

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192687 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.02.09(22) Дата подачи заявки
2020.05.07(51) Int. Cl. A61K 9/12 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 38/08 (2019.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ДАЛАРГИНА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ОРВИ И ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ РАЗВИТИЯ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ОРВИ

(31) EP20173355

(32) 2020.05.06

(33) EP

(86) PCT/IB2020/054342

(87) WO 2021/224664 2021.11.11

(71) Заявитель:

ПИВИПИ ЛАБС ПТЕ. ЛТД (SG)

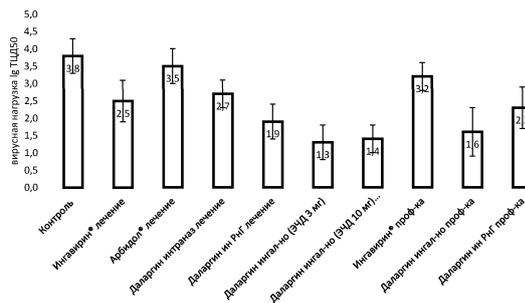
(72) Изобретатель:

Черторижский Евгений
Александрович, Косоруков Вячеслав
Станиславович, Клейменов Алексей
Викторович, Мельников Геннадий
Дмитриевич (RU)

(74) Представитель:

Сагитов В.Р. (RU)

(57) Изобретение относится к области фармацевтики и медицины и касается применения раствора даларгина в виде спрея для орошения полости рта или носоглотки и в виде ингаляций с помощью небулайзера для предупреждения заболевания ОРВИ и/или предотвращения развития их осложнений, особенно при начале заболевания. Изобретение состоит в применении даларгина в виде спрея и/или ингаляционной формы для профилактики ОРВИ или предотвращения развития их осложнений. Изобретение расширяет арсенал технических средств ингаляционной терапии для профилактики ОРВИ или предотвращения развития осложнений.



A1

202192687

202192687

A1

Применение даларгина для профилактики ОРВИ и предотвращения развития осложнений при заболеваниях ОРВИ

Область техники

Изобретение относится к области фармацевтики и медицины и касается применения раствора даларгина в виде спрея для орошения полости рта и/или носоглотки и в виде ингаляций с помощью небулайзера для предупреждения заболевания ОРВИ и/или предотвращения развития их осложнений, особенно при начале заболевания.

Уровень техники

В настоящее время наибольшую распространенность занимают острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ), на долю которых приходится более 90% всех инфекционных заболеваний [1, 2]. Практически ежегодно протекают эпидемии гриппа, в течение которых инфекция поражает примерно 5–15% населения. По данным ВОЗ только гриппом ежегодно заболевают около 1 млрд. человек, 3-5 миллионов в тяжелой форме и 290 000 – 650 000 человек умирают от респираторных заболеваний, вызванных гриппом. Социальное бремя ОРВИ характеризуется прежде всего высокими непрямыми затратами, такими как затраты за период отсутствия на рабочем месте, экономическими потерями от снижения производительности труда, стоимостью времени отсутствия на рабочем месте членов семьи, ухаживающих за больным (в США экономические потери, обусловленные только временной нетрудоспособностью, оцениваются в 232 млн долл.) [3, 2]. При этом в среднем в мире на лечение больных ОРВИ и гриппом тратится около 14,6 млрд. долларов США.

Для России эта проблема более чем актуальна в связи с географическими и климатическими особенностями. В России каждый год регистрируется от 27,3 до 41,2 млн. случаев респираторных инфекций. ОРВИ имеют высокий удельный вес в структуре общей заболеваемости, на них приходится почти 40% дней нетрудоспособности [2, 4]. В частности, грипп характеризуется сравнительно

частым развитием тяжёлых осложнений, частым поражением нижних дыхательных путей с развитием прогрессирующей пневмонии и острого респираторного дисстресс-синдрома (ОРДС) как у детей и лиц молодого, так и среднего и пожилого возраста. Например, практически во всех странах мира среди больных гриппом А/Н1N1/09, госпитализированных в стационар, основной проблемой являлась прогрессирующая острая дыхательная недостаточность (ОДН): пневмония была диагностирована у 40-100% больных, а ОРДС – у 10-56% больных [5]. Смертность от различных типов ОРВИ может достигать 0,05-5%, а для отдельных типов возбудителей и более.

Эти цифры говорят о тяжелом бремени различных типов ОРВИ и их серьезных социально-экономических последствиях для мира. Они убеждают в важности защиты населения во время сезонных эпидемий ОРВИ, а также в необходимости иметь способы противовирусной терапии, подходящие для максимально широкого круга вирусных возбудителей. Таким образом, недопущение распространения данной группы заболеваний является важной задачей, стоящей перед любой страной.

ОРВИ характеризуется широким разнообразием вирусов, вызывающих гриппоподобные заболевания, включающим более 200 диагностируемых видов. К наиболее распространенным возбудителям относятся: риновирусы, вирусы гриппа, парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), коронавирусы, метапневмовирусы, бокавирусы и аденовирусы [2, 6].

Довольно часто, особенно у пациентов с ослабленной иммунной системой и при наличии сопутствующих заболеваний, ОРВИ могут иметь тяжелое течение. Одним из проявлений тяжелого протекания ОРВИ является развитие пневмонии, в частности, в виде острого респираторного дисстресс-синдрома. [7].

При ОРВИ различных типов обостряются имеющиеся хронические заболевания, кроме этого, ОРВИ имеют обширный список возможных осложнений:

Лёгочные осложнения (пневмония, бронхит, ОРДС);

Осложнения со стороны верхних дыхательных путей и ЛОР-органов (отит, синусит, ринит, трахеит);

Осложнения со стороны сердечно-сосудистой системы (миокардит, перикардит);

Осложнения со стороны нервной системы (менингит, менингоэнцефалит, энцефалит, невралгии, полирадикулоневриты);

вторичная инфекция;

острая почечная недостаточность, от 14 % до 53 %;

септический шок, от 4 % до 8 %;

кардиомиопатии, у 33 % критических;

поражение отделов кишечного тракта.

Как правило, развитие осложнений радикально меняет терапию заболевания и серьезно ее усложняет. Так, например, среди пациентов, заболевших коронавирусной инфекцией 2019 (COVID19) в тяжелой форме с терапией аппаратами искусственной вентиляции легких смертность достигает 70-80%, хотя при поступлении в стационар они имели легкую и среднюю формы течения без серьезного поражения легких. Лечение пневмонии существующими методами и протоколами достаточно малоэффективно. Поэтому самым правильным путем борьбы с заболеванием является предотвращение развития осложнений на самых ранних стадиях или предотвращение заражения как такового.

Для того, чтобы предотвратить развитие осложнений и смерть пациентов, исключительно важно своевременно проводить противовирусную профилактику для предотвращения возможности заражения и развития заболевания, а также

профилактически обеспечивать предотвращение прогрессии заболевания в сторону развития осложнений всех типов.

На сегодняшний день в профилактике вирусных заболеваний используют следующие подходы.

а) Вакцины. В обычной практике предотвращения ОРВИ данный подход применяют, как правило, только в отношении гриппа. Для большинства других типов вирусов, вызывающих ОРВИ, вакцинация имеет немного смысла в силу существования определенного иммунитета с детских лет, легкого течения заболевания или отсутствия иммуногенной протективной вакцины как таковой. В профилактическом порядке проводится вакцинация населения комплексными вакцинами против вируса гриппа, основанных на рекомендациях ВОЗ о предполагаемых серотипах гриппа, которые будут активны в предстоящем сезоне. Эффективность прививки от гриппа составляет 75-90 %.

Вакцинация особенно важна для людей, подвергающихся высокому риску развития осложнений, а также для тех, кто проживает с людьми из группы высокого риска или осуществляющих уход за ними.

С другой стороны, вакцинация как метод предотвращения заболеваемости населения, в частности, гриппом имеет определенные недостатки:

- Вакцинация не дает абсолютных гарантий, что заболевания удастся избежать, что тип гриппа в данном году будет соответствовать предсказанному, а прививки от гриппа действуют только 1 год.

- Вакцинация против гриппа подходит не всем. Если у человека аллергия на куриный белок или проявлялись, аллергические реакции на ранее вводимые гриппозные вакцины, то прививка от гриппа противопоказана.

- В случае уже начавшейся эпидемии или пандемии гриппа часто нет достаточного времени для формирования полноценного иммунного ответа на введение вакцины, что значительно снижает эффект от нее в популяции.

- В отношении более широкого спектра возбудителей ОРВИ вакцинация как метод менее эффективна, так как против большинства возбудителей вакцины просто нет или она быстро становится не актуальной вследствие достаточно высокой изменчивости коровых белков вирусов.

