

Perspektywy zastosowania klinicznego leku Kamelin® w leczeniu i zapobieganiu infekcjom wirusowym

A. Tackij (А.Тацкій)¹, A. Pieczienka (А.Печенка)², M. Pruidze (М.Пруидзе)³

1 – Międzynarodowy Instytut Bioterapii, Kijów, Ukraina

2 – Katedra chorób zakaźnych NAMKP im. P.L.Szupika, Kijów, Ukraina

3 – Kamelin Sp. z o.o. (ООО “Камелин”), Tbilisi, Gruzja

STRESZCZENIE

Naukowcy z Międzynarodowego Instytutu Bioterapii (m. Kijów, Ukraina) przeprowadzili kontrolowane placebo badanie skuteczności przeciwwirusowej substancji leku Kamelin® na modelu L929 z wykorzystaniem wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (wirus RNA). Otrzymane wyniki świadczą o znacznej aktywności przeciwwirusowej leku Kamelin w warunkach jego stosowania przeciwko wirusom RNA, w tym rodziny Rhabdoviridae. Udowodniona skuteczność przeciwwirusowa Kamelinu w odniesieniu do wirusów genomowych RNA jest ważna dla perspektyw stosowania leku w aktualnych chorobach, takich jak wirusowe zapalenie wątroby typu C, Coxsackie, gorączka krwotoczna, zakażenie koronawirusem, sezonowe infekcje rinowirusowe. Działanie przeciwwirusowe leku Kamelin wynika głównie z aktywności naturalnych peptydów przeciwwirusowych, których właściwości przeciwwirusowe powstały w sposób naturalny w trakcie ewolucji w stosunku do bardziej ewolucyjnie starożytnych wirusów RNA.

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, 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.

Podczas badań w laboratoriach różnych krajów, w tym Japonii, Korei Południowej, Wielkiej Brytanii i Stanach Zjednoczonych, zostało stwierdzone, że peptydy pochodzenia naturalnego, w szczególności RJP-1, apidaecin, defensin posiadają dawne, powstałe w trakcie ewolucji właściwości: aktywować odporność i niszczyć wirusy. Zrozumienie tych mechanizmów w uzasadniony sposób doprowadziło do wprowadzenia do praktyki medycznej leków na bazie naturalnych peptydów.

W ostatnich latach do leczenia i zapobiegania sezonowym infekcjom wirusowym (OWZDR) z powodzeniem stosuje się Kamelin® – lek immunotropowy zawierający peptydy przeciwwzakaźne pochodzenia naturalnego [1-4].

Projekt kontrolowanego placebo badania skuteczności przeciwwirusowej Kamelina® został opracowany przez zespół lekarzy chorób zakaźnych w ramach programu przeciwwirusowego Międzynarodowego Instytutu Bioterapii (Kijów, Ukraina). W pracy wykorzystano komórki linii L929 (fibroblasty myszy) i wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej zawierającego RNA (WPZJU, ATCC nr VR-158) o mianie zakaźnym co najmniej 10⁵ TCD₅₀/0,1 ml. Wymienione systemy testowe spełniają wymagania USP "Draft Guidance for Industry on Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics; Availability, 2014". Ocenę działania przeciwwirusowego różnych stężeń preparatu Kamelin przygotowanych ex tempore w roztworze soli fizjologicznej przeprowadzono przez określenie liczby żywych komórek w łożcu, po ich barwieniu fioletem krystalicznym [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].

