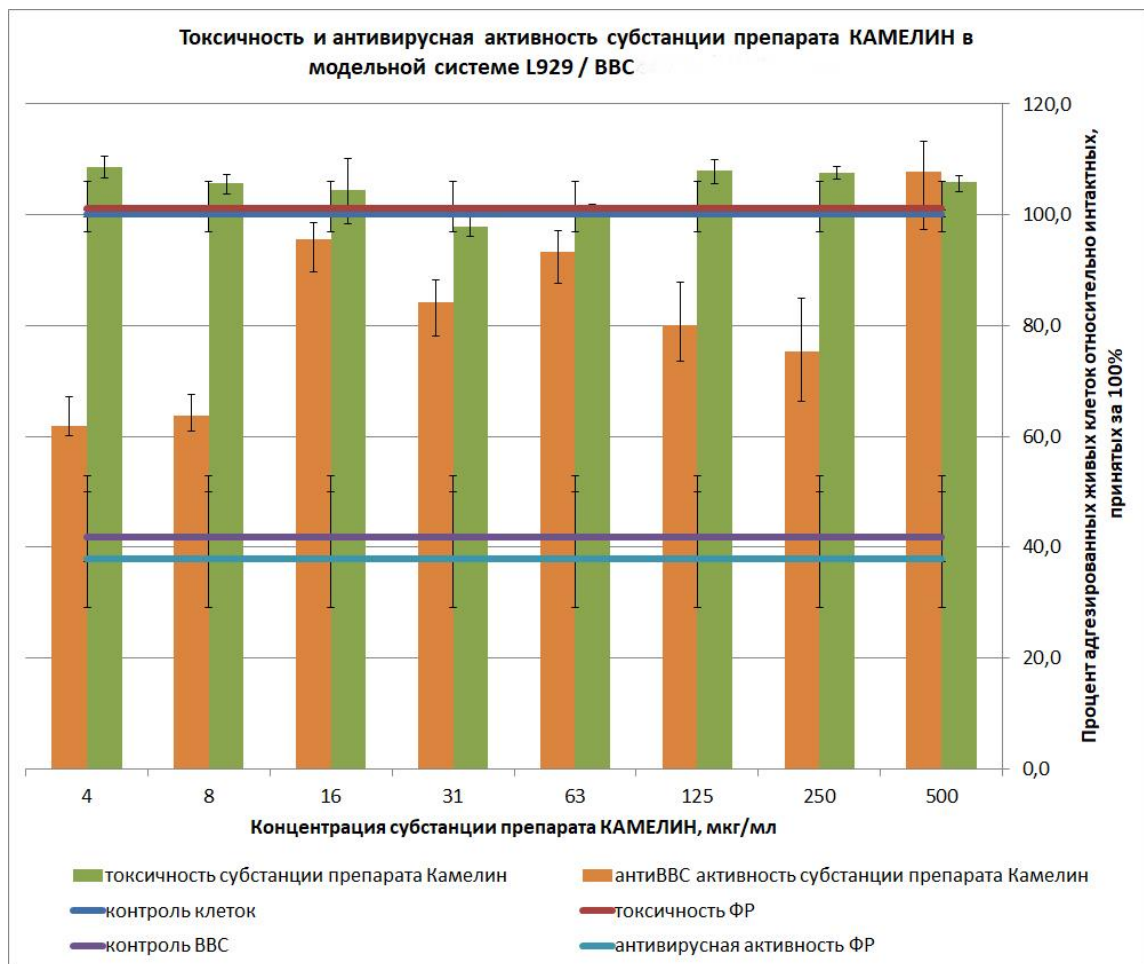


Рисунок 1. Применение субстанции препарата Камелин в модельной системе L929/ВВС. Условные обозначения: контроль клеток – количество интактных клеток линии L929; токсичность ФР – количество клеток линии L929 после контакта с ФР на протяжении 24 ч; токсичность субстанции препарата Камелин - количество клеток линии L929 после контакта с субстанцией препарата Камелин на протяжении 24 ч; контроль ВВС - количество клеток линии L929 через 24 ч после инфицирования вирусом ВВС; антивирусная активность ФР – количество клеток линии L929 после инфицирования вирусом ВВС и обработки клеток ФР на протяжении 24 ч; антиВВС активность субстанции препарата Камелин – количество клеток линии L929 после инфицирования вирусом ВВС и обработки клеток субстанцией препарата Камелин на протяжении 24 ч; % живых клеток – количество адгезированных живых клеток линии L929 относительно интактных, принятых за 100%.