б) Иммуномодуляторы. Другим подходом является профилактика ОРВИ путем приема различных вариантов иммуномодуляторов. К ним относятся препараты тимуса, интерлейкины, интерфероны, биологически активные пептиды, полисахариды некоторых грибов, лечебные вакцины. Их активность обусловлена способностью воздействовать на метаболизм клеток и тканей организма, активировать иммунокомпетентные клетки. Данная фармакологическая группа исключительно разнообразна и включает в себя несколько групп: интерлейкины, интерфероны, индукторы интерферонов и другие иммуномодуляторы.

Интерлейкины и интерфероны являются препаратами на основе эндогенных белков полученных биотехнологическим методом: Лейкоцитарный человеческий интерферон, Эгиферон, препараты групп Альфа интерферонов (реаферон, роферон, интрон-А, инрек, виферон, реальдирон, берафор, эгиферон, велферон) , Бета-интерфероны (бетасерон, фрон, бетаферон, ребиф, биоферон, авонекс), Гамма-интерфероны. Спектр применения данных препаратов достаточно широк – они эффективны против вирусов гриппа и других респираторных заболеваний, гепатита В и С, ЦМВ, кори, СПИДа. Эта группа препаратов в некоторых случаях оказывается достаточно эффективными. Однако недостатком является часто неоднозначность реакций и большое количество побочных эффектов: могут возникать лихорадка, головная боль, миалгия, артралгия, анафилаксия, снижение артериального давления, тахикардия и тд.

Интерлейкины и интерфероны должны применяться под наблюдением врача и не могут быть применимы в режиме профилактики.

В профилактике ОРВИ используют иммуностимулирующие препараты групп "индукторы интерферонов" и "другие иммуномодуляторы" обычно иммуностимулирующего и иммуномодулирующего действия. Среди пероральных форм можно назвать Кагоцел, Арбидол, Ингавирин, Амиксин, Гропринозин. Среди инъекционных – экстракты вилочковой железы (Тимоптин, Тактивин, Тималин), Полиоксидоний, Тимоген, Иммунофан, Неовир, Циклоферон.

Положительное действие многих таких лекарств объясняется повышением общей сопротивляемости организма, его неспецифического иммунитета или активацией отдельных типов иммунных клеток, а также активацией специфических иммунных реакций. Данные препараты позиционируются как профилактические и противовирусные. Однако, эффективность большинства иммуностимулирующих препаратов сравнительно невысока и в корректных экспериментах на животных по исследованию протективного действия на животных моделях летальных вирусных заражений препараты данной группы не показывают значительного превышения контрольных значений в 30%, в сравнении со специфическими препаратами, такими как ингибиторы нейраминидазы гриппа, у которых протекция составляет 70% и более. При этом в клинических исследованиях они показывают эффективность, незначительно превышающую контрольные группы без лечения и лечения стандартными терапевтическими методами, что вызывает большое количество критики в их адрес.

Химические противовирусные препараты для вируса гриппа – ингибиторы нейраминидазы, осельтамивир (Тамифлю) и занамивир (Реленза) для профилактики не используют в силу наличия побочных эффектов.

Важным моментом в динамике развития заболевания является переход от фазы заражения и закрепления вирусного патогена на слизистых оболочках горла к опусканию заболевания в бронхи и трахеи и развития тяжелой формы течения заболевания. В данный период появляются первые клинические

проявления, такие как кашель, повышение температуры, ринит и др. Как правило, переход ОРВИ в тяжелую форму означает низкий шанс на эффективное излечение без долговременных повреждений легкого и других органов. Естественным образом пациенты в тяжелой форме течения заболевания несут основной риск смертности. Для предотвращения развития тяжелых осложнений ОРВИ применяют несколько подходов:

Применяют противовирусные препараты, в частности, для вируса гриппа – ингибиторы нейраминидазы, осельтамивир (Тамифлю) и занамивир (Реленза). С учетом частого присоединения бактериальной флоры проводится антибактериальная терапия, причем выбор антибиотика производится с учетом состояния пациента [8].

Для местного воздействия непосредственно на легочную ткань используют растворы лекарственных препаратов, доставляемых с помощью небулайзера, например, ингаляции бронхолитиков и противовоспалительных препаратов [9].

Однако описанные методы лечения имеют свои ограничения. Таргетные противовирусные препараты являются химическими агентами, специфически ингибирующими определенные стадии в размножении вирусов, как правило, достаточно узкого круга. Противовоспалительные препараты и бронхолитики улучшают качество жизни пациентов, но являются в основном препаратами симптоматического лечения, значительно не влияя на причину заболевания – вирусную нагрузку и сопутствующие бактериальные осложнения.

Известно использование такого иммуностропного препарата как даларгин в виде интраназального раствора для лечения ОРВИ [23], а также в лечении пневмоний с помощью инъекционного или инфузионного пути введения [10].

Даларгин разрешен для клинического применения при лечении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и желудка в период обострения; острого панкреатита; острого некротического панкреатита; облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей в составе комплексной терапии;

алкоголизма. Дозировка: внутривенное разовое дозирование при лечении острого некротического панкреатита составляет 5 мг даларгина. Вливания производятся 3-4 раза в сутки с равномерными интервалами. Курс терапии от 2 до 6 дней.

Даларгин обладает широким диапазоном безопасного применения, относится к веществам с низкой токсичностью более с ЛД₅₀=2,5г/кг. Применение в виде аппликаций на кожу и слизистые в любых концентрациях не вызывает местнораздражающих реакций.

Даларгин также улучшает микроциркуляцию и лимфоотток в зоне повреждения [11, 12], а также обладает прямым противовирусным и иммуностимулирующим действием [23].

Наиболее близким аналогом заявляемого изобретения является применение назальной композиции, содержащей гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинин или его фармацевтически приемлемую соль, для лечения острых респираторных вирусных заболеваний ОРВИ (Патент РФ 2672888). Показано, что гексапептид имеет прямое противовирусное действие. Применение предлагаемого состава в качестве спрея в нос позволяет использовать его как в виде монотерапии, так и в сочетании с другими лекарственными средствами в качестве средства для лечения и профилактики ОРВИ, в частности гриппа. Однако, в описанном способе применения гексапептида происходит орошение только носовых проходов. Это не позволяет создавать барьерный противовирусный эффект на всех слизистых ротовой полости, ротоглотки и носоглотки и перекрыть полностью "ворота" для проникновения инфекции. Кроме того, для обеспечения стабильности хранения в процессе применения состав должен содержать ингибитор роста бактерий, например, бензалкония хлорид, как правило в диапазоне концентраций 0,005-0,1 %. Бензалкония хлорид в составе рецептуры кроме бактерицидного действия, обеспечивающего длительность хранения флакона с раствором, имеет заметное

местное антибактериальное и противовирусное действие в отношении вирусов гриппа и коронавирусов при применении в виде ингаляции или спрея [24].

Резюмируя вышеизложенное, можно утверждать, что опубликованные в настоящее время материалы не описывают использование активного вещества гексапептида даларгина в качестве препарата для создания барьерного эффекта проникновения вирусной инфекции на всей поверхности ротовой полости, носоглотки и ротоглотки, а также использование его в качестве активного компонента, предотвращающего развитие осложнений острых респираторных заболеваний, в частности не выясненной этиологии. Применение препарата в виде ингаляции для этих целей также не описано.

Задачей настоящего изобретения является расширение возможностей применения тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина диацетата, в дальнейшем именуемого даларгином, в защите от инфицирования острыми респираторными заболеваниями вирусной природы и предотвращении развития осложнений.

Для решения этой задачи мы предлагаем применение даларгина в виде спрея и/или ингаляционной формы для профилактики ОРВИ или предотвращения развития их осложнений.

В частном случае осуществления изобретения даларгин входит в состав композиции, используемой для введения в виде спрея и/или ингаляционного раствора.

В частном случае осуществления изобретения для профилактики ОРВИ применяют ингаляции и/или спрей раствором даларгина с размером частиц 5-50 мкм.

В частном случае осуществления изобретения для защиты от инфицирования ОРВИ производят орошение раствором даларгина всей

поверхности носоглотки, ротоглотки, ротовой полости и сублингвально под язык для обеспечения защитного барьерного эффекта на слизистых оболочках.

В частном случае осуществления изобретения для предотвращения развития осложнений при ОРВИ применяют ингаляции раствором даларгина с размером частиц 0,5 – 10 мкм, предпочтительно 0,5-3 мкм.

В частном случае осуществления изобретения в состав композиции, содержащей гексапептид, используемой для введения в виде спрея и/или ингаляционного раствора входит ингибитор роста бактерий, например, бензалкония хлорид, как правило в диапазоне 0,005-0,1 масс %, предпочтительно 0,01%.

В частном случае осуществления изобретения состав композиции имеет кислый pH в диапазоне от 3 до 7, предпочтительно pH=4,0-5,5.

В частном случае осуществления изобретения в состав композиции, содержащей гексапептид, используемой для введения в виде спрея и/или ингаляционного раствора входит ацетатный буфер.

