

Перевод статьи: **Development of the COVID-19 infection model: a preclinical study of a new drug Rafamin**

Оригинал статьи размещен на:
<https://www.vibiosphen.com/development-covid-19-infection-model-preclinical-study-new-drug-rafamin>

Разработка модели инфекции COVID-19: доклиническое исследование нового препарата Рафамин

Адекватная модель инфекции SARS-CoV-2 и ее осложнений на животных способна пролить свет на патофизиологию данного заболевания и может быть использована для оценки эффективности и безопасности новых противовирусных препаратов.

На базе компании «Vibiosphen» была воспроизведена модель инфекции SARS-CoV-2 у мышей [1], которая затем была модифицирована таким образом, чтобы стало возможным более эффективное определение ключевых постинфекционных иммунологических нарушений. Для этого 7-недельным трансгенным самцам мышей линии (K18-hACE2)²Prlmn интраназально вводили летальную дозу (200 БОЕ/мышь) SARS-CoV-2 (Уханьский штамм). Выживаемость животных оценивали дважды в день, а массу тела измеряли каждые два дня в течение 9-дневного периода после инфицирования (п.и.). На Д4, Д7 и Д9 п.и. методом количественной ПЦР в реальном времени проводили количественное определение вирусной нагрузки. Для оценки клинически значимых нарушений иммунного ответа анализировали гематологические изменения с помощью лейкограммы на пике инфекции (Д4 п.и.) и на Д7 и Д9 п.и. Диапазоном нормальных значений служили показатели, полученные до заражения (Д0).

Инфицирование SARS-CoV-2 в дозе 200 БОЕ/мышь приводило к высокому проценту смертности (90%, Д8 п.и.) и заметному снижению веса (до 30% к Д8 п.и.), что сопровождалось репликацией вируса с высоким титром в легких (7,6 log₁₀ и 6,9 копий/мл, Д4 и Д7 п.и.). Также отмечались выраженные изменения в лейкоцитарной формуле – лимфопения наряду со значительным снижением количества моноцитов. Эти результаты согласуются как с описанием исходной модели на мышах [1], так и с клиническими данными, полученными в исследованиях на людях [2-3]. Таким образом, на мышах линии K18-hACE2, инфицированных SARS-CoV-2 в дозе 200 БОЕ, была успешно воспроизведена модель данной инфекции, клиническая картина которой во многом схожа с тяжелым течением COVID-19, и данная модель может быть использована для тестирования

препаратов-кандидатов (иммунотерапевтических и противовирусных средств).

В данном исследовании было показано, что постинфекционные иммунологические нарушения могут быть обнаружены с использованием низкой инфицирующей дозы (200 vs. 25 000 БОЕ/ мышь) и изучены с помощью лейкограммы.

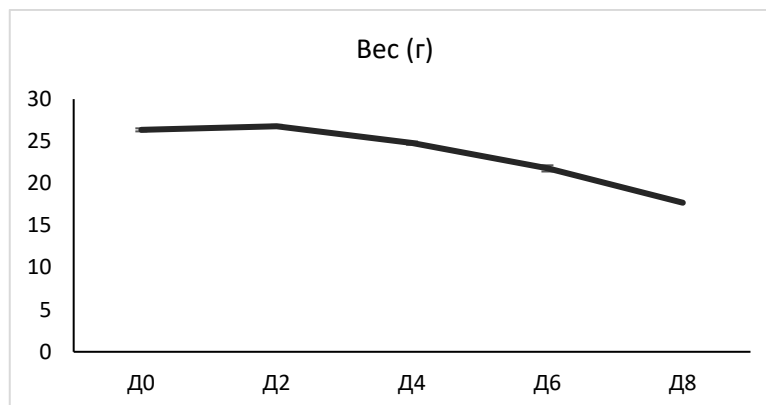


Рисунок 1: Изменение массы тела после инфицирования SARS-CoV-2. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартной ошибки среднего (SEM) ($n=10$ и $n=1$ на Д8).

