

**Aripiprazol** als Kandidat für die Behandlung von COVID-19 durch Genomanalyse identifiziert

**Hintergrund:** Antipsychotika modulieren die Expression von Entzündungszytokinen und induzierbaren Entzündungsenzymen. Elopiprazol (ein Phenylpiperazin-Antipsychotikum in Phase 1) wurde in einer Repurposing-Studie als therapeutisches Mittel zur Behandlung der SARS-CoV-2-Infektion charakterisiert. Wir wollen die möglichen Auswirkungen von Aripiprazol (ein von der FDA zugelassenes Phenylpiperazin) auf COVID-19-bezogene immunologische Parameter untersuchen.

**Methoden:** Es wurden differenzielle Genexpressionsprofile von RNA-Seq-Proben von Nicht-COVID-19-Patienten im Vergleich zu COVID-19-Patienten (Projekt CRA002390 in der GSA-Datenbank) und medikamenten-naiven Patienten mit nicht-affektiver Psychose zu Beginn und nach dreimonatiger Aripiprazol-Behandlung ermittelt. Es wurde eine integrative transkriptomische Analyse der Auswirkungen von Aripiprazol auf differentiell exprimierte Gene bei COVID-19-Patienten durchgeführt.

**Die Ergebnisse:** Bei 82 der 377 Gene (21,7 %), deren Expression durch Aripiprazol signifikant verändert wurde, ist die Expression auch bei COVID-19-Patienten verändert, und bei 93,9 % dieser Gene kehrt sich die Expression durch Aripiprazol um. Die Zahl der gemeinsamen Gene, deren Expression in beiden Analysen verändert ist, ist signifikant höher als erwartet (Fisher's Exact Test, two tail; p value =  $3.2e-11$ ). 11 KEGG-Pfade waren sowohl bei COVID-19-Patienten als auch bei mit Aripiprazol behandelten Patienten mit nicht-affektiver Psychose signifikant mit Genen mit veränderter Expression angereichert (p adj < 0,05). Die signifikantesten Pfade standen im Zusammenhang mit Immunreaktionen und Mechanismen der durch Hyperinflammation ausgelösten Pathologie (d. h. "entzündliche Darmerkrankungen" (der signifikanteste Pfad mit einem p adj von 0,00021), "Th1- und Th2-Zelldifferenzierung" und "B-Zell-Rezeptor-Signalweg"), die auch mit dem klinischen Ergebnis von COVID-19 in Verbindung gebracht wurden.

**Interpretation:** Diese explorative Untersuchung könnte die Annahme weiter untermauern, dass Aripiprazol (Phenylpiperazin) eine schützende Wirkung ausübt, indem es die Expression von Genen moduliert, die sich bei COVID-19-Patienten als verändert erwiesen haben. Neben vielen laufenden Studien und klinischen Versuchen könnte die Umwidmung verfügbarer Medikamente bei der Bekämpfung von SARS-CoV-2-Infektionen von Nutzen sein, erfordert aber weitere Studien und Versuche.

## Einleitung

Die SARS-CoV-2-Epidemie ist heute die größte Herausforderung für die Medizin. Die infizierten Patienten weisen ein breites Spektrum klinischer Schweregrade auf, das von asymptomatischen bis hin zu tödlichen Zuständen reicht (Wu et al., 2020). Fortgeschrittenes Alter, Geschlecht (männlich) und Begleiterkrankungen (Diabetes, Herz-Kreislauf- oder chronische Atemwegserkrankungen) sind Risikofaktoren für einen höheren klinischen Schweregrad, eine höhere Hospitalisierungsrate und einen höheren Tod durch COVID-19 (Rubino et al., 2020; Zhou et al., 2020). Das Vorhandensein dieser Komorbiditäten kann die Widerstandsfähigkeit und die Fähigkeit, einen zusätzlichen Zytokinsturm zu tolerieren, verringern (Mangalmurti und Hunter, 2020).