Техническими результатами заявляемого изобретения являются:

- расширение арсенала технических средств ингаляционной терапии для профилактики ОРВИ или предотвращения развития осложнений;

- достижение терапевтической концентрации непосредственно в тканях, подвергающихся воздействию вирусов, включая носоглотку, гортань, трахею, бронхи, альвеолы, что приводит к быстрому и активному местному ответу в виде повышения противовирусной активности непосредственно в очаге заражения,

- достижение опосредованных положительных реакций в виде противокашлевого действия и уменьшения одышки;

- достижение стабилизации больных с легкой и средней формами течения ОРВИ, в частности, отягощенной вирусно-бактериальными осложнениями и эффектами локальной патологической гиперактивации иммунной реакции;

- показана высокая эффективность препарата в отношении вирусов разных типов, сопоставимая в экспериментах на животных со специфическими противовирусными препаратами таргетного действия, такими как Осельтамивир;

- размеры частиц распыляемого лекарственного вещества варьируются в широком диапазоне - от 0,5 мкм до 50 мкм, благодаря чему обеспечивается как профилактический защитный эффект (для профилактики достаточно орошать область верхних дыхательных путей, при этом сравнительно большой размер частиц - до 5-50 мкм), так и лечебный (для предотвращения развития осложнений необходимо воздействие на более глубокие области, куда проникают частицы более мелкого размера – до 0,5-3 мкм).

- в качестве рекомендуемой дозы ингаляции предлагается использовать раствор 0,005-0,5% даларгина в буферном растворе с рН в диапазоне от 3 до 7, предпочтительно рН=4,0-5,5, в количестве разовой дозы от 0,5 до 50 мг в составе с ацетатным буфером. Показано, что для спреевой формы и ингаляции в растворах препарата даларгин с рН больше 6 или в буферах, отличных от ацетатного, эффективность противовирусного и иммуностропного действия значительно падает.

Преимуществом ингаляционной формы даларгина является его таргетность по отношению к органу-мишени, а также значительно более длительная эффективность действия при попадании в легкие по сравнению с системным введением. При инъекционном или инфузионном введении время полувыведения даларгина в среднем составляет 12 мин [13]. Это происходит в результате интенсивной деградации пептида в печени и кровотоке. Ингаляционная форма, несмотря на значительные потери такого пути введения, сохраняется в активной форме на поверхности слизистой гортани, трахеи и

бронхов значительно дольше и оказывает непосредственный лекарственный эффект.

Поскольку даларгин является пептидом, то после введения он подвергается быстрой деградации пептидазами до олигопептидов и аминокислот, которые включаются в ресинтез собственных белков организма [14]. В этом случае при системном применении препарата даларгина происходит его быстрая деградация и снижение эффективности в органах-мишенях. Применение ингаляционной формы доставки препарата позволяет получить максимальную рабочую концентрацию препарата конкретно в органе-мишени в течение длительного времени. Поступление активного вещества через слизистые оболочки горла, бронхов и тканей легкого воздействует на локальные популяции иммунологических клеток, таких как лейкоциты и макрофаги.

В процессе деградации пептида даларгина (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) происходит отщепление С-концевой аминокислоты и появление пятичленного пептида Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu с заметной аффинностью к дельта-рецепторам. Следующий метаболит – тетрапептид Tyr-D-Ala-Gly-Phe обладает аффинностью к мю-рецепторам. Мю- и дельта-рецепторы находятся в кашлевом центре продолговатого мозга, и системное применение антагонистов данных рецепторов блокирует кашлевый рефлекс. При этом, как правило, происходит влияние и на остальные органы и зоны мозга, где содержатся опиоидные рецепторы. Также данная группа рецепторов содержится и в периферических нервных путях, поэтому даларгин может влиять и на проводимость сигналов по нервным путям. [15] В случае ингаляции даларгина происходит, в основном, локальное воздействие короткоживущих метаболитов пептида на периферические опиоидные рецепторы, что проявляется в снижении возбудимости рецепторных клеток и уменьшении интенсивности передаваемого возбуждения в кашлевый центр. Результатом является снижение интенсивности кашля на период 2-4 часа, пока сохраняется определённая концентрация даларгина в слизистых тканях легкого. Этот эффект не распространяется на

дыхательный центр. Некоторый местный обезболивающий эффект также облегчает общее самочувствие пациента. Действительно, при клинической апробации было обнаружено, что пациенты отмечали значительное облегчение дыхания и снижение интенсивности или пропадание кашля, как правило, кашля сухого. Это, в свою очередь, снижает раздражение дыхательных путей, уменьшает "выкашливание" препарата, введенного ингаляционно, и повышает качество жизни пациентов.

Одним из частых симптомов заболевания ОРВИ является развитие одышки. Часто болеющий человек не способен выполнять элементарные действия без развития одышки, учащенного дыхания, появления ощущения недостатка воздуха. Среди различных методов терапии одышки описано положительное влияние на данное состояние системного введения некоторых препаратов-агонистов опиоидных рецепторов. Введение различных опиоидов в ингаляционной форме показало положительный эффект в большинстве исследований [16]. Системно вводимые опиоиды также рекомендуются для лечения одышки у таких пациентов, но побочные эффекты могут ограничивать их применение. Несмотря на положительный эффект, данный тип терапии имеет серьезные ограничения в связи с ограниченным оборотом опиоидных препаратов и наличием побочных эффектов им характерных. В случае ингаляции даларгина также наблюдается эффект улучшения качества дыхания. В экспериментальном клиническом применении препарата отмечено заметное уменьшение одышки и появление "легкости дыхания". Предполагаемый механизм этого эффекта основан на кратковременном локальном действии метаболитов даларгина, являющихся в некоторой степени агонистами опиоидных мю- и дельта рецепторов. В отличие от классических опиоидов, эти метаболиты короткоживущие и действуют исключительно локально в зоне конденсации ингаляционной взвеси в легких, в основном в районе гортани, бронхов и трахей.

Таким образом, даларгин в ингаляционной форме или в виде спрея может оказывать непосредственное противовирусное действие, влияет на уменьшение

кашля и снижает негативные эффекты от одышки у больных с ОРВИ, предотвращает развитие осложнений и переход заболевания в тяжелую форму, а применение Даларгина в виде спрея для одновременного орошения полости рта, носоглотки, ротоглотки и под языком (сублингвально) имеет выраженный эффект защиты от инфицирования ОРВИ.

Проведенные нами исследования показали, что эффекты даларгина, а именно прямой противовирусный эффект, активация клеточного иммунитета с формированием "барьерного эффекта", возможность повышать факторы местной и системной иммунологической защиты, снижать кашлевый синдром и уменьшать одышку позволяют использовать его в качестве эффективного терапевтического средства в профилактике ОРВИ и предотвращения развития их осложнений.

При применении даларгина активируются иммунные и антистрессорные реакции самого организма пациента, которые являются универсальными и имеют место при развитии вирусной инфекции независимо от конкретного вида возбудителя.

Краткое описание поясняющих материалов

Таблица 1 – Вирусингибирующие свойства даларгина в отношении вируса гриппа и аденовируса человека в культуре клеток

Таблица 2 – Показатели гибели животных в ходе летальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Примечания: * - статистически достоверные отличия от группы контроля ($p < 0,05$).

Таблица 3 – Выживаемость животных в модели летальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/California/04/2009. Примечания: ** - статистически достоверные отличия ($p < 0,05$) от группы активного контроля (Ингавирин).

Фиг. 1 - Титры штаммов вируса гриппа A/California/04/2009 в легких инфицированных мышей через 5 сут. после заражения. Примечание: планки погрешностей обозначают 95% -доверительный интервал оценки.

Раскрытие сущности изобретения.

Ингаляционная форма препарата может быть изготовлена в виде стерильного раствора с концентрацией 0,005-0,5% даларгина в буферном растворе, предпочтительно ацетатном буфере, с рН от 3 до 8, предпочтительно рН=4,0-5,5, в количестве разовой дозы от 0,5 до 50 мг в 5-20 мл раствора. Введение раствора даларгина осуществляется через небулайзер компрессорного типа (например, модели фирмы Med2000, Omron, B.Well и др.) с рекомендуемым размером генерируемых частиц от 0,5 до 10 мкм, предпочтительно 0,5-3,0 мкм. Именно при таком размере частиц обеспечивается наиболее полная доставка лекарственного вещества в область средних и нижних дыхательных путей.

В область верхних дыхательных путей препарат доставляется путем распыления в виде спрея с размером частиц 5-50 мкм.

В состав раствора могут быть внесены дополнительные вспомогательные вещества, такие как компоненты буферных солей, стабилизаторы, загустители, фармакологически приемлемые поверхностно активные вещества, физиологические соли, консерванты.