Статистически значимые различия наблюдали между Д0 и Д4 и между Д0 и Д6

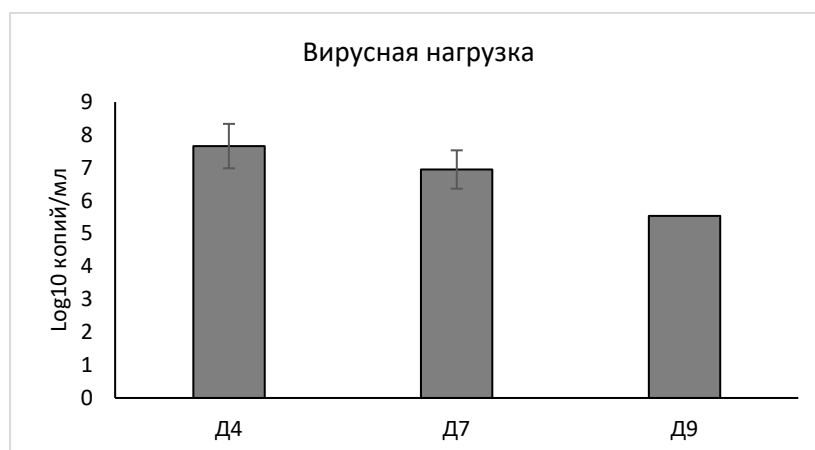
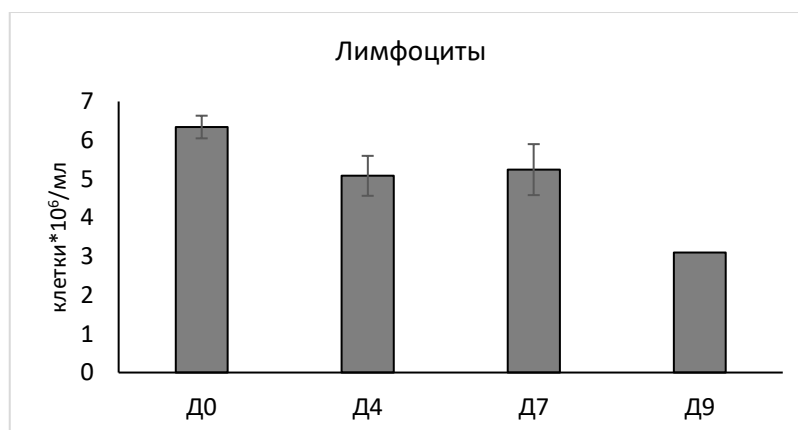


Рисунок 2: Оценка вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в легких методом количественной ПЦР в реальном времени. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM ($n=5$ и $n=1$ на Д9).



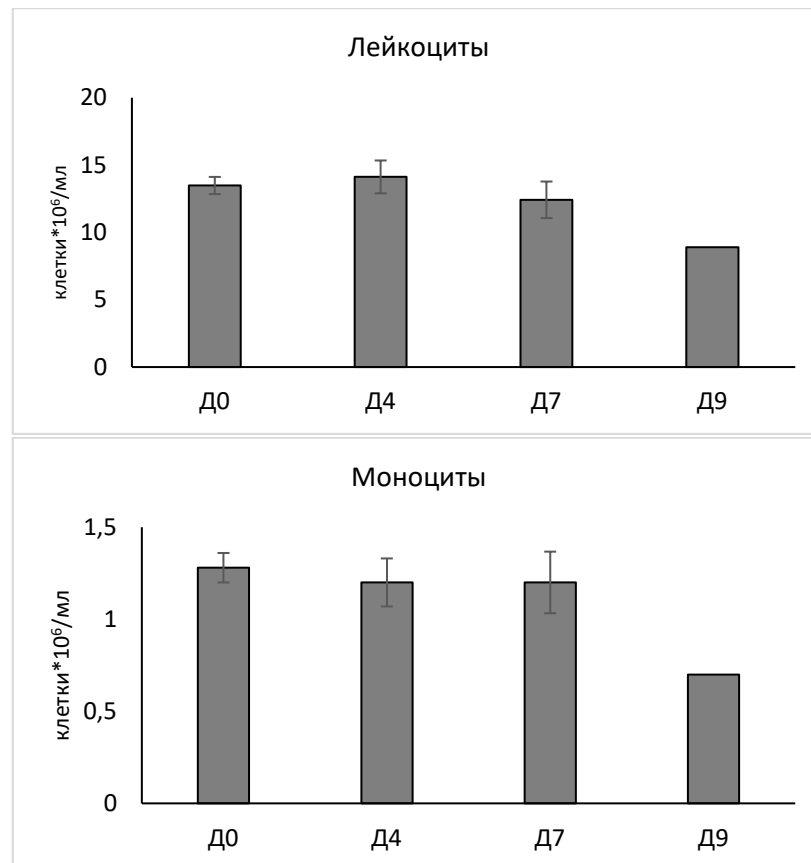


Рисунок 3: Общее количество лимфоцитов, лейкоцитов и моноцитов в крови. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM ($n=5$ и $n=1$ на Д9).