COVID-19-Individuen, die kritisch und tödlich erkranken, scheinen eine wahllose und außer Kontrolle geratene Immunreaktion mit einer unkontrollierten systemischen Überproduktion von Zytokinen und einem immunologischen Ungleichgewicht zu erleben (Bhaskar et al., 2020; Manjili et al., 2020; Zeng et al., 2020). Die mit COVID-19 verbundene Immunpathogenese wird nicht nur als aufkommender Zytokinsturm verstanden, sondern auch als Beeinträchtigung der schützenden T-Zell-Immunität (Chen et al., 2020).

Es gibt keine von der FDA zugelassenen antiviralen Mittel oder Impfstoffe für Coronaviren, auch nicht für SARS-CoV-2, und die derzeitigen Behandlungsmöglichkeiten für COVID-19 beschränken sich auf unterstützende Therapien und den Off-Label-Einsatz von FDA-zugelassenen Medikamenten. Es hat sich gezeigt, dass entzündungshemmende Medikamente wie Dexamethason die Zahl der Todesfälle verringern (Vabret et al., 2020). Die entscheidende Rolle der NLRP3-Inflammasom-Aktivierung bei der Pathogenese der durch SARS-CoV verursachten Krankheiten lenkt die Aufmerksamkeit auch auf die potenzielle Rolle seiner Inhibitoren bei der Behandlung von COVID-19 (van den Berg und Te Velde, 2020). Eine breite Palette verschiedener Medikamentenklassen, wie Krebstherapeutika, Antipsychotika und Malariamittel, scheint eine positive Wirkung gegen MERS- und SARS-Coronaviren zu haben (Dyall et al., 2017). Weston et al. (2020) beobachteten, dass Chlorpromazin (ein typisches Antipsychotikum) und Chloroquin Mäuse vor schweren klinischen Erkrankungen durch SARS-CoV schützen, obwohl die Infektion nicht verhindert werden kann. Clozapin (atypisches Antipsychotikum) hat sich als wirksam bei der Unterdrückung der Expression proinflammatorischer Zytokine erwiesen, indem es die NLRP3-Inflammasom-Aktivierung in vitro begrenzt (Giridharan et al., 2020). Auf der gleichen Linie wie oben analysierten Riva und Kollegen (2020) etwa 12.000 Medikamente in der klinischen Phase oder von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassene kleine Moleküle, um Kandidaten für die Behandlung von COVID-19 zu identifizieren, und berichteten, dass Elopiprazol (ein nie vermarktetes Phenylpiperazin-Antipsychotikum) unter den 21 wirksamsten Verbindungen zur Hemmung der SARS-CoV-Infektion aufgeführt war. Phenylpiperazin-Derivate hatten ihren Nutzen als wirksame Quelle für antivirale Verbindungen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zur Behandlung von humanen Adenoviren und Cytomegaloviren (DNA-Viren) unter Beweis gestellt (Sanchez-Cespedes et al., 2016).

Antipsychotika unterdrücken die Expression von Entzündungszytokinen und induzierbaren Entzündungsenzymen (z. B. Cyclooxygenase) sowie die Mikroglia-Aktivierung (Dinesh et al., 2020). Diese entzündungshemmenden Wirkungen werden durch die Verringerung der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, die Modulation der Reaktion von Monozyten durch TLR und die Hemmung der Mikroglia-Aktivierung durch die Verringerung der Spiegel von induzierbarer Stickoxid-Synthase (iNOS), IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  hervorgerufen (Kato et al., 2007; Obuchowicz et al., 2017). Beim Menschen wurde die immunmodulatorische Wirkung von Risperidon (Pyridopyrimidine) und Aripiprazol (vermarktetes Phenylpiperazin) nachgewiesen (Juncal-Ruiz et al., 2018), wobei Aripiprazol eine stärkere entzündungshemmende Wirkung auf TNF- $\alpha$ , IL-13, IL-17 $\alpha$  und Fraktalkin zeigte. Somit ist die schützende Wirkung von Phenylpiperazin vermarkteten Antipsychotika (Aripiprazol) gegen einen perniziösen Zytokinsturm eine Hypothese, die weitere Untersuchungen rechtfertigt, mit dem Ziel, neue Off-Label-Medikamente für den Einsatz bei schweren COVID19-Patienten zu entdecken.