В качестве буферных солей предпочтительно используется ацетатный буфер, содержащий ацетат натрия и уксусную кислоту с предпочтительно рН=4,0-5,5. Также может использоваться цитратный буфер. Как показали наши исследования, низкий рН буферного раствора на ацетатной основе обеспечивает более высокую специфическую противовирусную и иммуностропную активность даларгина в режиме профилактического или лечебно-профилактического введения в зону носа, носоглотки, ротоглотки, ротовой полости и сублингвально

под язык в 2-4 раза. Этим обеспечивается стабильный эффект при аппликации меньших доз препарата – 1-4 мг в дозе. Также может использоваться физиологически приемлемый буфер на основе натрия гидрофосфата дигидрата и натрия дигидрофосфата дигидрата, однако данный буфер недостаточно эффективен по буферной емкости в диапазоне $pH=4,0-5,5$.

Для обеспечения достаточно длительного срока хранения растворов в спреевом дозаторе, а также после начала использования в раствор рекомендуется вводить бактерицидный компонент бензалкония хлорид, как правило в диапазоне концентраций 0,005-0,1 %.

В качестве стабилизаторов могут быть введены такие компоненты, как динатрия эдетата дигидрат (0,1-2 мг/мл), натрия хлорид (1-10 мг/мл). Эти добавки потенциально пролонгируют срок хранения растворов и лиофильных порошков, содержащих активный компонент даларгин. Также натрий хлорид используется как компонент, обеспечивающий изотонические свойства раствора.

Для спреевого способа нанесения раствора даларгина может быть важна вязкость раствора. В качестве регулятора вязкости могут применяться такие вспомогательные вещества как микрокристаллическая целлюлоза, натрий карбоксиметилцеллюлоза, макрогол, пропиленгликоль, глицерин, поливинилпирролидон, N-метилпирролидон.

Для улучшения качества адгезии спреевого раствора к слизистым оболочкам можно использовать различные полимеры с биоадгезивными свойствами, поверхностно-активные вещества, неионные детергенты, обладающие мукоадгезивными свойствами, например, поллоксамеры.

Для стандартного применения в небулайзере 5-10 мл раствора 0,02-0,2% даларгина помещают в камеру небулайзера, подсоединяют ее к компрессору небулайзера. На камере с лекарством закрепляют маску или мундштук. Затем включают компрессор и подносят маску плотно к лицу так, чтобы дыхание происходило через нос и рот. При использовании мундштука его помещают в

рот и плотно обхватывают губами. Дыхательные движения осуществляют в спокойном темпе с плавными глубокими вдохами.

Проводят ингаляцию в течение 2-15 минут 2-3 раза в день. Предпочтительная дозировка лекарственного вещества за один сеанс ингаляции может составлять 1-6 мг, что является достаточным для проявления основных эффектов препарата. В случае терапии ОРВИ средней тяжести количество активного вещества может достигать 50 мг при долговременной (до 30 минут) ингаляции.

В случае применения раствора в виде спрея приготовленный раствор помещают в емкость, содержащую в своем составе распылитель, обеспечивающий образование частиц раствора размером 10-50 мкм, и орошают носовые проходы по 1-2 впрыскивания и ротовую полость путем 2-3 впрыскиваний 2-3 раза в день. Предпочтительная концентрация лекарственного вещества в растворе для спрея может составлять 0,05-0,5 % далааргина.

Осуществление изобретения.

Пример 1. Приготовление 0,05% раствора далааргина для ингаляционного введения.

Раствор далааргина для ингаляций готовят в чистых помещениях. Оптимальной терапевтической концентрацией далааргина для ингаляции в целях профилактики и купирования развития осложнений на первых стадиях заболевания ОРВИ является 0,05%. В этом случае объем ингаляции оптимально может быть от 4 до 10 мл, что составляет 2 – 5 мг далааргина на процедуру ингаляции.

Для приготовления 10 л раствора для ингаляции используют следующий порядок действий. Готовят концентрат ацетатного буфера путем смешивания 490 мл 0,2 М раствора ацетата натрия и 510 мл 0,2 М уксусной кислоты. Данный концентрат является 10 кратным по отношению к конечному раствору в котором

должно содержаться 0,005-0,05 М ацетатного буфера, предпочтительно 0,02 М. рН концентрата должен быть получиться в диапазоне 4,3-4,8. При необходимости рН корректируется добавлением 1М раствором ацетата натрия или 1М уксусной кислотой. 1 л концентрата ацетатного буфера помещают в смесительный реактор. Добавляют 7 л воды очищенной для инъекций. Буферный раствор может быть также приготовлен на основе цитрата натрия по аналогичной схеме, однако ацетатный буфер предпочтительнее.

Для получения 0,05% раствора даларгина для ингаляционного введения используют порошок даларгина лиофилизированный в количестве 5000 мг. В случае использования жидкой субстанции берут количество раствора субстанции эквивалентное 5000 мг сухого порошка даларгина. Например, для 10% жидкой субстанции даларгина берут 50 мл раствора субстанции. Компоненты смешивают в смесительном реакторе до полного растворения компонентов. Контролируют рН раствора и при необходимости корректируют добавлением 1М раствором ацетата натрия или 1М уксусной кислотой. Доводят объем смеси до 10л и завершают смешивание. Полученный раствор фильтруют методом тупиковой стерилизующей фильтрации и разливают по 5 или 10 мл в стерильные флаконы, желателно темного стекла или непрозрачные. Описанная процедура, как и нижеприведенные примеры 2, 3, 4, может быть масштабирована на необходимый объем раствора даларгина с учетом особенностей конкретного фармацевтического производства.

Полученный раствор может храниться в холодильнике длительное время и применяться для ингаляции без дополнительных манипуляций. Раствор из флакона помещают в капсулу небулайзера в необходимом количестве и проводят ингаляцию.

Пример 2. Приготовление 0,2% раствора даларгина для ингаляционного введения.

В случае предотвращения развития осложнений у пациентов со средней тяжестью течения ОРВИ может быть необходимым применение больших дозировок препарата даларгина. Для это следует получить раствор даларгина для ингаляции с концентрацией 0,2%.

Буфеный раствор готовят аналогично Примеру 1. Для получения 0,2% раствора даларгина для ингаляционного введения используют порошок даларгина лиофилизированный в количестве 20 000 мг. В случае использования жидкой 10% субстанции берут 200 мл. Полученный раствор стерилизуют и разливают стерильно по флаконам в адекватном количестве (предпочтительно 4-10 мл).

Пример 3. Приготовление раствора даларгина в виде спрея для орошения слизистых оболочек носа и горла.

Раствор даларгина для орошения носоглотки, ротоглотки, ротовой полости и под языком, предпочтительно, имеет концентрацию 0,05-0,4 % даларгина. Как правило, качественно произведенный раствор с контролируемым рН в диапазоне 4-5 не требует для проявления достаточной активности концентрации выше 0,1-0,2%.

Раствор готовят в чистых помещениях. Для приготовления 10л раствора даларгина 0,1% для спреевого введения готовят 0,02М ацетатный буфер аналогично примеру 1. В емкость реактора добавляют 1 г бензалкония хлорида в виде порошка или в виде концентрированного раствора из расчета до 0,01% содержания в конечном растворе. Для получения 0,1% раствора даларгина для спреевого введения используют порошок даларгина лиофилизированный в количестве 10 000 мг. В случае использования жидкой 10% субстанции берут 100 мл. Контролируют рН раствора и при необходимости корректируют добавлением 1М раствором ацетата натрия или 1М уксусной кислотой до диапазона рН=4-5. Доводят объем смеси до 10л и завершают смешивание. Полученный раствор фильтруют методом тупиковой стерилизующей

фильтрации и разливают по 5 или 10 мл в стерильные флаконы, желательного темного стекла или непрозрачные со спреевой насадкой.

Пример 4. Приготовление 0,3% раствора даларгина в виде спрея для орошения слизистых оболочек носа и горла с пролонгированным эффектом.

Спреевой раствор по примеру 3 содержит минимальное количество компонентов для проявления специфической защитной противовирусной функции. Введение в раствор для спреевого введения даларгина компонентов, повышающих вязкость, обеспечивает более длительное сохранение раствора на слизистых оболочках, постепенное выделение раствора и пролонгацию эффекта. Данный вариант приготовления спреевого раствора требует меньшей частоты применения в терапевтической практике.

Для приготовления 10л раствора даларгина 0,3% для спреевого введения готовят 0,02М ацетатный буфер аналогично примеру 1. В емкость реактора добавляют 1г бензалкония хлорида, 50г натрия хлорида, 5г натрия эдетата, 100г полоксамера 407, 600г Полиэтиленгликоля 400, 600г Пропиленгликоля, 30 000 мг даларгина или эквивалента в виде концентрированного раствора субстанции. Компоненты тщательно смешивают в смесительном реакторе до полного растворения компонентов, желательного с использованием процедуры вакуумирования для дегазации. Контролируют рН раствора и при необходимости корректируют добавлением 1М раствором ацетата натрия или 1М уксусной кислотой. Доводят объем смеси до 10л и завершают смешивание. Полученный раствор фильтруют методом тупиковой стерилизующей фильтрации и разливают по 5 или 10 мл в стерильные флаконы.