Наличие доклинической модели синдрома, развивающегося после острой фазы SARS-CoV-2, имеет важное значение для тестирования препаратов-кандидатов, направленных на усиление иммунного ответа и ускорение выздоровления [4]. В связи с этим, после моделирования острой инфекции было принято решение снизить инфицирующую дозу до 50 БОЕ/мышь и увеличить период наблюдения (15 дней п.и.), чтобы воспроизвести нелетальную инфекцию и сфокусировать внимание на моделировании нарушений иммунного ответа.

Инфицирование SARS-CoV-2 в низкой дозе (50 БОЕ/мышь) приводило к умеренному снижению веса (до 5% к Д8 п.и. для одной из мышей) и гибели нескольких животных. В то же время, на Д4 п.и. в легких инфицированных мышей были обнаружены высокие уровни вирусной РНК ($\sim 6,0 \log_{10}$ копий/мл), после чего на Д15 п.и. происходила постинфекционная элиминация вируса ($\sim 3,0 \log_{10}$ копий/мл).

Так, с помощью данной модели была изучена активность комплексного иммунотерапевтического препарата Рафамин (который содержит технологически обработанные антитела к ИФН- γ , CD4, МНС I и МНС II). Выбор в пользу Рафамина был сделан исходя из его эффективности, показанной в предыдущих исследованиях. Например, эффективность компонентов Рафамина была продемонстрирована на моделях различных

инфекционных заболеваний: гриппа [7], вирусной инфекции с развитием вторичной бактериальной пневмонии [6] и бактериальной инфекции, устойчивой к антибиотикам [9]. Кроме того, противовирусная активность одного из компонентов Рафамина была продемонстрирована в отношении вируса MERS-Cov *in vitro* [11]. Результаты данных экспериментов согласуются с результатами клинических исследований, которые подтвердили высокий профиль безопасности и эффективность Рафамина [12]. Так, в многоцентровом двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании Рафамин сокращал течение острой респираторной вирусной инфекции на сутки по сравнению с плацебо и способствовал четырехкратному увеличению числа пациентов, выздоравливавших на 3-й день лечения [13].

Следовательно, было выдвинуто предположение о том, что Рафамин может обладать терапевтической эффективностью в отношении SARS-CoV-2 и осложнений, вызванных данной инфекцией. Исходя из механизма действия компонентов Рафамина [5-8], в качестве основного критерия эффективности принимали значительное улучшение иммунологических показателей. На Д4 п.и. и Д15 п.и. подсчитывали общее количество иммунных клеток, измеряли уровни С-реактивного белка (СРБ) и интерлейкина-6 (ИЛ-6) в крови.

У животных, получавших Рафамин (в дозе 20 мл/кг/день в течение 16 дней), на Д4 п.и. отмечалось восстановление показателей крови к нормальным значениям ($\sim 6 \times 10^6$, $\sim 13 \times 10^6$ и $\sim 1,2 \times 10^6$ клеток/мл для лимфоцитов, лейкоцитов и моноцитов, соответственно), и на Д15 п.и. наблюдалось значимое снижение уровней СРБ (на 72% относительно плацебо) и ИЛ-6 (в 2,25 раза меньше по сравнению с плацебо), которые являются ключевыми маркерами воспаления при нарушении иммунного ответа на SARS-CoV-2.

Можно сделать вывод о том, что течение нелетальной инфекции SARS-CoV-2 на животной модели, которое характеризуется отсутствием или низким уровнем титра вируса и наличием иммунологических нарушений, в значительной степени соответствует проявлению постковидного синдрома у человека [14].

Лечение Рафамином на ранней стадии заболевания приводило в норму показатели крови и сокращало воспалительные процессы, предположительно, за счет модуляции адаптивного иммунного ответа на вирус. Представленные результаты подтверждают гипотезу о том, что введение иммунотерапевтических средств, таких как Рафамин, на ранней стадии может оказывать положительное действие как при острой фазе инфекции, так и при лечении осложнений после SARS-CoV-2. Кроме того, в марте 2022 года была одобрена III фаза клиническое исследование эффективности и безопасности Рафамина для лечения новой коронавирусной инфекции COVID-19 у амбулаторных пациентов [15].