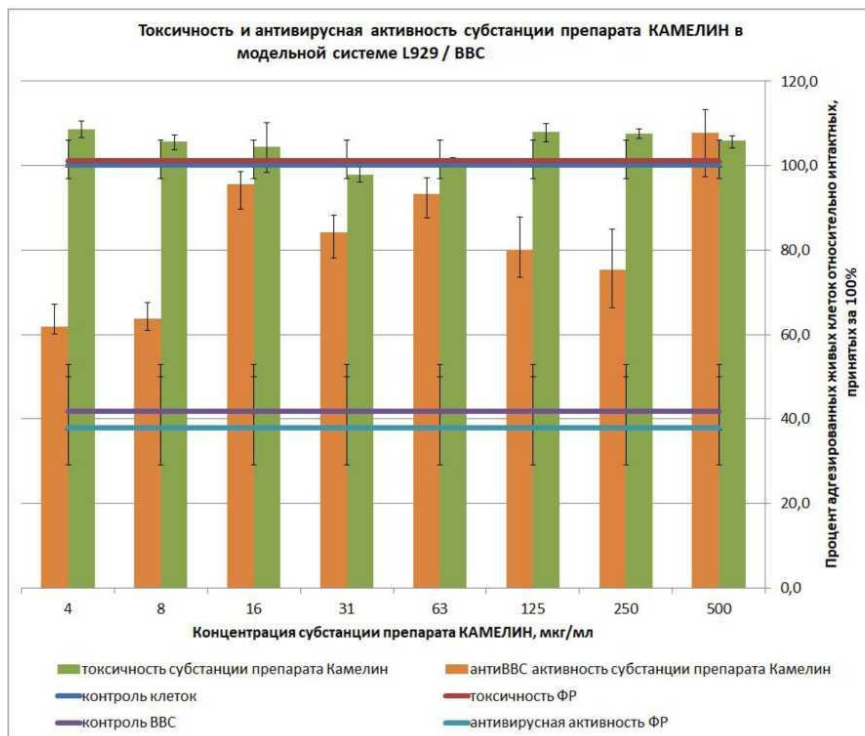
Po 24 godzinach od zakażenia przeprowadzano sprawdzenie cytopatycznego działania wirusa: po usunięciu z łezek płynu nadosadowego do roztworu odkażającego i do komórek dodawano 0,2 % roztwór barwnika Crystal Violet ("Sigma", USA) w 2 % etanolu. Po 15 minutach barwnik usuwano, a zabarwioną monowarstwę komórek przepłukiwano pod wodą bieżącą. Gęstość optyczną barwionych komórek mierzono przy długości fali 540 nm.

Uzyskane wyniki były brane pod uwagę tylko wtedy, gdy w hodowlach kontrolnych wolnych od wirusa (placebo – izotoniczny 0,9 % roztwór chlorku sodu) nie było zmian cytodestrukcyjnych, a w kontroli wirusa obserwowano całkowite zniszczenie komórek. Badanie działania przeciwwirusowego przeprowadzano przy 24-godzinnym kontakcie komórek z lekiem, który podawano 40 minut po zakażeniu wirusem testowym (Tabela 1).