Получаемый раствор характеризуется достаточно вязкой консистенцией, способной эффективно обволакивать слизистые оболочки горла и ротовой полости обеспечивая плавное всасывание активного компонента даларгина в поверхностные ткани с эффективностью значительно выше, чем без использования данного комплекса вспомогательных компонентов.

Пример 5.

Противовирусную активность даларгина in vitro определяли в отношении вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в сравнении с Ремантадином (в дозе 5 мкг/мл) и аденовируса человека 5 типа в сравнении с Ацикловиром (в дозе 30 мкг/мл). Клетки соответствующей линии (MDCK для вируса гриппа и Vero для аденовируса) заражали вирусом при множественности заражения 0,01 в присутствии даларгина в диапазоне концентраций 100 – 1 мкг/мл. Планшеты с клетками инкубировали в течение 1 ч, после чего несвязавшийся вирус отмывали, заменяли культуральную среду на свежую, содержащую даларгин в тех же концентрациях и инкубировали в термостате в течение 24 ч. По окончании срока инкубации инфекционный титр вируса определяли при помощи титрования на перmissiveй клеточной культуре. С этой целью из культуральной жидкости готовили серию десятикратных разведений (10^{-1} – 10^{-7}), инфицировали этими разведениями клетки соответствующей линии, рассеянные в 96-луночные планшеты, и инкубировали при 36°C в атмосфере 5 % CO₂ в течение 72 ч. По истечении этого срока наличие вируса в лунках детектировали по наличию специфического цитопатогенного действия (ЦПД) для аденовируса или положительной реакции гемагглютинации (РГА) в культуральной жидкости (вирус гриппа).

Для постановки реакции гемагглютинации (РГА) 100 мкл культуральной жидкости переносили в соответствующие лунки планшета для иммунологических реакций, после чего добавляли равный объем 1 % куриных эритроцитов в физиологическом растворе. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 20°C. По истечении этого срока визуально учитывали результаты РГА в лунках.

Результаты тестирования противовирусной активности даларгина против вируса гриппа и аденовируса человека в культуре клеток приведены в таблице 1.

Статистически значимыми считали различия при уровне р-величины менее 0,05.

На основании полученных данных рассчитывали:

– 50 % цитотоксическая концентрация (CC50), т. е. концентрация соединения, снижающая оптическую плотность в лунках вдвое по сравнению с контрольными клетками;

– Единицы титрования – за размерность единиц титрования вируса принимали отрицательный десятичный логарифм наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную реакцию гемагглютинации (вирус гриппа) или специфическое ЦПД (аденовирус) – 50 % тканевую цитотоксическую инфекционную дозу вируса (TCID50);

– Титр вируса – выражали в десятичных логарифмах выражения его концентрации в материале в соответствующих единицах титрования.

IC50 – 50 % эффективная (ингибирующая воздействие вируса) концентрация вещества;

SI – Индекс селективности вещества, представляет собой отношение токсической концентрации CC50 к эффективной концентрации – IC50

Как следует из представленных результатов, модельные вирусы эффективно размножались в использованных клеточных культурах, достигая через 24 ч культивирования титра 5,5 (вирус гриппа) и 4,5 (аденовирус) lg TCID50/0,1 мл. Препараты сравнения Ремантадин и Ацикловир не проявляли противовирусных свойств из-за нечувствительности к ним использованных вирусов.

В то же время применение далагина приводило к дозозависимому снижению инфекционной активности обоих вирусов. В большей степени этот

эффект был выражен для вируса гриппа ($IC_{50} = 0,8$ мкг/мл, $SI > 37,5$), в несколько меньшей – для аденовируса ($IC_{50} = 2,5$ мкг/мл, $SI = 12$).

Таким образом, результаты эксперимента *in vitro* подтвердили наличие у даларгина вирусингибирующей активности.

Пример 6. Исследование противовирусной активности ингаляционного введения даларгина в эксперименте *in vivo* на модели гриппозной пневмонии у мышей в отношении актуального штамма вируса гриппа (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в лечебно-профилактическом и профилактическом режиме.

Описание модели *in vivo*. В исследовании были использованы самки мышей линии Balb/c в количестве 297 особей средней массой тела $25 \pm 4,6$ г. При ингаляционном пути введения препаратов в животных моделях особенно важно учитывать межвидовые особенности дыхательных характеристик [14, 15, 16]. Несмотря на то, что рядом исследователей (в основном в рамках токсикологических экспериментов) предлагается использовать непосредственное интратрахеальное введение лекарственных растворов, очевидно, что для терапевтических моделей данный подход не совсем приемлем. При моделировании терапевтического эффекта при ингаляционном введении лекарств необходимо воссоздавать аналогичный путь введения для животных. Однако, в этом случае для расчета получаемых животными дозировок становится необходим точный учет и нормирование показателей функции дыхания.

В разных физиологических состояниях (например, в покое и при стрессе) дыхательная функция претерпевает большие изменения, что неизменно отражается на ее характеристиках [16]. Кроме того, у разных линий мышей такие параметры дыхательной системы, как частота дыхания, дыхательный объем и минутная вентиляция легких, также существенно различаются [15]. Помимо прочего необходимо учитывать долю препарата, достигающего нижних

дыхательных путей, так как именно она определяет фармакологическую активность, представляя собой величину, зависимую от ряда параметров (например, размера частиц аэрозоля) и, соответственно, от применяемых в модели величинах вентиляции.

В нашем эксперименте для расчета абсорбированной нижними дыхательными путями дозы ($DoseAbsorb$), применяли следующую формулу:

$$DoseAbsorb(мг/кг) = \frac{ConcSol \left(\frac{мг}{мл} \right) * Vneb \left(\frac{мл}{мин} \right) * time(мин) * RatioAbsorb * m(кг) * V \left(\frac{л}{кг * мин} \right)}{Flow \left(\frac{л}{мин} \right) * 1 мин}$$

где $ConcSol$ (мг/мл) - концентрация в растворе, $Vneb$ (мл/мин) - скорость распыления (0,3 мл/мин)

$time$ (мин) – время экспозиции животных в камере, $RatioAbsorb$ - альвеолярная ретенция (доля оседающих в легких частиц аэрозоля, эта доля определяется размером частиц и была принята за 7,3% на основе данных предварительных экспериментов [14]; m (кг) – масса животных (25 г), V (л/кг*мин) – минутная вентиляция легких (1 л/кг*мин), $Flow$ (л/мин) - поток воздуха, проходящего через камеру (17 л/мин).

Материалы и методы. Для проведения ингаляций мышей помещали в плексигласовую камеру, по 18 особей в одну камеру объемом 14,5 л. Камера снабжалась двумя беговыми колесами для предотвращения скученности животных и их передвижения.

Для перевода растворов в ингаляционную форму использовали боковой небулайзер SideStream, формирующий частицы раствора размерами 0,5 - 3 мкм. при давлении 3 атмосферы, формирующий скорость потока 17 л/мин. Распыление раствора проводили со скоростью 0,3 мл/мин.

Для ингаляционного лечения даларгин растворяли в дважды дистиллированной воде для достижения конечных концентраций 1, 3 и 5%.

Расчет дозировок для мышей проводили на основе обратного пересчета эквивалентных человеку доз (ЭЧД): 1, 20 и 40 мг/сут.

Управление дозированием осуществляли с помощью регулирования концентрации раствора для ингаляции, а также длительности экспозиции животных в камере.

Животных случайным образом разделили на 9 групп по 33 (30 для исследования смертности и 3 животных для эвтаназии на 3-й день) особей в каждой:

1 группа – (контроль - ингаляции физиологического раствора 2 раза в день);

2 группа – (ТамифлюТМ в дозе 20 мг/кг 1 раз в день внутривентрикулярно);

3 группа – (Кагоцел® в дозе 12 мг/кг 1 раз в день внутривентрикулярно);

4 группа – (ингаляции раствором далагина в концентрации 1% в течение 14 минут 2 раза в день. Полученная доза (достигшая альвеол) составила 0,36 мг/кг. ЭЧД соответствует 2 мг/кг;

5 группа - мыши получали ингаляции раствором далагина в концентрации 3% в течение 45 минут 2 раза в день. Полученная разовая доза (достигшая альвеол) составила 1,74 мг/кг. Суточная ЭЧД соответствует 20 мг/кг;

6 группа - мыши получали ингаляции раствором далагина в концентрации 5% в течение 55 минут 2 раза в день. Полученная разовая доза (достигшая альвеол) составила 3,54 мг/кг. Суточная ЭЧД соответствует 40 мг/кг;

7 группа – мыши получали в профилактическом режиме препарат Кагоцел® в дозе 12 мг/кг 1 раз в день внутривентрикулярно в третьи, вторые, первые сутки и за 1 ч до инфицирования;

8 группа – мыши получали ингаляции раствором даларгина в концентрации 3% в течение 45 минут 2 раза в день в третьи, вторые и первые сутки и за 1 ч до инфицирования, в дальнейшем после инфицирования лечение не проводили;

9 группа - вводили интраназально и на заднюю стенку глотки (РнГ) в количестве 0,5 мг/кг (в виде 5 мкл 0,2 % раствора и 10 мкл 0,1 % раствора) 2 раза в день за в третьи, вторые и первые сутки и за 1 ч до инфицирования, в дальнейшем после инфицирования лечение не проводили.