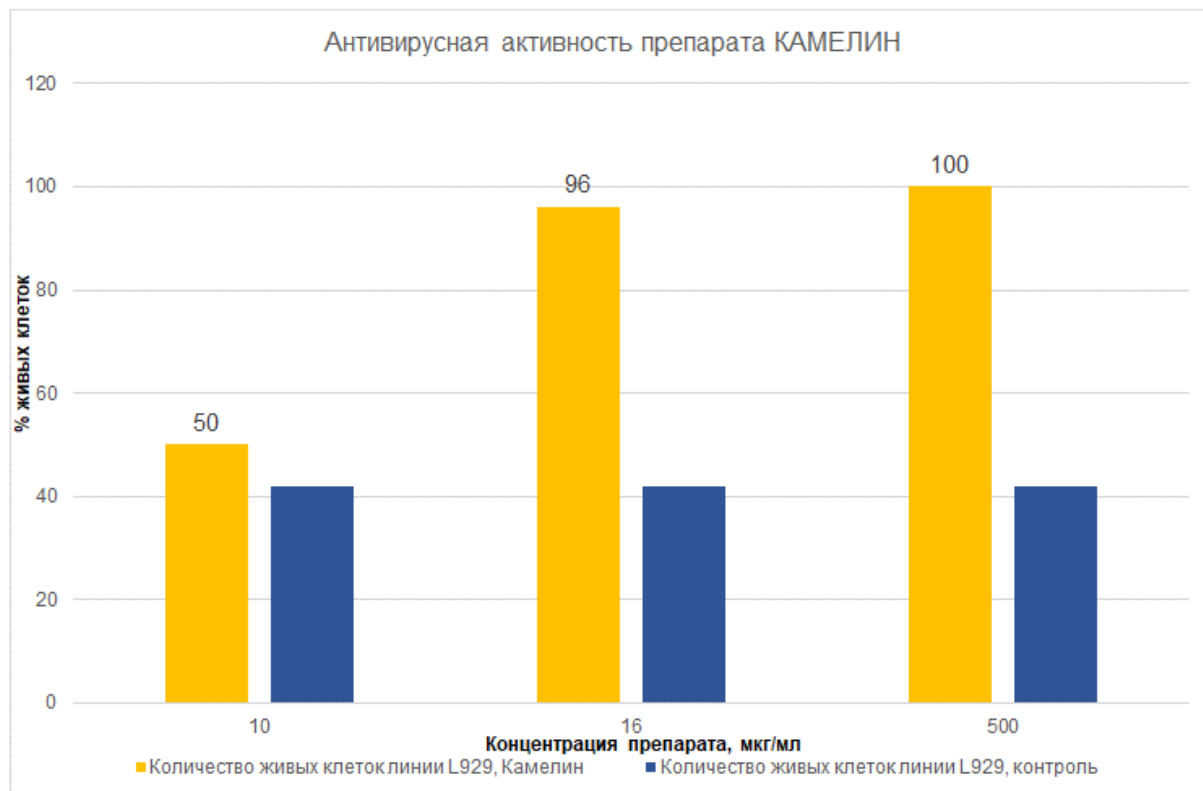


Рисунок 2. Противовирусная активность препарата Камелин в модельной системе L929 / ВВС.

Полученные данные свидетельствуют о значительной антивирусной активности препарата Камелин в условиях его применения против РНК-содержащих вирусов, в том числе семейства *Rhabdoviridae*. Доказанная противовирусная эффективность Камелина именно в отношении РНК-геномных вирусов важна для перспектив применения препарата при актуальных заболеваниях, таких как гепатит С, болезнь Лайма, Коксаки, геморрагическая лихорадка, коронавирусная инфекция, сезонные риновирусные инфекции и др.

Также необходимо отметить, что при планировании профилактики и лечения острых респираторных вирусных инфекций, в том числе Covid-19, следует учитывать и новые данные материалов научных статей 2020 года, полученные специалистами в ходе лечения этого заболевания. В публикации, вышедшей в апреле в научном журнале “Ланцет” (The Lancet), доктор Varga (Цюрих, Швейцария) с группой учёных