Prävalenz und Schweregrad der COVID-19-Infektion bei Patienten mit schweren psychischen Störungen haben zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt, was wahrscheinlich auf Unterschiede in der Methodik dieser Untersuchungen zurückzuführen ist. Lee und Mitarbeiter (2020) berichteten, dass die Diagnose einer psychischen Störung nicht mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer SARS-CoV-Infektion, sondern mit einem leicht erhöhten Risiko für schwere klinische Folgen verbunden war (Lee et al., 2020). Wang und Kollegen (2021) berichteten über ein höheres Gesamtrisiko für eine Infektion bei Schizophrenie-Patienten. In einer retrospektiven epidemiologischen Studie beobachteten wir, dass gefährdete Personen mit schweren psychischen Störungen, die langwirksame injizierbare Antipsychotika einnahmen, ein geringeres Risiko für eine SARS-CoV2-Infektion und ein besseres Ergebnis nach der Infektion hatten (unveröffentlichte Daten).

Ziel der vorliegenden Studie war es, die möglichen positiven Auswirkungen von Aripiprazol (Antipsychotikum) bei einer COVID-19-Infektion zu untersuchen, indem: 1.- Analyse des Profils

der Genexpression bei arzneimittel-naiven Patienten mit Psychose zu Beginn und nach dreimonatiger Behandlung mit Aripiprazol (PAFIP-Probe); und 2.- Vergleich der Gruppe von Genen mit veränderter Expression bei COVID-19-Patienten (Wuhan-Probe) mit der Gruppe von Genen, die durch Aripiprazol bei arzneimittel-naiven Schizophrenie-Patienten moduliert werden.

## Materialien und Methoden

### PAFIP-Kohorte von Aripiprazol-behandelten Patienten

#### Untersuchungsrahmen und Stichprobe

Die Kohorte, die zur Untersuchung der Wirkung von Aripiprazol analysiert wurde, wurde am Universitätskrankenhaus Marques de Valdecilla (Kantabrien, Spanien) gewonnen. Die Studie entsprach den internationalen Standards für Forschungsethik und wurde vom Institutional Review Board (IRB) von Kantabrien ethisch genehmigt. Die Patienten, die die Einschlusskriterien für eine erste Episode einer nicht affektiven Psychose erfüllten (drogen-naiv), gaben eine schriftliche Einverständniserklärung ab, um in die Studie aufgenommen zu werden. Nach der Unterzeichnung der Einverständniserklärung wurden die Patienten in eine prospektive, randomisierte, flexibel dosierte, offene Studie aufgenommen (Crespo-Facorro et al., 2017; Mayoral Van-Son et al., 2021).

#### Laboruntersuchungen

Blutproben wurden von 57 nüchternen Probanden mit nicht affektiver Psychose (25 Männer und 32 Frauen; Durchschnittsalter 31,54 Jahre) zwischen 8:00 und 10:00 Uhr von denselben Mitarbeitern und in derselben Umgebung entnommen. Eine ausführliche Beschreibung der Methodik zur Bewertung der biochemischen Variablen ist auf Anfrage bei den Autoren erhältlich. Keiner der Patienten litt an einer chronischen Entzündung oder Infektion oder nahm Medikamente ein, die die Ergebnisse der Blutuntersuchungen beeinflussen könnten.

#### RNA-Extraktion

Die Gesamt-RNA wurde mit dem Tempus™ Blood RNA Tube und dem Tempus™ Spin RNA Isolation Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) gemäß den Herstellerprotokollen aus dem Blut extrahiert. Um nur qualitativ hochwertige RNA auszuwählen, wurde die RNA-Integritätszahl (RIN) mit einem Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) charakterisiert, und es wurden Proben mit einer RIN von mindestens 7,6 verwendet.

#### RNA-Next-Generation-Sequenzierung

Die Gesamt-RNA wurde aus dem peripheren Blut der einzelnen Personen extrahiert. Die aus dem Blut gewonnene Boten-RNA (mRNA) wurde am Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG) mit Illumina HiSeq-Instrumenten (San Diego, CA, USA) sequenziert. Die mRNA wurde aus der Gesamt-RNA isoliert und nach der Umwandlung in komplementäre DNA (cDNA) fragmentiert. Fragmente von durchschnittlich 300 bp wurden ausgewählt, um die cDNA-Bibliotheken für die Sequenzierung zu erstellen. Es wurden paarweise Sequenzen von 70 Nukleotiden für jedes Ende hergestellt. Die mRNA aus Blutproben von 57 arzneimittel-naiven, nicht affektiven Psychose-Patienten zu Beginn und nach 3 Monaten kontinuierlicher Behandlung mit Aripiprazol wurde sequenziert.

