

## Патогенетическое лечение гриппа с помощью аэрозольной формы аprotинина, ингибитора протеаз

О.П. Жирнов<sup>1</sup>, Н.О. Бокова<sup>2</sup>, Е.И. Исаева<sup>1</sup>, И.В. Воробьева<sup>1</sup>, Н.А. Малышев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии  
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации, Москва, Россия

<sup>2</sup>ГКУЗ Инфекционная клиническая больница № 1, Москва, Россия

## Pathogenetic treatment of influenza patients with aerosolized form of aprotinin, a protease inhibitor

O.P. Zhirnov<sup>1</sup>, N.O. Bokova<sup>2</sup>, E.I. Isaeva<sup>1</sup>, I.V. Vorobieva<sup>1</sup>, N.A. Malyshev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Moscow Infectious Clinics № 1, Moscow, Russia

Изучали лечебную и противовирусную эффективность аэрозольной формы ингибитора протеаз, аprotинина, блокирующего этап протеолитической активации вируса гриппа респираторными протеазами организма-хозяина. Исследование проведено в период зимне-весенней вспышки гриппа, вызванной пандемическим вирусом H1N1pdm09. Противовирусный химиопрепарат аprotинин (природный антипротеазный полипептид) применялся в ингаляционной форме с помощью ручного ингалятора дозированного типа с пропеллентом. Больные вдыхали аэрозольный аprotинин (160 Калликреин Ингибирующих Единиц (КИЕ)) каждые 2 часа в течение 5 дней. В группе сравнения пациенты получали ингавирин (синтетический пептидоамин – противовирусный препарат с неустановленной вирусной мишенью действия): 90 мг 1 раз в день per os, в течение 5 дней. Установлено 10-кратное снижение уровня вирусной нагрузки в смывах пациентов, получавших аprotинин, по сравнению с пациентами из группы ингавирина. Отмечено сокращение на 1–2 дня продолжительности симптомов заболевания (насморк, боль в горле, слабость, головная боль, лихорадка, боль в грудной клетке.) в группе, получавших аprotинин, по сравнению с пациентами в группе, получавших ингавирин. Побочных реакций и субъективных жалоб на дискомфорт от ингаляций аэрозоля аprotинина не обнаружено. Принимая во внимание необходимость этапа протеолитической активации для размножения всех штаммов вируса гриппа, ингаляционную форму аprotинина можно рекомендовать в качестве патогенетического средства для лечения гриппа, вызванного широким спектром вирусов, включая вирусы сезонного гриппа субтипов H1-N3, пандемического вируса H1N1pdm09 и вируса птичьего гриппа H7N9.

**Ключевые слова:** грипп; патогенез; аprotинин; химиопрепарат; лечение; протеолитическая активация; ОТ-ПЦР.

**Библиографическое описание:** Жирнов ОП, Бокова НО, Исаева ЕИ, Воробьева ИВ, Малышев НА. Патогенетическое лечение гриппа с помощью аэрозольной формы аprotинина, ингибитора протеаз. Биопрепараты 2015; (4): 59–64.

**Therapeutic and antiviral efficacies of inhalations of aerosolized aprotinin, a protease inhibitor, which blocks a stage of influenza virus proteolytic activation, were studied. This clinical study was performed during winter-spring outbreak caused with pandemic Influenza H1N1pdm09. Aprotinin (a natural low molecular weight antiprotease polypeptide) is known to be a chemotherapeutic antiviral drug, which inhibits influenza virus proteolytic activation accomplished by host respiratory proteases. Patients inhaled 2 aerosol doses of aprotinin (160 Kallikrein-inhibiting Units (KIU)) each 2 hours for 5 days. In comparison group, patients were treated with ingavirin (a synthetic peptidoamine with unknown antiviral target), 90 mg per day for 5 days. About 10-fold decrease of virus load in aprotinin patients were determined in comparison to ingavirin patients. Duration of clinical symptoms, such as rhinorrhea, weakness, headache, sore throat, cough, sore thorax, fever, was 1–2 days shorter in aprotinin then in ingavirin group. Side effects and patient discomfort were not revealed in aprotinin group patients. Aerosolized form of aprotinin can be recommended as a pathogenetic antiviral drug against Influenza caused by different viruses, including seasonal H1N1, H2N2, H3N2, swine-like H1N1pdm09, and avian-like H7N9 viruses.**

**Key words:** influenza; pathogenesis; aprotinin; chemotherapeutic compound; therapy; proteolytic activation; RT-PCR.

**Bibliographic description:** Zhirnov OP, Bokova NO, Isaeva EI, Vorobieva IV, Malyshev NA. Pathogenetic treatment of influenza patients with aerosolized form of aprotinin, a protease inhibitor. Biopreparation (Biopharmaceuticals) 2015; (4): 59–64.

В настоящее время существует только две группы противовирусных химиопрепаратов с идентифицированным механизмом действия, направленным на определенные этапы жизненного цикла вируса. Это препараты амантадинового ряда, ингибирующие вирусные ионные каналы M2, и структур-

ные дериваты-миметики нейраминазой кислоты, специфически связывающие и ингибирующие вирусную нейраминидазу NA [1, 2]. К первой группе относятся официальные препараты – амантадин, ремантадин, а вторую группу составляют – занамивир (реленза™), осельтамивир (тамифлю™), перамивир.