Заражение животных проводили под эфирным наркозом. Для заражения мышей использовали дозу $2,5 \times 10^3$ ЭИД₅₀/животное из расчета по 0,025 мл вирусосодержащего материала в каждую ноздрю.

В лечебно-профилактическом режиме препараты сравнения вводили внутривентрикулярно за 24 ч (Кагоцел®) и 1 ч (ТамифлюТМ, Кагоцел®) до инфицирования, и в течение 5 дней после инфицирования. В лечебно-профилактическом режиме ингаляции даларгина (группы 3, 4, 5) проводили ежедневно, один или два раза в день на протяжении 6 суток (за 24 и за 1 ч до инфицирования, и в течение 5 дней после инфицирования). В профилактическом режиме в группе 7 вводили препарат сравнения Кагоцел® в дозе 12 мг/кг 1 раз в день внутривентрикулярно в третьи, вторые, первые сутки и за 1 ч до инфицирования. В профилактическом режиме в группе 8 при ингаляционном введении проводили ингаляции раствором даларгина в концентрации 3% в течение 45 минут 2 раза, а в группе 9 даларгин вводили интраназально и на заднюю стенку глотки (РнГ) в количестве 0,5 мг/кг (в виде 5 мкл 0,2 % раствора и 10 мкл 0,1 % раствора) 1 раз в день раз в день в третьи, вторые, первые сутки и за 1 ч до инфицирования, в дальнейшем после инфицирования лечение не проводили.

В качестве первичных конечных точек эффективности принимали следующие параметры:

Смертность (%) - отношение числа павших животных к общему числу зараженных животных в группе: $M\% = M / Nt$, где M – число павших животных, а Nt – число зараженных животных.

Индекс защиты (%) – отношение разницы процентов смертности в контрольной и опытной группах к проценту смертности в контрольной группе: $IP = ((M_c - M_e) / M_c) \times 100 \%$, где M_c – доля смертности в группе контроля, M_e – доля смертности в экспериментальной группе животных.

Выживаемость оценивали по критерию Мантеля-Кокса, с учетом множественности сравнений с построением кривых Каплана-Майера с помощью программы IBM SPSS v. 22.0.

Результаты

Клинические признаки заболевания у инфицированных мышей были типичными для гриппозной инфекции. Они включали: затрудненное дыхание, атаксию, тремор, а также снижение потребления корма и воды. Неспецифической смертности в контрольной группе интактных животных отмечено не было. Полученные данные по динамике смертности животных в контрольных и опытных группах суммированы в таблице 2.

На 3-й и 12-й дни эксперимента по 3 животных в каждой группе (всего $n=6$) подвергали эвтаназии для исследования гистологической картины легочной ткани.

На 3-и сутки после инфицирования у контрольных животных наблюдался выраженный отек интерстиция, отмечались очаги геморрагического отека, нейтрофильная инфильтрация, а также спадение альвеол с экссудацией серозной жидкости в их просвет. Данные явления характеризуют наличие острого респираторного дистресс-синдрома. Аналогичная картина наблюдалась у групп 3, 7, частично 9. Препараты сравнения не продемонстрировали заметного влияния на гистологическую картину. В группах, получавших даларгин, эти

изменения были заметно менее выраженными. В группах профилактического применения даларгина 8 и 9 часть животных не показала признаков патологии и не имела характерной гистологической картины заражения.

На 12-е сутки у выживших животных в группе контроля наблюдали гиперплазию бронхиального эпителия, клеточный экссудат в бронхиальном просвете и интенсивные клеточные инфильтраты. Эти фибротические изменения обычно лежат в основе такого распространенного осложнения гриппа как легочный фиброз. При применении препаратов сравнения воспалительные изменения были менее выражены. У половины животных, получавших даларгин, гистологическая картина легочной ткани вообще не показала признаков патологии, что свидетельствует о выраженном воздействии этого препарата при ингаляционном пути введения. У других выживших животных, получавших даларгин в лечебно-профилактическом режиме, патоморфологические признаки были выражены очень незначительно. В группах 8 и 9 профилактического применения даларгина практически все выжившие животные не показали признаков патологии и не имели характерной гистологической картины заражения.

Таким образом, максимальная противовирусная активность была продемонстрирована при ингаляциях даларгина, протекторное действие которого в отношении ткани и функции легких превосходило Тамифлю и Кагоцел. Ингаляционное применение даларгина обеспечивало самую низкую гибель животных и минимизацию повреждения легочной ткани за счет иммуномодулирующего действия препарата, а также повышения клеточной резистентности к поражению вирусом. При профилактическом режиме введения даларгина выжившие животные не были заражены и феномен противовирусной защиты объясняется эффективным профилактическим действием даларгина в виде прямого противовирусного действия, а также активации местного клеточного иммунитета в зоне "ворот инфицирования" – нос, носоглотка, ротоглотка и ротовая полость, а в случае ингаляции еще бронхи и трахеи.

Эффективность исключительно профилактического защитного эффекта, без лечебного компонента, достигает 50%.

По результатам выживаемости животных при применении разных дозировок далагина показано, что она возрастает при увеличении дозы достигая некоторого пика, соответствуя сигмоидной форме зависимости доза-эффект.

Пример 7. Исследование противовирусной активности далагина в эксперименте *in vivo* на модели гриппозной пневмонии у мышей в отношении пандемического штамма вируса гриппа А (H1N1) pdm09 (A/California/04/2009) в лечебном и профилактическом режиме.

Материалы и методы. На основе ранее проведенного исследования по противовирусной активности далагина в модели гриппозной пневмонии у мышей было выявлено, что интраназальное введение не менее эффективно, по сравнению с внутримышечным. При этом группа, получавшая препарат путем комбинации интраназального введения совместно с распылением на заднюю стенку глотки (РНГ) показала лучшие данные по выживаемости, чем только интраназальный путь введения. Максимальный эффект в этом исследовании приходился на диапазон доз 0,2 – 0,5 мг/кг и интервал концентраций 0,08 – 0,1 %, соответственно. [17]. Полученные результаты легли в основу следующего исследования, основываясь на предположении, что ингаляционный путь введения может повысить эффективность и оказаться более предпочтительным для разработки.

Модель ингаляционного введения была основана на приведенных в Примере 6 расчетах.

Штамм A/California/04/2009, впервые выделенный в США в 2009 г и адаптированный для мышей, был предоставлен ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Препараты сравнения (активный контроль): Ингавирин® и Арбидол®. Препараты сравнения вводили внутривентрикулярно в

объёме 0,2 мл по лечебной схеме (через 24, 48, 72, 96 и 120 ч после инфицирования).

Животных случайным образом разделили на 10 групп по 33 особи в каждой (30 для исследования смертности и 3 животных для эвтаназии на 5-й день) (всего n=330):

1 группа – (контроль - ингаляции физиологического раствора 2 раза в день) день на протяжении 6 суток (за 24 и за 1 ч до инфицирования, и в течение 5 дней после инфицирования);

2 группа – (Ингавирин® в дозе — 15 мг/кг, 1 раз в день внутривентрикулярно);

3 группа – (Арбидол® в дозе 130 мг/кг 1 раз в день внутривентрикулярно);

4 группа – (даларгин, интраназально 1 р/сут в дозе 0,2 мг/кг концентрации 0,08% по 10 мкл на каждый путь введения);

5 группа – (даларгин, интраназально и на заднюю стенку глотки (РнГ) 1 р/сут в дозе 0,5 мг/кг концентрации 0,1% по 10 мкл на каждый путь введения)

6 группа (ингаляции раствором даларгина в концентрации 1% в течение 40 минут 1 раз в день. Полученная доза (достигшая альвеол) составила 0,5 мг/кг. ЭЧД соответствует 3 мг/кг;

7 группа - мыши получали ингаляции раствором даларгина в концентрации 3% в течение 45 минут 1 раз в день. Полученная доза (достигшая альвеол) составила 1,74 мг/кг, что соответствует ЭЧД равной 10 мг/кг;

8 группа – мыши получали в профилактическом режиме препарат Ингавирин® в дозе — 15 мг/кг, 1 раз в день внутривентрикулярно в третьи, вторые, первые сутки и за 1 ч до инфицирования;

9 группа – мыши получали ингаляции раствором даларгина в концентрации 3% в течение 45 минут 2 раза в день в третьи, вторые и первые сутки и за 1 ч до инфицирования, в дальнейшем после инфицирования лечение не проводили;

10 группа - вводили интраназально и на заднюю стенку глотки (РнГ) в количестве 0,5 мг/кг (в виде 5 мкл 0,2 % раствора и 10 мкл 0,1 % раствора) 1 раз в день за в третьи, вторые и первые сутки и за 1 ч до инфицирования, в дальнейшем после инфицирования лечение не проводили.