Список литературы:

1. Winkler ES, Bailey AL, Kafai NM, et al. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. // *Nat Immunol.* – 2020. – Vol.21. – P.1327–1335
2. Huang C, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. // *Lancet.* – 2020. – Vol.395. – P.497–506
3. Liu X, Zhang R, He G. Hematological findings in coronavirus disease 2019: indications of progression of disease. // *Ann Hematol.* – 2020. – Vol.99(7):. – P.1421-1428
4. Huang C, Huang L, Wang Y, et al. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study // *Lancet.* – 2021. – Vol.397, № 10270. – P.220-232.
5. Woods K.N. New insights into the microscopic interactions associated with the physical mechanism of action of highly diluted biologics // *Scientific Reports.* – 2021. – Vol.11, №1. – P.13774.
6. Petrova N., Emelyanova A., Gorbunov E., Tarasov S. Induction of dendritic cell maturation by ultra-highly diluted antibodies to MHC class II: in vitro results // *Pharmacology 2020 (British Pharmacological Society).* – London, UK. – December 14-18, 2020. – P.483-484
7. Tarasov S.A., Gorbunov E.A., Don E.S., Emelyanova A.G., Kovalchuk A.L., Yanamala N., Schleker A.S.S., Klein-Seetharaman J., Groenestein R., Tafani J-P., van der Meide P., Epstein O.I. Insights into the mechanism of action of highly diluted biologics // *The Journal of Immunology.* – 2020. – Vol.205, issue 5. – P.1345-1354.
8. Emel'yanova A.G., Grechenko V.V., Petrova N.V., Shilovskii I.P., Gorbunov E.A., Tarasov S.A., Khaitov M.R., Morozov S.G., Epshtein O.I. Effects of Release-Active Antibodies to CD4 Receptor on the Level of Ick-Kinase in Cultured Mononuclear Cells from Human Peripheral Blood // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* – 2017. – Vol.162. – P.323-326
9. Emelianova A.G., Petrova N.V., Fremez C., Fontanié M., Tarasov S.A., Epstein O.I. Therapeutic potential of highly diluted antibodies in antibiotic-resistant infection // *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2022. – Vol.173. – P.106161
10. Petrova N.V., Emelianova A.G., Tarasov S.A., Kartashova N.P., Glubokova E.A. Efficacy of an experimental drug based on technologically processed antibodies in models of influenza infection and secondary bacterial pneumonia: results of a preclinical study // *Patogenez.* – 2020. – Vol.18. №4. – P.55-63

11. Don E., Petrova N., Stittelaar K., Gorbunov E., Tarasov S. Antiviral efficacy of released-active antibodies to interferon gamma against MERS Coronavirus // 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – Paris, France. – April 18-21, 2020. – P.1996
12. Clinical Trials of the drug Rafamin
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=MMH-407&cntry=&state=&city=&dist=>
13. Khamitov RF, Nikiforov VV, Zaytsev AA, Tragira IN. Evaluation of the efficacy and safety of a complex antiviral drug based on antibodies in the treatment of adult patients with acute respiratory viral infection // *Terapevticheskii arkhiv.* – 2022. – Vol.94. №1. – P.83-93. [Abstract in English]
14. Soriano JB, Murthy S, Marshall JC, Relan P, Diaz JV; WHO Clinical Case Definition Working Group on Post-COVID-19 Condition. A clinical case definition of post-COVID-19 condition by a Delphi consensus. // *Lancet Infect Dis.* – 2022. –Vol.22. № 4. – P.e102-e107. doi:10.1016/S1473-3099(21)00703-9
15. <https://grls.rosminzdrav.ru/CiPermissionReg.aspx?PermYear=0&DateInc=&NumInc=&DateBeg=&DateEnd=&Protocol=&RegNm=&Statement=&ProtoId=&idCIStatementCh=&Qualifier=&CiPhase=&RangeOfApp=&Torg=%d0%a0%d0%b0%d1%84%d0%b0%d0%bc%d0%b8%d0%bd&LFDos=&Producer=&Researcher=&sponsorCountry=&MedBaseCount=&CiType=&PatientCount=&OrgDocOut=2&Status=&NotInReg=0&All=0&PageSize=10&order=numperm&orderType=desc&pagenum=1>