В настоящее время сформирована третья группа антигриппозных химиопрепаратов, действие которых направлено на подавление этапа протеолитической активации вируса протеазами хозяина [3–6]. К этой группе относится природный низкомолекулярный полипептид апротинин, способный блокировать протеазы, которые отвечают за активацию вируса гриппа в респираторном тракте человека [7, 8]. Это направление в химиотерапии гриппа подтверждено работами ряда лабораторий в мире [9–11].

Цель настоящего исследования состояла в изучении оптимизированной дробной многократной схемы применения противовирусного химиопрепарата нового поколения для лечения гриппа у людей и оценки лечебной и противовирусной эффективности такого способа патогенетического лечения.

В работе апробирован ингаляционный путь введения препарата апротинина в форме дозированного мелкодисперсного аэрозоля. Выбор такого пути обусловлен тем, что ингаляционные инсуффляции аэрозольного апротинина обеспечивают распределение и прямое воздействие активного вещества непосредственно в респираторном тракте – первичном очаге гриппозной инфекции. В настоящей работе проведено изучение лечебной и противовирусной активности ингаляций аэрозольного апротинина у пациентов в период зимне-осенней вспышки гриппа, вызванной преимущественно пандемическим вирусом гриппа H1N1pdm09.

## Материал и методы

**Отбор пациентов.** Исследование выполнено в период зима–осень 2013–2014 гг. в фазе подъема заболеваемости в инфекционной клинической больнице № 1 Москвы. В исследование было включено 30 больных с диагнозом при поступлении – «ОРВИ» или «грипп». Больные были разделены случайным слепым методом на 2 группы: группа А и И, получавшие препарат апротинина и ингавирин соответственно. Группа А включала 15 пациентов, у которых заболевание протекало в среднетяжелой форме, состояла из 11 мужчин и 4 женщин и имела средний возраст  $22,4 \pm 1,4$  года. Пациенты поступали на  $2,1 \pm 0,19$  день болезни (с 1 по 3 день болезни). Продолжительность госпитализации составила  $5,1 \pm 0,9$  дней (от 3 до 10 дней). Группа И включала 15 пациентов, у которых заболевание протекало в среднетяжелой форме, и состояла из 12 мужчин и 3 женщин, средний возраст в группе составлял  $28,5 \pm 3,1$  лет. Пациенты поступали на  $2,4 \pm 0,25$  день болезни (с 1 по 4 день болезни). Продолжительность госпитализации составила  $6,2 \pm 2,4$  дня (от 3 до 9 дней).

Клинический диагноз острого респираторного заболевания устанавливали на основании следующих критериев: острое начало заболевания с повышения температуры; наличие катарального синдрома (кашель, насморк, першение в горле, осиплость голоса, боли в горле и груди); синдрома интоксикации (слабость, головная боль, мышечные, суставные боли, боли в глазных яблоках); местных изменений: гиперемия слизистой ротоглотки (зернистость задней стенки глотки, увеличение миндалин).

Критериями отбора больных в исследование были: срок от начала заболевания не более 4 суток, наличие 1 или нескольких симптомов интоксикационного синдрома (слабости, озноба, головной боли, ломоты в теле, тошноты, рвоты)

в сочетании с 1 или несколькими симптомами катарального синдрома (кашля, боли в горле, насморка), а также повышение температуры тела  $\geq 37,5^\circ\text{C}$  и лабораторное подтверждение диагноза грипп методом иммунной детекции вирусных антигенов методом флюоресценции и вирусной РНК методом обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

Из исследования исключались пациенты со сроком начала заболевания более 4 суток, беременные женщины, женщины, находящиеся в периоде лактации, пациенты, принимавшие амбулаторно тамифлю™, а также больные с тяжелыми хроническими заболеваниями респираторного тракта и хронической алкогольной и наркотической интоксикацией.

Этиологию заболевания подтверждали данными ИФА-анализа по определению вирусных антигенов в мазках методом иммунной флюоресценции со специфическими антителами и данных генетического анализа методом ОТ-ПЦР по идентификации вирусных геномов в назо-фарингеальных смывах.

**Лабораторные исследования.** Всем пациентам проводилось комплексное клинико-лабораторное обследование. Лабораторные методы исследования включали: клинические анализы крови и мочи, определение антигенов вируса (гриппа, парагриппа, аденовируса, РС-вируса) методом иммунофлюоресценции (ИФ) в назо-фарингеальных мазках, а также идентификация вируса методом обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с использованием праймерных олигонуклеотидов, специфичных для геномов вируса гриппа H1N1 и H3N2.

**Схема лечения.** Группу контроля (плацебо) без специфического противовирусного лечения не формировали по этическим соображениям. Аэрозольный препарат апротинина применяли индивидуально каждым пациентом путем вдыхания 1–2 аэрозольных доз препарата через каждый носовой ход (общая разовая доза 160–320 КИЕ апротинина), каждые 2 часа в течение всего дня в течение 5 дней. Для исследования использовали ингалятор дозированного типа, содержащий в качестве активного вещества апротинин (разрешен для применения в РФ ЛСР-000280/10). В группе сравнения пациенты получали препарат Ингавирин по стандартной схеме – 90 мг ежедневно в течение 5 дней.

