Розробка протигрипозних засобів: досвід, здобутки, перспективи

Сергій Поздняков,
директор Українського науково-дослідного протичумного інституту ім. І.І. Мечнікова, кандидат медичних наук

ВООЗ рекомендує у кожній країні створити необхідний резерв хіміотерапевтичних засобів, які могли б забезпечити профілактичні та лікувальні заходи у разі різкого підйому кількості захворілих на грип серед населення. Практичні заходи повинні бути спрямовані на зменшення захворюваності, летальності та соціальної дезорганізації. Пошук активних хіміотерапевтичних засобів проти грипу та схем їх застосування залишається актуальним і перспективним завданням.

Незважаючи на те, що за останні десятиріччя всесвітній фармацевтичний ринок насичувався десятками нових противірусних препаратів, питання профілактики і терапії найбільш розповсюджених вірусних інфекцій не вирішене. Відомо, що розробка нових фармакологічних засобів є досить тривалим і фінансово витратним шляхом створення медикаментів. З позицій фармакоекономіки — нової сучасної фармацевтичної науки, яка оцінює співвідношення між ефективністю, безпечністю та вартістю лікарських засобів при різних схемах лікування — виявлення противірусних властивостей ліків (що вже використовуються за іншим призначенням), виробництво яких налагоджено, а активність та побічна дія відома через багаторічне застосування, є дуже перспективним і економічно виправданим напрямком. Крім того, такий підхід дає можливість розширювати показання для застосування відомих препаратів.

У лабораторії імунобіологічних і хіміотерапевтичних препаратів Українського науково-дослідного протичумного інституту ім. І.І. Мечнікова МОЗ України (УНДПЧІ) протягом багатьох років проводяться дослідження з грипозної тематики, значна частина з яких виконується у творчій співдружності з працівниками інших інститутів, що дало можливість отримати важливі прикладні та фундаментальні результати, у тому числі такі, що мають пріоритетний характер.

Встановлено, що внаслідок взаємодії вірусу грипу з мембранами чутливих клітин підвищується протеоліз, що призводить до нарізання гемаглютиніну вірусу, яке забезпечує його проникнення до клітини, а також депротеїнізацію та подальшу репродукцію вірусів. Підвищення протеолізу при грипі має місце не тільки на субклітинному та клітинному, органному рівні (легені), але й на рівні цілого організму (кров). Інгібітори протеолізу (ІП), зокрема епсілон-амінокапронова кислота (ЕАКК), гальмують підвищення протеолізу та проникнення вірусів до клітин, зменшуючи врожай інфекційного вірусу. На рівні цілого організму при експериментальному грипі ЕАКК виявляє не тільки етіотропну (пряму противірусну), але й позитивну патогенетичну та імуномодулюючу дію.

Встановлено гальмування ЕАКК репродукції вірусів грипу різних типів А (серопідтипи H1N1, H2N2, H3N2 — віруси грипу людини, H5N3, H7N3 — віруси грипу птахів), В, парагрипу та аденовірусів. Це обґрунтовує доцільність місцевого (інтраназальне, інгаляційне) використання АКК в профілактиці та лікуванні грипу та інших респіраторних інфекцій у медицині та ветеринарії.

Клінічні спостереження у подальшому підтвердили профілактичну дію лікувального засобу "Амінокапронова кислота" (АКК) при інтраназальному і інгаляційному методах її аплікації.

Спільними дослідженнями з Всеросійським науково-дослідним інститутом грипу, (м. Санкт-Петербург) встановлено, що застосування АКК зберігає повітряність тканини легень, структуру та повнокровність легеневих судин, запобігає розвитку периваскулярного набряку та геморагічного синдрому, що перешкоджає виникненню порушень аерогематичного бар'єру. Препарат запобігає руйнуванню протеазами таких факторів місцевого противірусного захисту дихальних шляхів, як секреторні антитіла і неспецифічні вірусні інгібітори (що важливо для місцевого використання препарату), а також інтерферон. Введення АКК при моделюванні експериментального грипу стимулює захисні реакції: посилює секрецію бронхів, спричиняє периваскулярну та перибронхіальну лімфоїдну інфільтрацію, збільшує кількість гранулярних клітин у легенях.