обнаружили, что вирус SARS-CoV-2 может инфицировать эндотелиальные клетки, которые покрывают внутренние стенки кровеносных сосудов. Эндотелиальные клетки защищают сердечно-сосудистую систему и выделяют протеины, оказывающие влияние на ее структурные и функциональные показатели: от образования тромбов до иммунного ответа. “Концепция, которую нам удалось отследить, состоит в том, что коронавирусная инфекция это не только лишь респираторное заболевание; оно признано респираторным из-за начальных симптомов, а вообще это сосудистое заболевание, угрожающее пациентам летальными последствиями из-за своего вмешательства в кровеносную систему” – сообщают исследователи. В своей публикации учёные демонстрируют поражение эндотелиальных клеток сосудов в лёгких, сердце, почках, печени и других внутренних органов у пациентов с инфекцией Covid-19. [9]

В этой связи необходимо обозначить выраженные ангиопротекторные свойства пептида RJP-1, который входит в состав препарата Камелин. Пациентам с сосудистой патологией, которые для восстановления иммунного гомеостаза принимали препарат Камелин, для изучения ангиопротекторного потенциала препарата был назначен тест на уровень экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста — VEGF-A. Определение VEGF-A в сыворотке крови проводилось методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы Bender MedSystems GmbH (Австрия). Субстанция препарата Камелин, благодаря эволюционно обусловленным свойствам экзогенных пептидов реагировать с регулируемыми белками клеточных мембран, стимулирует экспрессию сосудистого эндотелиального фактора роста. Повышение активности VEGF-A способствует неоваскуляризации, уменьшает гипоксию и улучшает трофику ишемизированных тканей на микроуровне, обеспечивает восстановление поврежденного эндотелия сосудов, что приводит к лучшим результатам лечения пациентов с васкулярной патологией. [10]

В контексте вышеизложенного, полученные данные позволяют рекомендовать Камелин® как перспективный препарат для улучшения прогноза у пациентов с вирусными инфекциями, которые сопровождаются поражением сосудов, в частности варианта вируса Covid-19.

Выводы.

1. Проведенное плацебо-контролируемое исследование подтверждает, что препарат Камелин проявляет выраженное противовирусное действие в модели L929/BBC (РНК-вирус).

2. Противовирусное действие препарата Камелин обусловлено преимущественно активностью натуральных антиинфекционных пептидов классов RJP-1, defensin, apidaecin, противовирусные свойства которых естественным образом сформировались в ходе эволюции по отношению к более эволюционно древним РНК-вирусам.

3. Доказанная противовирусная эффективность важна для клинической перспективы интеграции препарата Камелин в схемы лечения и профилактики социально значимых заболеваний: сезонных риновирусных инфекций (ОРВИ), клещевого энцефалита, болезни Коксаки, лихорадки Эбола, коронавирусной инфекции, гепатита С и др.

Литература.

1. Park MS, Kim JI, Lee I, Park S, Bae JY, Park MS. Towards the Application of Human Defensins as Antivirals. *Biomol Ther (Seoul)*. 2018;26(3):242–254.
2. Sankaran-Walters Sumathi, Hart Ronald, Dills Chantelle. Guardians of the Gut: Enteric Defensins. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 8, 2017: 647.
3. Ahmed A. Siman-Tov G., Hall G., Bhalla N., Narayanan A. Human Antimicrobial Peptides as Therapeutics for Viral Infections. *Viruses* 2019, 11, 704.
4. Li W., Ma, G-X, Zhou, X-Xi. Apidaecin-type peptides: Biodiversity, structure-function relationships and mode of action. *Peptides*. 2006, 27(9):2350-9.
5. Hara S, Sasaki T, Satoh-Takayama N, et al. Dietary Antigens Induce Germinal Center Responses in Peyer's Patches and Antigen-Specific IgA Production. *Front Immunol*. 2019;10:2432.
6. Dillon A, Lo DD. M Cells: Intelligent Engineering of Mucosal Immune Surveillance. *Front Immunol*. 2019;10:1499.
7. Komban RJ, Strömberg A, Biram A, et al. Activated Peyer's patch B cells sample antigen directly from M cells in the subepithelial dome. *Nat Commun*. 2019;10(1):2423.
8. Chang JE, Buechler MB, Gressier E, Turley SJ, Carroll MC. Mechanosensing by Peyer's patch stroma regulates lymphocyte migration and mucosal antibody responses. *Nat Immunol*. 2019;20(11):1506–1516.
9. Varga Z, Flammer A, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel A et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *The Lancet*. Vol. 395, Issue 10234, P1417-1418, MAY 02, 2020.
10. Podpriatov S, Apostolov V, Tatsky O, Konovalenko S. Konovalenko V. Angioprotective properties of exogenous peptides. *Practitioner №1 (8)-2019; 20-24.*