**Постановка ОТ-ПЦР со смывами от больных.** На 2-й день от начала лечения у всех больных брали носоглоточные смывы 2 раза в день, с интервалом в 6 часов. Назо-фарингеальные смывы (НФС) получали от больного в объеме 6–8 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), центрифугировали при 5000 об/мин при  $4^\circ\text{C}$  в течении 20 мин (центрифуга Eppendorf 5804R, ротор А-4-44). Полученные клеточные осадки суспендировали в 250 мл ФСБ, содержащем 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 100 У/мл ингибитора нуклеаз, и дезинтегрировали с помощью ультразвука на соникаторе Branson модель 450 (США) в течение 2 мин при  $0^\circ\text{C}$ . Далее 60 мкл гомогената смешивали с 260 мл лизирующего буфера для выделения РНК и последующей ОТ-ПЦР с праймерами, специфичными для вируса гриппа А и В, согласно протокола фирмы (АмплиСенс Influenza virus А-тип-FL; Россия). Реакцию ОТ-ПЦР проводили на амплификаторе Bio-Rad IQ5 (США) и количество вируса оценивали в геном-эквивалентах вирусной РНК (гэвРНК) на мл НФС, которое рассчитывали по величине пороговой Ct от относительно калибровочной пробы РНК в наборе. Для нор-

мализации показателя гЭВРНК использовали количество рибосомальной 18S РНК в НФС, которое определяли методом ПЦР в реальном времени с праймерами, специфичными для 18S РНК человека.

**Статистический анализ.** Продолжительность симптомов заболевания и значения уровней РНК в назо-фарингеальных смывах и достоверность разницы результатов ( $p$ ) оценивали с помощью критерия Стьюдента ( $t$ ) с использованием программной версии статистического анализа в программе Windows (версия 8).

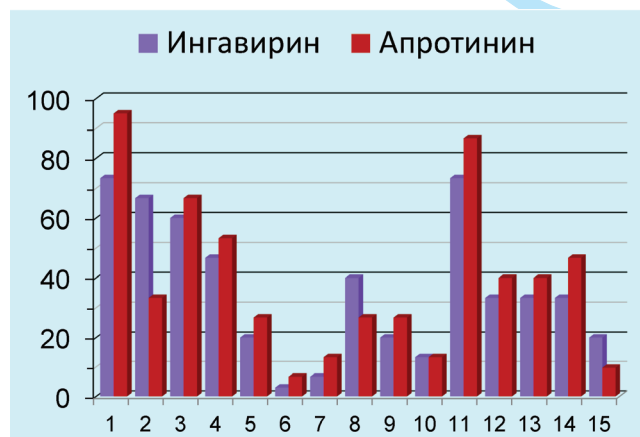
## Результаты

В исследование было отобрано 30 пациентов. При объективном осмотре выявляли признаки как катарального синдрома, такие как болезненность и першение в горле, кашель, дискомфорт в носу, насморк, осиплость голоса, боли в горле и груди; так и синдрома интоксикации, такие как головная боль, слабость, ломота. При объективном осмотре ведущими симптомами были головная боль, слабость, ломота, першение в горле, боли в горле, покашливание, осиплость голоса, боли в груди, кашель. Профиль клинических показателей был сходным до начала лечения между группами пациентов, получавших апротинин и ингавирином (рис. 1). У всех пациентов, взятых в исследование, методом ОТ-ПЦР в реальном времени был идентифицирован вирус пандемического гриппа H1N1pdm09 (H1N1).

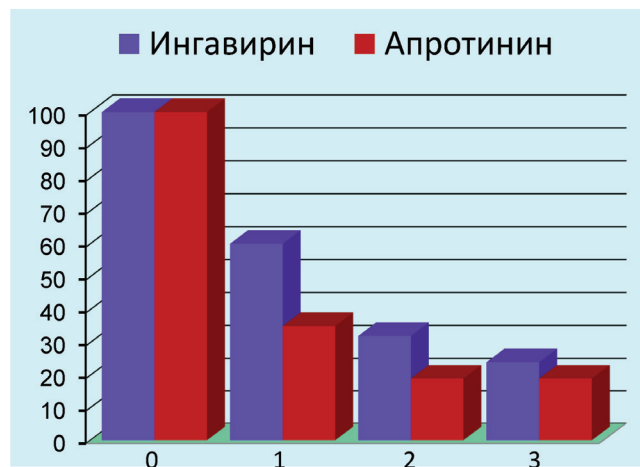
Обе группы пациентов имели также сходный профиль изменений в картине крови. По данным анализа при поступлении пациентов в стационар в группе А лейкопения отмечалась у 1 больного ( $3,6 \times 10^3/\text{мл}^3$ ), лейкоцитоз – у 3 пациентов (от  $9,4$  до  $17,9 \times 10^3/\text{мл}^3$ ), лимфоцитоз – у 3 (от 38 до 40%), тромбоцитопения – у 5 (от  $121$  до  $179 \times 10^3/\text{мл}^3$ ); в группе больных И лейкопения отмечалась у 1 больного ( $3,2 \times 10^3/\text{мл}^3$ ), лейкоцитоз – у 3 пациентов (от  $9,1$  до  $18,6 \times 10^3/\text{мл}^3$ ), лимфоцитоз – у 2 (от 38 до 40%), тромбоцитопения – у 2 (от 149 до  $174 \times 10^3/\text{мл}^3$ ).