Інтегративним результатом етіотропної (противірусної) і позитивної патогенетичної та імуномодулюючої дії АКК при експериментальному грипі є суттєве зниження титрів інфекційного вірусу в легенях мишей як при моделюванні несмертельної форми захворювання за допомогою штаму А/Гонконг/1/68 (H3N2), так і важкої летальної інфекції при зараженні високовірулентним вірусом A/PR/8/34 (H1N1), а також зменшення летальності.

При експериментальному грипі наведені результати були отримані, коли АКК використовували інтраназально, перорально або парентерально за лікувальною (протягом 5 днів після інфікування), екст-

рено-профілактичною (за 1-2 дні до інфікування) та довгостроковою профілактичною (протягом 5 днів з подальшим інфікуванням через 15-45 діб) схемами.

Таким чином, експериментальні результати свідчать про доцільність комбінованого ентерального і інтраназального введення амінокапронової кислоти.

Особливо слід зазначити, що тварини, яких лікували АКК, були набагато більше захищеними до повторного зараження через 30 діб, ніж ті, що при первинному інфікуванні отримували плацебо (контроль). При цьому, на відміну від контрольних мишей, у них вже через добу після повторного зараження інфекційний вірус у легенях не виявлявся, а подальше підвищення титрів антигемаглютининів у крові було набагато більшим у порівнянні з контролем.

Крім того, результати також свідчать про перспективність використання АКК при імунізації живими вакцинами.

Базуючись на результатах власних експериментальних досліджень, а також даних літератури, було сформульовано концепцію формування "порочного кола" при вірусних інфекціях, зокрема при грипі: взаємодія вірусу з хазяїном призводить до активації протеолізу на різних структурно-функціональних рівнях, що, у свою чергу, веде до підвищення інфекційності вірусної популяції та виникнення і розвитку патогенетичних феноменів. Результатом є розвиток, обтяження та генералізація інфекційного процесу. Використання інгібіторів протеолізу, зокрема амінокапронової кислоти, дає можливість запобігти формуванню такого "порочного кола" (профілактика) або зруйнувати його (лікування).

Подальші клінічні спостереження, проведені разом із працівниками Одеського Державного медичного університету продемонстрували ефективність препаратів АКК при лікуванні дітей різного віку, хворих на грип та інші гострі респіраторні вірусні інфекції (ГРВІ).

АКК при ускладненому грипі і ГРВІ призначали у добовій дозі 0,1-0,2 г/кг ваги тіла ентерально (через рот), розділивши її на 4 прийоми, розчиняючи препарат перед використанням у кип'яченій воді, або використовуючи готовий 5% розчин. При тяжкому перебігу захворювання доза АКК збільшувалась до 0,3-0,5 г/кг ваги тіла на добу, причому половина добової дози вводилась внутрішньовенно крапельно. Була встановлена доцільність закладання на 5-10 хвилин у носові ходи ватних турунд, змочених 5% розчином АКК, або закапування цього розчину в носові ходи з інтервалом у 3-4 години. Курс лікування продовжувався протягом 3-7 днів.

Препарати АКК особливо ефективними виявились на ранніх стадіях хвороби, тому що попереджають виникнення небезпечних для життя дитини токсичних синдромів і у 2 та більше разів зменшують частоту вторинних бактеріальних ускладнень. Місцеве використання АКК пришвидшує відновлення співвідношення циліндричного і плоского епітелію, скорочення періоду вірусного антигеноносійства і тривалості цитотоксичної дії вірусу. У грудних дітей з ускладненими формами грипу та ГРВІ, а також у часто хворіючих, найліпші результати було отримано при поєднанні використання АКК ентерально (у рот) і інтраназально (у ніс) протягом 5-7 днів і введенні імуноглобуліну спрямованої дії в дозі 0,2-0,3 мл/кг ваги 2-3 рази на добу. Подібне поєднання сприяє скороченню тривалості періоду інфекційного токсикозу на 3-4 дні, періоду лихоманки — до 2-х днів. Спільне використання АКК і такого імуноглобуліну найбільш ефективно, якщо почати їх використання у перші 3 дні захворювання.