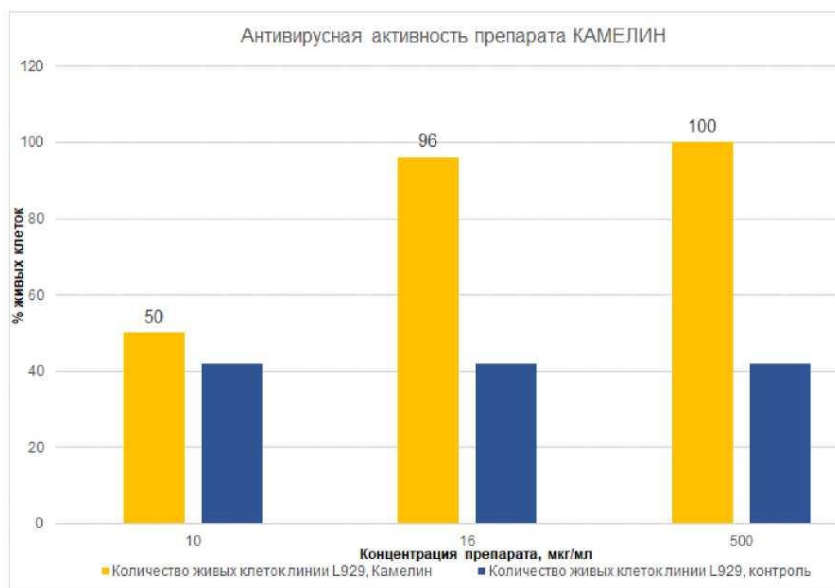
3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KW	Wirus + Placebo	Wirus + A 1230	Wirus + A 1230	Wirus + A 1230	Wirus + A 1230	Placebo	A 1230	A 1230	A 1230	A 1230	KK
B	KW	Wirus + Placebo	Wirus + A 123	Wirus + A 123	Wirus + A 123	Wirus + A 123	Placebo	A 123	A 123	A 123	A 123	KK
C	KW	Wirus + Placebo	Wirus + A 12,3	Wirus + A 12,3	Wirus + A 12,3	Wirus + A 12,3	Placebo	A 12,3	A 12,3	A 12,3	A 12,3	KK
D	KW	Wirus + Placebo	Wirus + A 1,23	Wirus + A 1,23	Wirus + A 1,23	Wirus + A 1,23	Placebo	A 1,23	A 1,23	A 1,23	A 1,23	KK
E	KW	Wirus + Placebo	Wirus + A 0,123	Wirus + A 0,123	Wirus + A 0,123	Wirus + A 0,123	Placebo	A 0,123	A 0,123	A 0,123	A 0,123	KK
F	KW	Wirus + Placebo	Wirus + A 0,012	Wirus + A 0,012	Wirus + A 0,012	Wirus + A 0,012	Placebo	A 0,012	A 0,012	A 0,012	A 0,012	KK
G	KW	Wirus + Placebo	Wirus + A 0,001	Wirus + A 0,001	Wirus + A 0,001	Wirus + A 0,001	Placebo	A 0,001	A 0,001	A 0,001	A 0,001	KK
H	KW	Wirus + Placebo	Wirus + A 0,0001	Wirus + A 0,0001	Wirus + A 0,0001	Wirus + A 0,0001	Placebo	A 0,0001	A 0,0001	A 0,0001	A 0,0001	KK

* Oznaczenia umowne *KW* – kontrola wirusa; *KK* – kontrola komórek; *Placebo* – rozpuszczalnik (0,9 % roztwór chlorku sodu, izotoniczny); *A 1230* – substancja leku Kamelin w stężeniu 1230 µg/ml pożywki hodowlanej.

W badaniu określono przeciwwirusowe działanie leku Kamelin przeciwko wirusowi u RNA pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (WPZJU) i ustalono EC 50 – skuteczne stężenie leku (µg/ml) wymagane do zahamowania działania cytopatycznego wirusa o 50 %, które wyniosło 10 µg/ml. Kamelin w stężeniu 16 µg/ml przyczynia się do przeżycia 96 % komórek, a w stężeniu 500 µg/ml 100% komórek hodowli L929 (ryc. 1-2).



Rycina 1. Stosowanie substancji leku Kamelin w systemie modelowym L929 / WPZJU. Oznaczenia: kontrola komórek – liczba nienaruszonych komórek linii L929; toksyczność RF (soli fizjologicznej?) – liczba komórek linii L929 po kontakcie z RF przez 24 godziny; toksyczność substancji leku Kamelin – liczba komórek linii L929 po kontakcie z substancją leku Kamelin przez 24 godziny; kontrola WPZJU – liczba komórek linii L929 po 24 godzinach po zakażeniu wirusem WPZJU; aktywność antywirusowa RF – liczba komórek linii L929 po zakażeniu wirusem WPZJU i traktowaniu komórek RF przez 24 godziny; aktywność przeciw WPZJU substancji leku Kamelin – liczba komórek linii L929 po zakażeniu wirusem WPZJU i traktowaniu komórek substancją leku Kamelin przez 24 godziny; % żywych komórek – liczba przylegających żywych komórek linii L929 w stosunku do nienaruszonych, uznanych za 100%.



Rycina 2. Stosowanie substancji leku Kamelin w systemie modelowym L929 / WPZJU.

Otrzymane wyniki świadczą o znacznej aktywności przeciwwirusowej leku Kamellin w warunkach jego stosowania przeciwko RNA wirusom, w tym rodziny Rhabdoviridae. Udowodniona skuteczność przeciwwirusowa Kamelina w odniesieniu do RNA wirusów genomowych jest ważna dla perspektyw stosowania leku w aktualnych chorobach, takich jak wirusowe zapalenie wątroby typu C, Coxsackie, gorączka krwotoczna, zakażenie koronawirusem, sezonowe infekcje rinowirusowe itp.