Поступившие в исследование пациенты получали либо препарат апротинина (группа А), либо ингавирина (И). Для сравнения эффективности лечения обоими препаратами сравнивали динамику снижения температуры тела в течение лечебного курса (рис. 2). До начала лечения все пациенты в обеих группах имели лихорадку, которая характеризовалась температурой  $39,0 \pm 0,5$  и  $39,3 \pm 0,6^\circ\text{C}$  в группах А и И соответственно. Как видно на рисунке, при лечении препаратом апротинина у большей части пациентов (65%) нормализация температуры наблюдалась уже к концу первого дня лечения и дальнейшее снижение после двух дней лечения. В группе с ингавирином сходная динамика падения температуры тела наблюдалась на 1 день позднее в сравнении с пациентами в группе апротинина. У небольшой части (около 20%) в обеих группах держалась субфебрильная температура ( $37,6 \pm 0,7^\circ\text{C}$ ) до 4–5 дня лечения, что вероятно могло быть связано с присоединением вторичной нозокомиальной инфекции.

Сравнение показателей продолжительности основных симптомов заболевания в группах пациентов, получавших ингавирина и апротинина, показано на рисунке 3. Как видно на рисунке, продолжительность основных симптомов (слабость, боль в горле и груди, насморк, головная боль, повышение температуры) оказалась на 1–2 дня короче в группе с препаратом апротинина. Не отмечалось снижение продолжитель-



**Рис. 1.** Профили клинических проявлений в контрольной и испытуемой группах пациентов при поступлении в стационар. Клинические проявления оценивали при поступлении больных в стационар. Количество пациентов с определенным симптомом выражали в % по оси ординат относительно общего количества пациентов в исследуемой группе, получавших апротинин (А) или ингавирин (И), соответственно (100%). Ось абсцисс: 1 – слабость; 2 – головная боль; 3 – озноб; 4 – ломота в теле; 5 – головокружение; 6 – рвота; 7 – тошнота; 8 – боль при движении глаз; 9 – резь в глазах при взгляде на свет; 10 – слезотечение; 11 – кашель; 12 – боль в горле; 13 – боль в грудной клетке; 14 – насморк; 15 – боль в области поясницы.



**Рис. 2.** Динамика нормализации температуры тела у больных гриппом H1N1 при лечении препаратами апротинина и ингавирина. Ежедневную температуру определяли в течение всего курса лечения в стационаре. Количество пациентов, которые имели температуру тела  $37,0^\circ\text{C}$  и выше, выражали в % (ось ординат) относительно общего количества пациентов в исследуемой группе А или И, соответственно (100%). Ось абсцисс – дни от начала лечения.

ности кашля у пациентов при лечении апротинином по сравнению с ингавирином.

При наблюдении за пациентами обращали внимание на возможность возникновения побочных эффектов от приема лечебных препаратов. На протяжении всего срока пребывания в стационаре у пациентов, получавших препараты апротинина или ингавирина, не отмечалось каких-либо побочных нежелательных проявлений, таких как кожных высыпаний, раздражения слизистых, симптомов аллергии, диспепсических расстройств. Ингаляционные инсуффляции аэрозольного апротинина все больные переносили хорошо, жалоб на дискомфорт от приема препарата не было.

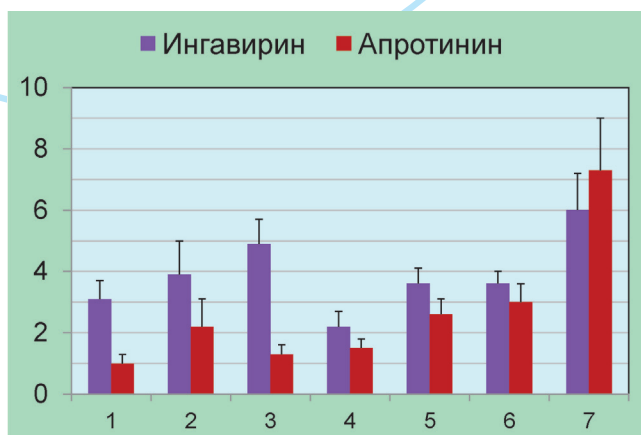


Рис. 3. Продолжительность симптомов заболевания у пациентов больных гриппом H1N1 при лечении препаратами апротинина и ингавирина.

Длительность симптома болезни выражали в днях от поступления пациента в стационар (ось ординат) с указанием величины стандартного отклонения. Ось абсцисс: 1 – боль в груди, 2 – насморк, 3 – боль в горле, 4 – головная боль, 5 – слабость, 6 – лихорадка, 7 – кашель. Достоверность разницы ( $p$ ) в значениях длительности симптомов определяли по критерию Стьюдента ( $t$ ).

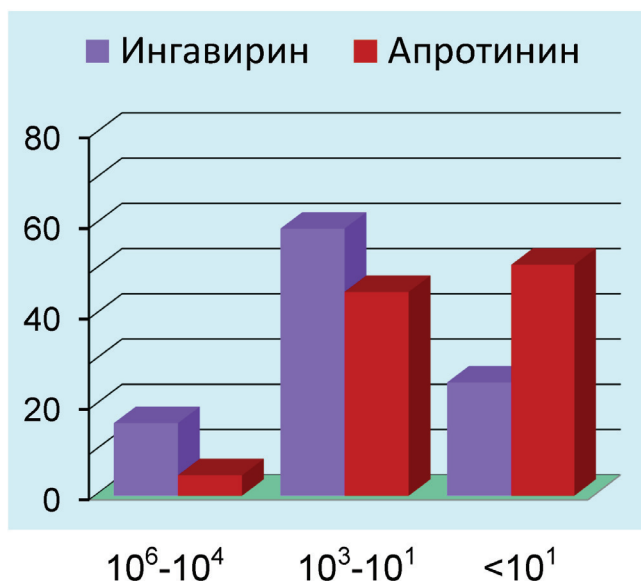


Рис. 4. Уровни вирусной нагрузки у больных гриппом H1N1 при лечении препаратами апротинина и ингавирина.