В качестве первичных конечных точек эффективности принимали следующие параметры:

Смертность (%) - отношение числа павших животных к общему числу зараженных животных в группе: $M\% = M / Nt$, где M – число павших животных, а Nt – число зараженных животных.

Индекс защиты (%) – отношение разницы процентов смертности в контрольной и опытной группах к проценту смертности в контрольной группе: $IP = ((M_c - M_e) / M_c) \times 100 \%$, где M_c – доля смертности в группе контроля, M_e – доля смертности в экспериментальной группе животных.

Выживаемость оценивали по критерию Мантеля-Кокса, с учетом множественности сравнений с построением кривых Каплана-Майера с помощью программы IBM SPSS v. 22.0.

Определение вирусной нагрузки в лёгочной ткани.

Заражение животных проводили под эфирным наркозом. Для заражения мышей использовали дозу 2,0 lg ТЦД50/животное из расчета по 0,025 мл вирусосодержащего материала в каждую ноздрю.

Эвтаназии с целью определения вирусной нагрузки подвергали по 3 животных в каждой группе. Для определения концентраций вирусной нагрузки

лёгкие мышей извлекали на 5-е сутки после инфицирования, гомогенизировали в десятикратном объеме стерильного физиологического фосфатного буфера и готовили из объединенных для каждой группы гомогенатов серию десятикратных разведений на том же буфере. Полученными разведениями инфицировали клетки MDCK в 96-луночных планшетах и культивировали в течение 48 часов при 36°C в атмосфере 5% CO₂. Концентрацию вирусной нагрузки рассчитывали по методу Спирмана-Кебера [18] и выражали в lgТЦД50/мл (lg 50% тканевых цитопатических доз на мл).

Результаты

Клинические признаки заболевания у инфицированных мышей были типичными для гриппозной инфекции. Неспецифической смертности в группе интактных животных не было. Полученные данные по динамике смертности животных приведены в таблице 3.

На 5-е сутки эксперимента по 3 животных в каждой группе подвергали эвтаназии для определения концентраций вирусной нагрузки в легочной ткани. Результаты определения вирусной нагрузки отражено в графике на Фиг. 1 в lgТЦД50/мл.

Полученные результаты свидетельствуют о преимуществе ингаляционного введения даларгина по сравнению с другими противовирусными препаратами (Ингавирин® и Арбидол®) в предотвращении развития гриппозной пневмонии. Причем показано отсутствие повышения эффективности при увеличении ингаляционных дозировок даларгина. Максимальная эффективность была показана для 6-й группы, получавшей ингаляции раствором даларгина в концентрации 1% в течение 40 минут 1 раз в день. Разовая поглощенная доза (достигшая альвеол) составляла 0,5 мг/кг, что соответствует ЭЧД в 3 мг/кг. Полученные данные коррелировали с определенной в ткани легких вирусной нагрузкой (Фиг. 1).

Также показано, что при профилактическом режиме введения даларгина проявляется протективный эффект против заражения у 50-70% животных в зависимости от типа введения препарата. Феномен противовирусной защиты объясняется эффективным профилактическим действием даларгина в виде прямого противовирусного действия, а также активации местного клеточного иммунитета в зоне "ворот инфицирования" – нос, носоглотка, ротоглотка и ротовая полость, а в случае ингаляции еще бронхи и трахеи.

Пример 8. Клинический пример

Пациент К., 35 лет. Поступил в стационар самостоятельно с жалобами на сухой кашель, сильную слабость, потливость, головокружение, повышение температуры тела до 39°C.

Диагноз при поступлении ОРВИ.

Анамнез. Сопутствующие заболевания: сахарный диабет 2 типа; ожирение 3 степени. Заболел остро, лечился самостоятельно обильным питьем, медом, соблюдал постельный режим. Состояние не улучшалось, после чего самостоятельно обратился за медицинской помощью в стационар.

Жалобы: подъем температуры в течение последних 4 дней, ломоту в мышцах и суставах, боль при движении глазных яблок, фотофобию, сухой кашель со скудной мокротой слизистой консистенции, нарастание слабости, одышку, саднение и боли за грудиной. В течение последних 5 лет вакцинацию от гриппа не выполнял.

При поступлении: состояние средней степени тяжести. Температура тела 38,6°C. Кожные покровы бледные. При аускультации выслушивается жесткое бронхиальное дыхание. ЧДД в покое – 20/мин., АД – 130/90 мм рт. ст., ЧСС – 90/мин. SaO₂ – 91%. Живот мягкий, безболезненный, отеков нет. Взяты мазки носо- и ротоглотки для выполнения ПЦР-диагностики, а также

вирусологического исследования. Проведен забор мокроты для бактериологического исследования.

Данные рентгенографии: симметричное равномерное усиление легочного рисунка, контуры четкие, корни структурные. На периферии нижних долей легких отмечаются мелкоочаговые тени. Рентгенографическая картина соответствует I стадии острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС).

ЭКГ: Ритм синусовый. Горизонтальное положение ЭОС. ЧСС 94/мин. В I-II, а также в грудных V2-V6 отмечается слабая амплитуда зубца R.

При лабораторно-инструментальном обследовании получены следующие результаты: общий анализ крови: гемоглобин – 116 г/л, эритроциты – $4,2 \cdot 10^{12}$ /л, лейкоциты – $4,1 \cdot 10^9$ /л, эозинофилы - 0 %, базофилы - 0%, палочкоядерные нейтрофилы – 5,0%; сегментоядерные нейтрофилы - 52,0%, лимфоциты 42,0%, моноциты - 1,0%, СОЭ – 13 мм/час; анализ мочи: уд. вес – 1012, белок – 25, глюкоза – положительно, эпителий – значительно, лейкоциты – 2-10 в п/зр., эритроциты – 1-2 в п/зр.

ПЦР экспресс - диагностика: Обнаружен вирус гриппа вирус гриппа А (Influenza virus A).

Диагноз (МКБ-10: J10.0): Грипп средней степени тяжести, осложненный пневмонией, вирус гриппа идентифицирован. Гриппозная пневмония.

Проводимая терапия. Основная терапия осельтамивир - по 75 мг два раза в день в течение 5 дней, дополнительно назначены ингаляции 0,02% раствора даларгина 2 раза в день с помощью небулайзера и общей дозе 1 мг/сут. Симптоматическая жаропонижающая, детоксикационная и муколитическая терапия. Вспомогательная терапия гипогликемическими препаратами. Контроль уровня глюкозы крови. После начала процедур ингаляций даларгином сразу появилась положительная динамика в состоянии пациента. Обратила на себя внимание быстрая динамика в снижении клинических проявлений

интоксикации, наметилась трансформация сухого кашля во влажный, на 2-й день терапии появился аппетит. Полное исчезновение симптомов достигнуто к 7-му дню после начала терапии.

Результаты вирусологического исследования выявили наличие штамма A/Aichi/2/68 (H3N2).

Бактериальный посев мокроты не выявил бактериальной контаминации как этиологической причины пневмонии. Поэтому необходимости дополнительно антибактериальная терапия не назначалась.

Состояние при выписке: удовлетворительное. Данные клинических и лабораторных показателей – в пределах нормы. На ЭКГ нормализация формы и размеров зубца Р. На рентгенографии: легочные поля без очаговых и инфильтративных теней; легочный рисунок не усилен, корни легких структурны, не расширены, органы грудной клетки без признаков остаточных фибротических изменений. По данным спирометрии отклонений от нормы в параметрах ОФВ и ФЖЕЛ нет.

Пример 9. Клинический пример. – Применение Даларгина как средства профилактики заболевания гриппом

Для предотвращения заболевания гриппом с 1-го дня появления симптоматики у пациента В. его родственники (4 человека) самостоятельно применяли Даларгин по аналогичной схеме, но 1 раз в день (0,02% раствора в виде ингаляций 1 раз в день с помощью небулайзера в дозе 1 мг/сут, общий объем раствора для ингаляций составил 5 мл).

В течение последних 5 лет членам семьи пациента вакцинацию не проводили.

Схема профилактического применения осельтамивира не применялась, хотя и была рекомендована лечащим врачом.

Все члены семьи (женщина 35 лет, ребенок 13 лет, женщина 62 лет и мужчина 67 лет) имели высокий риск контактно-бытового пути передачи гриппозной инфекции.

В качестве профилактики применяли ингаляционно 0,02% раствор Даларгина 1 раз в день в дозе 1 мг/сутки (с помощью небулайзера)

На протяжении возможного инкубационного периода – 7 дней от начала заболевания и появления симптоматики у пациента В, у всех контактировавших с ним родственников катаральных явлений, гипертермии и прочей симптоматики гриппа выявлено не было.