Профілактичну ефективність АКК у часто хворіючих дітей віком від 3 до 6 років було виявлено при спостереженнях, проведених у дитячих дошкільних закладах Таллінна при співпраці з науковцями Естонського Інституту профілактичної медицини. Перший профілактичний курс проводили у вересні протягом 2-х тижнів. Дітям за допомогою пристрою для інтраназальної імунізації щодня двократно (зранку та ввечері) вводили по 0,5 мл 5% розчину АКК. Другий курс (аналогічний першому) діти отримували у період епідемічного підйому захворюваності на грип. Аналіз епідеміологічної ефективності використання АКК показав, що діти, які отримали препарат, хворіли рідше, ніж ті, які не отримували його. Така тенденція зберігалась і наступні 4 місяці. Кількість дітей, які хворіли до 6-ти разів на рік, зменшилась на 60%. Курс профілактики скоротив тривалість одного захворювання у середньому на 2,7 дні.

У сімейних осередках захворювань препарат застосовували по лікувальній схемі ентерально та інтраназально, оскільки екстренна профілактика повинна поєднуватися з раннім лікуванням. Для профілактики грипу у дітей і дорослих в епідемічний період доцільно щодня закапувати 3-5 разів на день 5% розчин АКК, або закладати в ніс у кожну ніздрю поперемінно на 5-10 хвилин ватні турунди, ретельно змочені 5% розчином АКК з інтервалом в 3-4 години. Протипоказанням до призначення АКК є схильність до тромбозів і порушення роботи нирок. Але для лікування грипу і ГРВІ використовували дози АКК у кілька разів менші за добову гемостатичну дозу, і побічні реакції не спостерігалися.

На основі отриманих результатів, була прийнята постанова Фармакологічного Комітету МОЗ України, протокол № 2 від 25.02.1993 р., на підставі якої Міністерство охорони здоров'я України наказом № 225 від 03.11.1993 р. дозволило застосування кислоти амінокапронової при грипі та гострих респіраторних вірусних інфекціях у дітей, переважно з середнім та тяжким перебігом хвороби, при ентеральному та інстиляційному шляхах введення препарату.

Відповідно до наказу МОЗ України були зроблені зміни та доповнення до інструкції та аркуш-вкладка з клінічного застосування кислоти амінокапронової, які рекомендували її застосування для лікування при грипі та ГРВІ.

Необхідно констатувати той факт, що в Україні лікарський засіб "Амінокапронова кислота" у формі розчину виробляють шість підприємств, у формі порошку — одне підприємство, у формі таблетки — одне підприємство. Зараз у ДФЦ України ведеться робота із затвердження єдиної для всіх виробників інструкції до медичного застосування лікарського засобу "Амінокапронова кислота", яка містить рекомендації про протигрипозне використання. Слід підкреслити, що всі відомі хіміотерапевтичні противірусні засоби дозволені для використання у дітей від 1 року, тоді як застосування амінокапронової кислоти не має вікових обмежень. Таким чином, вона є дієвим хіміотерапевтичним засобом захисту від грипу та ГРВІ найбільш вразливого контингенту — дітей першого року життя.

Слід зазначити, що для дітей цього віку в інституті була розроблена технологія отримання імуноглобуліну подвійної спрямованої дії проти грипу та стафілококу. Цей протигрипозний імуноглобулін подвійної дії містить високі рівні антитіл до актуальних штамів вірусу грипу, а також збагачений антитілами до альфатоксину стафілококу. Препарат був всебічно досліджений у експерименті та в клініці. Висока клінічна ефективність його була підтверджена в результаті клінічних спостережень у клініці кафедри дитячих хвороб Одеського медичного університету (ОМУ) та в НДІ грипу (м. Санкт-Петербург). У дітей, хворих на грип та ГРВІ, які отримували цей препарат, значно зменшувалась кількість ускладнень та пневмоній, скорочувались строки періоду лихоманки та перебування у стаціонарі.

У клініці ОМУ також були проведені клінічні спостереження, що показали високу ефективність застосування при лікуванні грипу та ГРВІ у дітей комплексної терапії з використанням АКК і специфічного імуноглобуліна подвійної спрямованої дії. Було показано, що комплексне використання цих препаратів супроводжувалось потенціюванням їх протигрипозної дії. Отримані результати клінічних спостережень обумовили доцільність рекомендації впровадження комплексного застосування цих засобів для практики охорони здоров'я. Це дозволило суттєво зменшити ефективну дозу імуноглобуліну, значно знизило медикаментозне навантаження на організм та здешевило лікування.