На 2-й день от начала лечения у больных дважды в день брали назо-фарингеальные смывы и определяли количество геном-эквивалентов вирусной РНК (гэвРНК) в мл смыва методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Количество смывов пациентов распределяли согласно их уровню вирусной РНК по трем количественным зонам:  $10^6-10^4$ ,  $10^3-10^1$ ,  $<10^1$  гэвРНК/мл. Количество смывов в каждой категории выражали в % от общего количества смывов (100%) в группах А или И соответственно.

Для оценки противовирусного действия аэрозольного лечения апротинином оценивали уровень вируса в носоглоточных смывах, взятых от больных на второй день после начала лечения. Из полученных смывов выделяли фракцию РНК и определяли в ней количество вирусных РНК-геном эквивалентов (гэвРНК) методом обратнo-транскриптазной ПЦР (ОТ-ПЦР) в реальном времени, используя праймеры, специфичные для генома вируса гриппа А H1N1. **Результаты, пред-**

ставленные на рисунке 4, показывают, что уровень вирусной нагрузки в носоглотке лишь у небольшой группы пациентов в обеих сравниваемых группах достигал уровня  $10^4-10^6$  гэвРНК в мл смыва, а у подавляющего числа пациентов он находился в диапазоне  $10^3$  гэвРНК/мл и ниже. Важно отметить, что уровень вирусной нагрузки в группе апротинина был заметно более низким, чем в группе пациентов с лечением ингавирином. Так, в группе апротинина доминировали пациенты с уровнем  $\leq 10$  гэвРНК/мл, тогда как в группе ингавирина преобладающая группа больных имела уровень  $10^3-10^1$  гэвРНК/мл. Средний уровень вирусной нагрузки в носоглоточных смывах у пациентов в группе апротинина был в 10 раз ниже, чем в группе ингавирина, и составляли  $(0,56 \pm 0,41) \times 10^2$  и  $(6,3 \pm 0,31) \times 10^2$  ( $p < 0,05$ ) гэвРНК в мл смыва соответственно.

### Обсуждение

Клинические исследования настоящей работы показывают лечебную и противовирусную эффективность ингаляций аэрозоля апротинина, генерированного с помощью ручного дозированного ингалятора пропеллентного типа, у пациентов при гриппе. Эти данные находятся в полном соответствии с более ранними нашими наблюдениями о положительном терапевтическом эффекте ингаляций апротинина, выполненных на ингаляторах стационарного типа, у больных при гриппе и других ОРВИ [12–15]. Эти клинические результаты коррелируют также с наблюдениями на животных, страдающих тяжелой парамиксовирусной бронхопневмонией, которая купировалась ингаляциями апротинина [16]. Полученные результаты подтверждают концепцию о направленной противовирусной химиотерапии гриппа и других респираторных вирусных инфекций ингибиторами протеаз [3, 5]. При гриппе мишенью атаки апротинина (ингибитора протеаз) служат протеазы, которые расщепляют вирусный гемагглютинин HA0 на HA1 и HA2 и активируют инфекционность вируса. Более того, апротинин купирует воспаление, которое вызывает вирус в респираторном тракте [5, 6].

Механизм противовирусного действия ингавирина представляется недостаточно ясным. Имеется ряд публикаций о лечебной эффективности ингавирина при гриппе [17, 18]. В опытах *in vitro* показана его ингибирующая активность против вирусов различных семейств, включая вирусы гриппа, аденовирусы, парагриппа и др. [19, 20]. Однако механизм столь широкой противовирусной активности пока не идентифицирован и, не исключено, что этот препарат может относиться к группе иммуномодуляторов. Ингавирин входит в список утвержденных противогриппозных средств, что определило его выбор в нашем исследовании в качестве препарата сравнения.

Терапевтический эффект в настоящей работе установлен у пациентов с гриппом при многократном суточном ингаляционном применении аэрозоля апротинина, генерируемого ручным ингалятором дозированного типа. Такой мини-ингалятор, сконструированный на основе озон-сберегающего пропеллента А-134 и технологии «модулит» и содержащий апротинин в качестве активного вещества, разрешен для применения у людей для лечения гриппа и ОРВИ [4]. Вполне очевидно, что патогенетическое лечение посредством применения апротинина в форме ручного мини-ингалятора имеет ряд преимуществ. Во-первых, такое лечение осуществля-



лось пациентами индивидуально, что важно для предотвращения кросс-контаминации, которая может иметь место в инфекционном отделении при лечении многих пациентов на одном стационарном ингаляторе. Во-вторых, частое воздействие апротинином на респираторный тракт, возможное с помощью ручного ингалятора, имеет патогенетическую целесообразность, так как способствует более полному и стабильному действию апротинина в респираторном тракте. Такой эффект связан с тем, что сурфактант, покрывающий респираторный эпителий, обменивается в течение 1–2 часов, удаляя таким образом введенный апротинин. Клиническое изучение, выполненное в настоящей работе, показывает лечебную и противовирусную эффективность, полную безвредность и отсутствие побочной токсичности при ингаляционном применении аэрозольного апротинина.