Należy również zauważyć, że planując zapobieganie i leczenie ostrych infekcji wirusowych układu oddechowego, w tym Covid-19, należy brać pod uwagę nowe dane z materiałów artykułów naukowych z 2020 r., uzyskane przez specjalistów podczas leczenia tej choroby. W artykule opublikowanym w kwietniu w czasopiśmie naukowym "Lancet" (The Lancet) Dr Varga (Zurych, Szwajcaria) z grupą naukowców

odkryli, że wirus SARS-CoV-2 może infekować komórki śródbłonka pokrywające wewnętrzne ściany naczyń krwionośnych. Komórki śródbłonka chronią układ sercowo-naczyniowy i uwalniają białka, które wpływają na jego wskaźniki strukturalne i funkcjonalne: od tworzenia się skrzepów krwi po odpowiedź immunologiczną. "Koncepcja, którą udało się nam namierzyć, jest taka, że infekcja koronawirusowa to nie tylko choroba układu oddechowego; uznawana ona jest za chorobę układu oddechowego ze względu na początkowe objawy, ale ogólnie jest to choroba naczyniowa, która grozi pacjentom śmiertelnymi konsekwencjami z powodu ingerencji w układ krążenia" – donoszą naukowcy. W swojej publikacji naukowcy ujawniają uszkodzenie komórek śródbłonka naczyniowego w płucach, sercu, nerkach, wątrobie i innych narządach wewnętrznych u pacjentów z zakażeniem Covid-19 [9]. W związku z powyższym konieczne jest wskazanie wyraźnych właściwości angioprotekcyjnych peptydu RJP-1, który jest częścią leku Kamelin. Pacjentom z patologią naczyniową, którzy w celu przywrócenia homeostazy immunologicznej przyjmowali lek Kamelin, w celu zbadania potencjału angioprotekcyjnego leku zlecono badanie poziomu ekspresji czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego – VEGF-A.

Oznaczenie VEGF-A w surowicy przeprowadzono metodą pośredniego testu immunoenzymatycznego w fazie stałej przy użyciu zestawów firmy Bender MedSystems GmbH (Austria). Substancja leku Kamelin ze względu na ewolucyjnie uwarunkowane właściwości peptydów egzogennych reagować z białkami regulacyjnymi błon komórkowych, stymuluje ekspresję czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego. Zwiększenie aktywności VEGF-A sprzyja neowaskularyzacji, zmniejsza niedotlenienie i poprawia trofizm niedokrwionych tkanek na mikropoziomie, zapewnia naprawę uszkodzonego śródbłonka naczyniowego, co prowadzi do lepszych wyników leczenia pacjentów z patologią naczyń [10].

W kontekście powyższego otrzymane dane pozwalają zalecać Kamelin® jako obiecujący lek poprawiający rokowanie u pacjentów z infekcjami wirusowymi, którym towarzyszy uszkodzenie naczyń, w szczególności wariant wirusa Covid-19.

Wnioski

1. Przeprowadzone badanie kontrolowane placebo potwierdza, że lek Kamelin wykazuje wyraźne działanie przeciwwirusowe w modelu L929/WPZJU (wirus RNA).

2. Działanie przeciwwirusowe leku Kamelin wynika głównie z aktywności naturalnych peptydów przeciwwirycznych, których właściwości przeciwwirusowe powstały w sposób naturalny w trakcie ewolucji w stosunku do bardziej ewolucyjnie starożytnych wirusów RNA.
3. Udowodniona skuteczność przeciwwirusowa jest ważna dla klinicznej perspektywy włączenia leku Kamelin do schematów leczenia i zapobiegania chorobom istotnym społecznie: sezonowym zakażeniom rinowirusem (OWZDR), kleszczowym zapaleniu mózgu, gorączki krwotocznej Ebola, zakażeniu koronawirusem, wirusowemu zapaleniu wątroby typu C itp.

Piśmiennictwo

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.