Слід підкреслити, що в УНДПЧІ було розроблено підхід, якій дозволяє підвищити ефективність лікування грипу за допомогою комбінованої схеми з використанням виключно вітчизняних лікарських засобів, а також закордонних препаратів, що є особливо актуальним у зв'язку з розповсюдженням сучасної пандемії грипу. При комбінованому використанні АКК і вітчизняного противірусного засобу "Амізон" було виявлено ефект потенціювання протигрипозної дії. Це було підтверджено in vitro, як у відношенні вірусів грипу людей, так і птахів, а також і при експериментальному грипу мишей (моделюванні важкої летальної інфекції) при інфікуванні їх високовірулентним вірусом A/PR/8/34 з антигенною формулою H1N1.

При комбінованому використанні АКК і інгібітору нейрамінідази "Таміфлю" також було виявлено ефект потенціювання протигрипозної дії. При моделюванні у мишей важкої летальної інфекції зараженням високо-вірулентним вірусом A/PR/8/34 (H1N1), і застосуванні "Таміфлю" і АКК у дозах нижчих, за мінімально ефективні комбінація цих двох препаратів демонструвала статистично значущий захисний ефект. Це свідчить, що за допомогою такої комбінованої терапії можливо: знизити медикаментозне навантаження на організм; зменшити частоту токсичних проявів при застосуванні Таміфлю; здешевити лікування.

Окремо слід зазначити, що застосування такої комбінації може дати можливість використати зі значно більшим ефектом 61 тисячу доз Таміфлю, які для боротьби з пандемією грипу ВООЗ передав Україні. При цьому можна застосувати цей коштовний препарат для профілактики та лікування грипу у значно більшої кількості пацієнтів. Аналогічні дослідження були проведені також *in vitro* та *in vivo* з іншими офіціальними препаратами — **Декаметоксином (ДТ)**, Етоніем (ЕТ) і Унітіолом (УТ). Одним з механізмів реалізації противірусної дії цих препаратів доцільно вважати гальмування протеолітичних процесів під час взаємодії вірусу з мембранами чутливих клітин.

Встановлено, що ці препарати виявляють виражену протигрипозну активність у відношенні вірусів грипу А і В людини, а також вірусів грипу птахів штамів H5N3 і H7N3 *in vitro.* Тому їх можна розглядати як кандидатів у противірусні засоби.

В УНПЧІ встановлено, що АКК захищає вірусні антигени від аутолізу в процесі зберігання інактивованих вакцин, продовжуючи строк їх придатності, та збільшує захисну дію вакцин (Патент України. № 9574 от 17.10.2005. Бюл. №10.3 "Спосіб виготовлення противірусних вакцин"). Комбіноване використання АКК з індуктором інтерферону рослинного походження спричиняє ефективнішу продукцію інтерферону, а також підвищує захищеність тварин при моделюванні експериментальної вірусної інфекції (Патент України "Спосіб індукції інтерферону". Патент №14402 від 15.05.2006. Бюл. №5. МПК (2006) A61K 45/00). Спільно з фахівцями Одеського Національного Університету працівниками лабораторії був розроблений пластир для трансдермального введення ремантадину, що дає можливість знизити дозу препарату, уникнути його негативної дії на шлунково-кишковий тракт та печінку, довгий час підтримувати потрібну концентрацію у крові (Патент України "Засіб для профілактики та лікування грипозної інфекції" Патент №77974 C2. від 15.02.2007).

Отримані результати вказують на високу протигрипозну ефективність розробленої трансдермальної системи доставки ремантадину. При порівняльному вивченні трансдермальний спосіб доставки ремантадину виявився ефективнішим за його пероральне застосування. Основними перевагами трансдермальної ліків доставки ліків є: подовження дії препаратів; зниження ефективної дози; відсутність різких коливань концентрації препаратів та підтримка їх концентрацій у межах терапевтичних доз; відсутність травмування пацієнта при застосуванні; зменшення побічної дії; можливість припинення проникнення препарату до організму у будь-який час, у разі виникнення побічної дії, шляхом видалення пластиру зі шкіри; відсутність процесів пов'язаних з первинним проходженням препаратів через печінку; можливість застосування у складі трансдермальних систем доставки таких препаратів, які можуть бути високоактивними, але подразнюють шлунково-кишковий тракт або мають короткий період напівжиття.