Апротинин, как известно, обладает ингибирующим действием на две важные протеазы, простазин и матрипсазу, которые участвуют в активации натриевых (Na<sup>+</sup>) ионных каналов в респираторном эпителии [21]. Такое опосредованное ингибирование каналов апротинином приводит к замедлению реадсорбции ионов натрия и жидкости эпителием респираторного тракта [22, 23] и препятствует сгущению бронхиального секрета. Ингибиторный эффект апротинина на ионные каналы позволяет также рекомендовать аэрозольную форму апротинина для лечения муковисцидоза, в основе патогенеза которого лежит чрезмерная активация ионных каналов данного класса в респираторном тракте, ведущая к сгущению бронхиального секрета [21, 23]. На этом основании аэрозольный апротинин можно рекомендовать в качестве лечебного средства у больных, страдающих муковисцидозом.

В последнее время обоснованную тревогу вызывают вирусы птичьего гриппа H7N9, которые вызвали вспышку гриппа среди людей в Китае в 2013 году с высокой летальностью, достигавшую 20–30% [24]. Благодаря мутациям в гене белка ионных каналов M2 этот вирус имел устойчивость к препаратам амантадинового ряда [25]. Однако структура гена нейраминидазы (NA) этого штамма указывала на его чувствительность к препаратам из группы ингибиторов нейраминидазы, таких как осельтамивир (тамифлю<sup>TM</sup>), занамивир (реленза<sup>TM</sup>), перамивир [24, 26]. Белок NA этого вируса имеет единичный остаток аргинина в сайте протеолитического расщепления на HA1 и HA2 [24] и активируется в респираторном тракте трансмембранными протеазами трипсинового типа, такими как TMPRSS-2, TMPRSS-4, HAT, матрипсаза [27–31]. Эти протеазы имеют высокую чувствительность к апротинину [5, 29–31] и хорошо блокируются этим ингибитором в респираторном эпителии при инфекции вирусами гриппа [5, 7, 8]. Таким образом, для эффективного патогенетического лечения гриппа, вызванного вирусом H7N9, можно рекомендовать аэрозольное применение апротинина как в форме ингаляций на стационарном ингаляторе, так и в форме ручного ингалятора дозированного типа. Ингаляционное применение апротинина будет ингибировать размножение самого вируса H7N9 и подавлять вирус-индуцированное воспаление в респираторном тракте.

Таким образом, принимая во внимание необходимость этапа протеолитической активации для размножения всех штаммов вируса гриппа, ингаляционную форму апротинина можно рекомендовать в качестве патогенетического средства для лечения гриппа, вызванного широким спектром вирусов,

включая вирусы сезонного гриппа субтипов H1-H3, пандемического вируса H1N1pdm09 и вируса птичьего гриппа H7N9.

Работа выполнена при финансовой поддержке по гранту РФФИ 13-04-01827.

Авторы выражают благодарность сотрудникам НИИ Вирусологии им. Д.И. Ивановского Т.Е. Конаковой, В.В. Сырцеву и В.П. Жирнову за техническую помощь в работе.