Die Sequenzdateien wurden mit dem STAR Aligner (Harrow et al., 2012; Dobin et al., 2013) an das menschliche Referenzgenom GRCh38 (Gencode Release 25) angeglichen. Die Anzahl der Reads wurde mit dem Voom-Algorithmus unter Verwendung der zyklischen Löss-Methode (Law et al., 2014) normalisiert und signifikante Veränderungen der Genexpression zwischen behandelten und naiven Patienten wurden mit Lima (Smyth et al., 2005) identifiziert. Wir führten eine gepaarte Analyse mit einem Wald-Test und einem parametrischen Fit-Typ mit einem angepassten p-Wert-Cutoff von 0,01 durch.

#### Wuhan COVID19-Datensatz

COVID-Daten wurden vom GSA-Server (Wang et al., 2017) mit der Kennung CRA002390 (Xiong et al., 2020) heruntergeladen. Im Rahmen dieser Forschung wurden RNA-Seq-Proben von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) von drei COVID-19-Patienten (alle waren männlich; Durchschnittsalter 45,3 Jahre) und drei gesunden Spendern am Zhongnan Hospital der Universität Wuhan gesammelt, die in die vorliegende Studie einbezogen wurden. Diese Daten wurden mit der RaNA-Seq (Prieto und Barrios, 2020) Cloud-Plattform analysiert, und die Gene mit differentieller Expression wurden mit Hilfe der DESeq2 (Love et al., 2014) Cloud unter Verwendung eines Wald-Tests, eines parametrischen Fit-Typs und eines bereinigten p-Wert-Cutoff von 0,01 ermittelt.  
Statistische und bioinformatische Analyse

Die statistische Signifikanz des gemeinsamen Auftretens differentieller Expression zwischen COVID-19- und Aripiprazol-Studien wurde mit einem exakten Fisher-Test berechnet. Funktionelle Anreicherungsanalysen zur Identifizierung von biologischen Pfaden in der Biosystem-Datenbank (heruntergeladen im Januar 2020) (Geer et al., 2010) mit einer signifikanten Präsenz von differentiell exprimierten Genen wurden mit einem exakten Fisher-Test durchgeführt. Für die Darstellung und Analyse der molekularen Netzwerke wurde KEGG verwendet (Kanehisa et al., 2010). Die Visualisierung und endgültige Darstellung der Pfade wurde mit dem R-Paket pathview (Luo und Brouwer, 2013) durchgeführt.  
Ergebnisse

Integrative transkriptomische Analysen der Auswirkungen von Aripiprazol auf differentiell exprimierte Gene bei COVID-19-Patienten:  
COVID-19-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern (Wuhan-Probe)

Wir fanden 2.137 Gene mit signifikanter differentieller Expression zwischen COVID-19-Patienten und Kontrollen ( $p$  adj. Wert  $< 0,05$ ) (ergänzende Tabelle S1). Das signifikanteste Gen war das Charcot-Leyden-Kristall-Galektin-Gen (CLC) mit einem  $p$  adj.-Wert von  $7,8e-23$ .  
Medikamenten-naive Patienten mit nicht-affektiver Psychose zu Beginn und nach 3 Monaten Aripiprazol-Behandlung (PAFIP-Stichprobe)

Wir fanden 377 Gene mit signifikanter differentieller Expression vor und nach der Medikation ( $p$  adj.-Wert  $< 0,05$ ) (ergänzende Tabelle S2). Die beiden signifikantesten Gene waren die LIM-Domäne 4 (LMO4) und die ATP-bindende Kasette Unterfamilie A Mitglied 9 (ABCA9) mit einem  $p$  adj. Wert von 0,0039.  
Unterschiedliche Genexpression zwischen COVID

**Übersetzung durch <https://www.deepl.com/de/translator>**