Використання цієї системи може бути особливо зручним у дітей.

В інституті у співдружності з працівниками Фізико-хімічного інституту НАН України (м. Одеса) набув розвитку принцип пошуку противірусних препаратів, який базується на встановленні зв'язку між хімічною структурою речовин та їх противірусними властивостями (кількісний зв'язок структура - активність - Quantitative - Structure Activity Relationship - QSAR). Ієрархічна QSAR технологія (IT) націлена на оптимізацію процесу створення нових ефективних лікарських засобів. IT дозволяє вирішувати QSAR завдання не "з нуля", а використовуючи інформацію, отриману на попередніх стадіях дослідження, за допомогою системи рішень, що уточнюються.

Унікальна і принципова особливість запропонованої технології полягає у багатоплановості ієрархічної стратегії, яка стосується: моделей опису молекулярної структури сполук (1D → 2D → 3D → 4D); моделей опису атомів у молекулярних симплексах (дескрипторна → фізико-хімічна → польова); структурних параметрів (локальні → інтегральні); шкал оцінки активності (бінарна → номінальна → порядкова → континуальна); математичних методів, що використовуються для встановлення зв'язку структура - активність (розпізнавання образів → рангова кореляція → багатовимірна регресія → PLS); кінцевої мети вирішення QSAR завдання (прогноз → інтерпретація → оптимізація структури → молекулярний дизайн).

Результатом застосування IT є набір різних QSAR моделей, які, доповнюючи одна одну, вирішують завдання віртуального скринінгу, оцінки впливу структурних чинників на активність, модифікації вже відомих молекулярних структур та конструювання нових, що забезпечують високу ефективність потенційних антивірусних агентів.

Розроблена IT реалізована у вигляді комплексу комп'ютерних програм. Розробка і використання цього напрямку дали можливість надати рекомендації щодо спрямованого синтезу речовин визначеної структури з прогнозованою противірусною активністю. Крім того, цей метод дозволяє прогнозувати противірусну активність у відомих офіцінальних препаратів, які використовують у медичній практиці за іншим призначенням.

Крім експериментальних та клінічних досліджень в інституті ведуться інші роботи з питань нагляду та протидії можливої епідемії актуального грипу. Протягом останніх років інститут тісно співпрацює з національними та міжнародними установами такими як науково-дослідне об'єднання "Вектор" (Росія), військово-морська науково-дослідна вірусологічна лабораторія США (NAMRU-3), Регіональний центр ВООЗ з пташиного грипу (м. Мемфіс, США). Основні напрямки досліджень у межах цього співробітництва присвячені проблемам вивчення ролі мігруючих птахів у заносі та розповсюдженні збудника пташиного грипу в Україні, а також основних шляхів заносу та передачі цього збудника.

Слід зазначити, що Український науково-дослідний протичумний інститут ім. І.І. Мечнікова згідно з Наказами МОЗ України (№560 від 25.10.2005 та №661 від 20.11.2008) є базовим центром з діагностики пташиного та актуального грипу. Центр забезпечений сучасним обладнанням і діагностичними тест-системами для виявлення та дослідження як пандемічних штамів вірусу грипу, так і збудників пташиного грипу. Крім того, це обладнання (Real-time ПЛР, секвенатор) дозволить проводити також молекулярно-генетичне вивчення виявлених збудників. Для надання практичної та консультативно-методичної допомоги закладам охорони здоров'я України інститут має дві оперативні бригади, у складі яких знаходяться висококваліфіковані спеціалісти (вірусологи та епідеміологи). Таким чином, інститут готовий до організації протиепідемічних заходів стосовно грипу в Україні, а також проведенню науково-дослідних робіт.

Саме поєднання практичних робіт та наукових розробок має бути основою для ефективної боротьби з можливою пандемією актуального грипу.

Щиро дякую моїм колегам В.П. Лозицькому, Л.Я. Могілевсьому, А.С. Федчук, Т.Л. Гридіній, М.В. Маліковій, З.М. Нехороших, які надали матеріали та допомогли у підготовці цієї публікації.