## Литература:

1. Das K. Antivirals targeting influenza A virus. *J Med Chem.* 2012; 55: 6263–77.
2. Lee SM, Yen HL. Targeting the host or the virus: current and novel concepts for antiviral approaches against influenza virus infection. *Antiviral Res.* 2012; 96(3): 391–404.
3. Жирнов ОП. Протеолитическая активация миксовирусов и новая стратегия в лечении вирусных заболеваний. *Вопросы вирусологии* 1983; (4): 9–21.
4. Жирнов ОП, Малышев НА. Апротинин, ингибитор протеаз, – новая альтернатива в лечении гриппа. *Русский медицинский журнал* 2012; (2): 52–6.
5. Zhirnov OP, Klenk HD, Wright PF. Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. *Antiviral Res.* 2011; 92(1): 27–36.
6. Жирнов ОП, Поярков СВ, Малышев НА. Мишени противовирусного и противовоспалительного действия апротинина: перспективы нового использования. *Пульмонология* 2009; 33(3): 27–33.
7. Zhirnov OP, Ikizler MR, Wright P. Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell-associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J Virol.* 2002; 76: 8682–9.
8. Zhirnov OP, Matrosovich TY, Matrosovich MN, Klenk HD. Aprotinin, a protease inhibitor, suppresses proteolytic activation of pandemic H1N1v influenza virus. *Antiviral Chem Chemother.* 2011; 21: 169–74.
9. Kido H, Okumura Y, Takahashi E, et al. Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1824(1): 186–94.
10. Böttcher-Friebertshäuser E, Lu Y, Meyer D, et al. Hemagglutinin activating host cell proteases provide promising drug targets for the treatment of influenza A and B virus infections. *Vaccine* 2012; 30(51): 7374–80.
11. Bertram S, Glowacka I, Steffen I, et al. Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin. *Rev Med Virol.* 2010; 20(5): 298–310.
12. Жирнов ОП, Киржнер ЛС, Овчаренко АВ, Малышев НА. Патогенетическая терапия острых респираторных заболеваний ингаляциями апротинина. *Терапевтический архив* 1995; (6): 38–42.
13. Жирнов ОП, Киржнер ЛС, Овчаренко АВ, Малышев НА. Клиническая эффективность аэрозоля апротинина при гриппе и парагриппе. *Вестник РАМН* 1996; (5): 26–31.
14. Zhirnov OP, Kirzhner LS, Ovcharenko AV, Malyshev NA. Aerosolized aprotinin is an effective drug against viral respiratory illness. *Antifungal Drug and Chemother.* 1996; 14: 209–16.
15. Жирнов ОП, Сафонова ЕА, Овчаренко АВ, Малышев НА. Терапевтическая эффективность ингаляций апротинина у больных с острой респираторной вирусной инфекцией. *Терапевтический архив* 2015 (в печати).
16. Ovcharenko AV, Zhirnov OP. Aprotinin aerosol treatment of influenza and paramyxovirus bronchopneumonia of mice. *Antiviral Res.* 1994; 23: 107–18.
17. Колобухина ЛВ, Малышев НА, Меркулова ЛН. и др. Изучение эффективности и безопасности нового противовирусного препарата Ингавирин при лечении больных гриппом. *Русский медицинский журнал* 2008; 16(22): 1502–06.
18. Колобухина ЛВ, Меркулова ЛН, Щелканов МЮ. и др. Эффективность ингавирина в лечении гриппа у взрослых. *Терапевтический архив* 2009; 81(3): 51–4.
19. Зарубаев ВВ, Слита АВ, Белявская СВ. и др. Противовирусная активность Ингавирина на модели экспериментальной диссеминированной аденовирусной инфекции у животных. *Вопросы вирусологии* 2011; (6): 23–7.
20. Зарубаев ВВ, Гаршина АВ, Калинина НА. и др. Влияние ингавирина на ультраструктурные особенности морфогенеза парагриппозной инфекции *in vitro* и *in vivo*. *Вопросы вирусологии* 2012; (5): 32–8.
21. Planès C, Caughey GH. Regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by peptidases. *Curr Top Dev Biol.* 2007; 78: 23–46.
22. Coote K, Atherton-Watson HC, Sugar R, et al. Camostat attenuates airway epithelial sodium channel function *in vivo* through the inhibition of a channel-activating protease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 329(2): 764–74.
23. Nimishakavi S, Besprozvannaya M, Raymond WW, et al. Activity and inhibition of prostatic and matrilysin on apical and basolateral surfaces of human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 303(2): L97–106.
24. Li Q, Zhou L, Zhou M, Chen Z, Li F, et al. Preliminary Report: Epidemiology of the Avian Influenza A (H7N9) Outbreak in China. *N Engl J Med.* 2013; Apr 24. PubMed PMID: 23614499.

25. Kageyama T, Fujisaki S, Takashita E, et al. Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013. *Euro Surveill.* 2013; 18(15): 20453 [PubMed].
26. Lu SH, Xi XH, Zheng YF, et al. Analysis of the clinical characteristics and treatment of two patients with avian influenza virus (H7N9). *Biosci Trends* 2013; 7(2): 109–12.
27. Beaulieu A, Gravel É, Cloutier A, et al. Matriptase proteolytically activates influenza virus and promotes multicycle replication in the human airway epithelium. *J Virol.* 2013; 87(8): 4237–51.
28. Bertram S, Glowacka I, Blazejewska P, et al. TMPRSS2 and MPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. *J Virol.* 2010; 84(19): 10016–25.
29. Böttcher E, Matrosovich T, Beyerle M, et al. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol.* 2006; 80(19): 9896–8.
30. Böttcher-Friebertshäuser E, Freuer C, Sielaff F, et al. Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. *J Virol.* 2010; 84(11): 5605–14.
31. Chaipan C, Kobasa D, Bertram S, et al. Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin. *J Virol.* 2009; 83(7): 3200–11.

## References

1. Das K. Antivirals targeting influenza A virus. *J Med Chem.* 2012; 55: 6263–77.
2. Lee SM, Yen HL. Targeting the host or the virus: current and novel concepts for antiviral approaches against influenza virus infection. *Antiviral Res.* 2012; 96(3): 391–404.
3. Zhirnov OP. Proteolytic activation of mixoviruses and a new strategy in the treatment of viral diseases. *Voprosy virusologii* 1983; (4): 9–21 (in Russian).
4. Zhirnov OP, Malyshev NA. Aprotinin, protease inhibitor, – a new alternative in the treatment of influenza. *Russkiy meditsinskiy zhurnal* 2012; (2): 52–6 (in Russian).
5. Zhirnov OP, Klenk HD, Wright PF. Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. *Antiviral Res.* 2011; 92(1): 27–36.
6. Zhirnov OP, Poyarkov SV, Malyshev NA. The targets of the antiviral and anti-inflammatory action of aprotinin: prospects for a new use. *Pulmonologiya* 2009; 33(3): 27–33 (in Russian).
7. Zhirnov OP, Ikizler MR, Wright P. Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell-associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J Virol.* 2002; 76: 8682–9.
8. Zhirnov OP, Matrosovich TY, Matrosovich MN, Klenk HD. Aprotinin, a protease inhibitor, suppresses proteolytic activation of pandemic H1N1v influenza virus. *Antiviral Chem Chemother.* 2011; 21: 169–74.
9. Kido H, Okumura Y, Takahashi E, et al. Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1824(1): 186–94.
10. Böttcher-Friebertshäuser E, Lu Y, Meyer D, et al. Hemagglutinin activating host cell proteases provide promising drug targets for the treatment of influenza A and B virus infections. *Vaccine* 2012; 30(51): 7374–80.
11. Bertram S, Glowacka I, Steffen I, et al. Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin. *Rev Med Virol.* 2010; 20(5): 298–310.
12. Zhirnov OP, Kirzhner LS, Ovcharenko AV, Malyshev NA. Pathogenetic therapy of acute respiratory infections inhalations of aprotinin. *Terapevticheskiy arhiv* 1995; (6): 38–42 (in Russian).
13. Zhirnov OP, Kirzhner LS, Ovcharenko AV, Malyshev NA. The clinical efficacy of aprotinin aerosol in influenza and parainfluenza. *Vestnik RAMN* 1996; (5): 26–31 (in Russian).
14. Zhirnov OP, Kirzhner LS, Ovcharenko AV, Malyshev NA. Aerosolized aprotinin is an effective drug against viral respiratory illness. *Antifungal Drug and Chemother.* 1996; 14: 209–16.
15. Zhirnov OP, Safonova EA, Ovcharenko AV, Malyshev NA. Therapeutic efficacy of aprotinin inhalations in patients with acute respiratory viral infection. *Terapevticheskiy arhiv* 2015 (in print) (in Russian).
16. Ovcharenko AV, Zhirnov OP. Aprotinin aerosol treatment of influenza and parainfluenza bronchopneumonia of mice. *Antiviral Res.* 1994; 23: 107–18.
17. Kolobuhina LV, Malyshev NA, Merkulova LN, et al. The study of the efficacy and safety of a new antiviral drug Ingavirin in the treatment of influenza. *Russkiy meditsinskiy zhurnal* 2008; 16(22): 1502–06 (in Russian).
18. Kolobuhina LV, Merkulova LN, Schelkanov MYu, et al. Efficiency of Ingavirin in the treatment of influenza in adults. *Terapevticheskiy arhiv* 2009; 81(3): 51–4 (in Russian).

19. Zarubaev VV, Slita AV, Belyavskaya SV, et al. Antiviral activity of Ingavirin in experimental model of disseminated adenovirus infection in animals. *Voprosy virusologii* 2011; (6): 23–27 (in Russian).
20. Zarubaev VV, Garshina AV, Kalinina NA, et al. Effect of Ingavirin on ultrastructural features morphogenesis of parainfluenza infection in vitro and in vivo. *Voprosy virusologii* 2012; (5): 32–38 (in Russian).
21. Planès C, Caughey GH. Regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by peptidases. *Curr Top Dev Biol.* 2007; 78: 23–46.
22. Coote K, Atherton-Watson HC, Sugar R, et al. Camostat attenuates airway epithelial sodium channel function in vivo through the inhibition of a channel-activating protease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 329(2): 764–74.
23. Nimishakavi S, Besprozvannaya M, Raymond WW, et al. Activity and inhibition of prostatic and matriptase on apical and basolateral surfaces of human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 303(2): L97–106.
24. Li Q, Zhou L, Zhou M, Chen Z, Li F, et al. Preliminary Report: Epidemiology of the Avian Influenza A (H7N9) Outbreak in China. *N Engl J Med.* 2013; Apr 24. PubMed PMID: 23614499.
25. Kageyama T, Fujisaki S, Takashita E, et al. Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013. *Euro Surveill.* 2013; 18(15): 20453 [PubMed].
26. Lu SH, Xi XH, Zheng YF, et al. Analysis of the clinical characteristics and treatment of two patients with avian influenza virus (H7N9). *Biosci Trends* 2013; 7(2): 109–12.
27. Beaulieu A, Gravel É, Cloutier A, et al. Matriptase proteolytically activates influenza virus and promotes multicycle replication in the human airway epithelium. *J Virol.* 2013; 87(8): 4237–51.
28. Bertram S, Glowacka I, Blazejewska P, et al. TMPRSS2 and MPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. *J Virol.* 2010; 84(19): 10016–25.
29. Böttcher E, Matrosovich T, Beyerle M, et al. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol.* 2006; 80(19): 9896–8.
30. Böttcher-Friebertshäuser E, Freuer C, Sielaff F, et al. Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. *J Virol.* 2010; 84(11): 5605–14.
31. Chaipan C, Kobasa D, Bertram S, et al. Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin. *J Virol.* 2009; 83(7): 3200–11.

## Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16.

Жирнов О.П. Руководитель лаборатории, д-р биол. наук, профессор.

Исаева Е.И. Старший научный сотрудник, канд. мед. наук.

Воробьева И.В. Старший научный сотрудник, канд. мед. наук.

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы». Российская Федерация, 125367, Москва, Волоколамское шоссе, 63.

Боккова Н.О. Научный сотрудник, канд. мед. наук.

Малышев Н.А. Главный врач, д-р мед. наук, профессор.

## Authors:

Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 16 Gamaleya Street, Moscow, 123098, Russian Federation.

Zhirnov OP. Head of Laboratory. Doctor of Biological Sciences, professor.

Isaeva EI. Senior Resercher, Candidate of Medical Sciences

Vorobieva IV. Senior Resercher, Candidate of Medical Sciences.

State Budgetary Institution of Health «Infectious Clinical Hospital № 1 of the Department of Health in Moscow», 63 Volokolamskoe Highway, Moscow, 125367, Russian Federation.

Bokova NO. Resercher, Candidate of Medical Sciences

Malyshev NA. Head physician. Doctor of Medical Sciences, professor.

Адрес для переписки: Жирнов Олег Петрович; zhirnov@inbox.ru

Поступила 02.11.2015 г.

Принята 06.11.2015 г.