Заключение: ингаляции раствора даларгина являются эффективным средством профилактики заболевания гриппом при высоком риске передачи инфекции. Данное средство может применяться как самостоятельно, так и в составе комплексной профилактической схемы с другими противовирусными препаратами. Данная находка может служить основанием для проведения клинического исследования эффективности Даларгина для профилактики гриппа и других ОРВИ при ингаляционном введении препарата.

Пример 10. Клинический пример – Амбулаторное применение Даларгина при гриппе среднетяжелого течения без осложнений

Пациент В, 37 лет. Вызвал скорую помощь в связи с острым началом заболевания. Состояние пациента средней степени тяжести. Температура тела 39,1 °С. Выраженный инфекционный токсикоз: головная боль, слабость, потливость, суставные и мышечные боли. Катаральный синдром: сухой мучительный кашель с болями за грудиной, боль в горле и насморк. При аускультации - жесткое бронхиальное дыхание без ослабления в нижних долях. ЧДД в покое – 22/мин., АД – 110/75 мм рт. ст., ЧСС – 92/мин. SaO₂ – 92%. Менингеальный синдром отсутствует. Живот мягкий, безболезненный, отеков нет. В течение последних 5 лет от гриппа вакцинацию не выполнял.

Диагноз по скорой помощи: ОРВИ (грипп?). Проведена жаропонижающая терапия. Пациент оставлен под наблюдение участкового врача.

Амбулаторно проведен забор мазков из носо- и ротоглотки для выполнения вирусологического исследования. Назначена терапия противовирусным препаратом: осельтамивир - по 75 мг 2р/день в течение 5 дней. Кроме того, назначена симптоматическая жаропонижающая и муколитическая терапия, постельный режим и обильное питье.

С 1-го дня появления симптоматики пациент самостоятельно применял ингаляции 0,1% раствора Даларгина 2 раза в день с помощью небулайзера и общей дозе 4 мг/сут. После начала ингаляций наблюдалось быстрое снижение клинических проявлений интоксикации. Уже на 2-й день терапии сухой кашель перешел во влажный, улучшился аппетит. Лихорадочный период завершился на 3-и сутки терапии. Полное исчезновение симптомов достигнуто к 5-му дню после начала заболевания (и терапии Даларгином, соответственно).

Результаты вирусологического исследования выявили наличие штамма A/California/07/2009 (H1N1, пандемический штамм).

Диагноз (МКБ-10: J10): грипп средней степени тяжести, вирус гриппа идентифицирован.

Заключение: средняя продолжительность гриппа среднетяжелого течения составляет 6-8 дней при обычной длительности лихорадочного периода (при неосложненном гриппе) около 5-ти дней [25]. Однако, в нашем клиническом примере за счет дополнительного применения ингаляций Даларгина достигнуто существенное сокращение длительности симптомов интоксикации (2-е суток), лихорадки (3-е суток), а также длительности заболевания в целом (5 дней).

Таким образом, назначение Даларгина в виде ингаляций при риске заражения и на ранних стадиях ОРВИ обеспечивает сокращение длительности заболевания, а также профилактику заболевания ОРВИ.

Существующая клиническая картина развития тяжелых осложнений при ОРВИ, в частности, тяжелых форм гриппа и короновирусных инфекций, показывает, что на этап тяжелой формы течения заболеваний приходится более 90% финансовых затрат на лечение и подавляющее количество фактической смертности пациентов. Лечение на стадии осложнений и пневмонии достаточно дорогой и малоэффективный процесс.

Таким образом, наиболее оптимальным способом снижения смертности и уменьшения финансовых затрат на уровне страны является применение даларгина в виде спреевого орошения носовых проходов носоглотки, ротоглотки и ротовой полости или ингаляции у людей, относящихся к группам риска – людям, проживающим с зараженными членами семьи, контактирующим с больными и большими группами населения сотрудникам, силам правопорядка, армии и т.д. При факте заражения применение ингаляции растворами даларгина по описанным схемам позволит с высокой вероятностью не допустить развития осложнений и обеспечить течение заболевания в легкой форме, даже без госпитализации.

Опытная группа/исследуемое вещество	Концентрация, мкг/мл	Показатели ингибирующей активности против вируса							
		PR8 (вирус гриппа)				Ad5 (аденовирус)			
		Титр вируса, lgTCID ₅₀ /0,1 мл	CC ₅₀ , мкг/мл	IC ₅₀ , мкг/мл	SI	Титр вируса, lgTCID ₅₀ /0,1 мл	CC ₅₀ , мкг/мл	IC ₅₀ , мкг/мл	SI
Даларгин	30	4,0	30	0,8	>37,5	3,5	30	2,5	12
Даларгин	10	4,5				4,0			
Даларгин	3,3	5,0				4,0			
Даларгин	1,1	5,0				4,5			
Даларгин	0,4	5,5				4,5			
Контроль вируса	0	5,5				4,5			
Препарат сравнения Ремантадин	5 мкг/мл	–	64	11	5				
Препарат сравнения Ацикловир	30 мкг/мл					–	> 30	> 30	1

Таблица 1

Группы животных	Животных в группе	Смертность по дням							Остаток	Смертность, %	Индекс защиты, %
		5	6	7	8	9	10	11			
1	30	3	4	7	7	5	-	-	4	86,67	-
2	30	-	-	-	-	2	1	-	27*	10,00	88,46
3	30	2	2	5	4	3	1	-	13	56,67	34,61
4	30	-	-	-	-	2	-	1	27*	10,00	88,46
5	30	-	-	-	1	-	1	-	28*	6,67	92,30
6	30	-	-	1	-	-	1	-	28*	6,67	92,30
7	30	2	3	6	6	4	1	1	7	76,67	11,54
8	30	1	3	2	3	3	-	-	18	40,00	53,85
9	30	-	4	4	4	2	1	-	15	50,00	42,31

Таблица 2

Группы животных	Животных в группе	Смертность по дням							Остаток	Смертность, %	Индекс защиты, %
		5	6	7	8	9	10	11			
1	30	3	5	6	7	5	2	1	1	96,67%	-
2	30	-	4	6	3	2	1	-	14	53,33%	44,83%
3	30	2	2	7	5	3	2	-	9	70,00%	27,59%
4	30	2	4	9	-	1	-	1	13	56,67%	41,38%
5	30	-	1	2	3	5	1	-	18	40,00%	58,62%
6	30	-	-	1	1	-	-	-	28	6,67%**	93,10%
7	30	-	-	1	1	1	-	-	27	10,00%**	89,66%
8	30	3	4	4	7	4	2	-	6	80,00%	17,24%
9	30	-	2	3	2	2	-	-	21	30,00%	68,97%
10	30	2	4	2	3	2	1	-	16	46,67%	51,72%

Таблица 3

Список литературы

[1] «Покровский В. И. и др. Грипп и гриппоподобные инфекции, включая особо опасные формы гриппозной инфекции //Фундаментальные и прикладные аспекты изучения: Бюллетень проблемной комиссии. СПб: Роза мира. – 2008. – Т. 109».

[2] «Лазарева Н. Б., Журавлева М. В., Пантелеева Л. Р. ОРВИ: рациональная фармакотерапия с позиции клинической фармакологии //Медицинский совет. – 2016. – №. 4.».

[3] «Sullivan K. M., Monto A. S., Longini Jr I. M. Estimates of the US health impact of influenza //American journal of public health. – 1993. – Т. 83. – №. 12. – С. 1712-1716.».

[4] «По данным отчетов Федерального государственного учреждения здравоохранения «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора РФ». URL: Available at: <http://www.fcgsen.ru>».

[5] «Клинические рекомендации "Тяжелые формы гриппа" 2016, Министерство здравоохранения России, МКБ 10: J10-J11».

[6] «Turner R. B. Epidemiology, pathogenesis, and treatment of the common cold //Annals of allergy, asthma & immunology. – 1997. – Т. 78. – №. 6. – С. 531-540.».

[7] «Эпидемиология, клиника и лечение тяжелых форм вирусно-бактериальных пневмоний, МОНИКИ, Учебное пособие, Москва, 2016».

[8] «Лоскутов О. А., Дружина А. Н., Колесников В. Г. Противовирусная и антибактериальная терапия в лечении внебольничных пневмоний //Медицина неотложных состояний. – 2016. – №. 3 (74).».

[9] «URL: <https://lor-bolezni.ru/pnevmoniya/ingalyatsii-pri-pnevmonii-nebulajzerom.html>, дата обращения 02.07.2019».

[10] «Боровская Т. Ф., Курпас Э. Х., Гориславец С. Н. Опыт использования даларгина в лечении больных внебольничной пневмонией //Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2004. – №. 17.».

[11] «Хугаева В. К. Влияние даларгина на микрогемо-и микролимфоциркуляцию //Бюл. exper. биол. – 1988. – №. 3. – С. 300-302.».

[12] «Лисаченко Г. В. Влияние даларгина на гемодинамику при остром инфаркте миокарда, осложнённом клинической смертью/Лисаченко ГВ, Золоев ГК, Слепушкин ВД //Анест. и реанимат. – 1992. – №. 4. – С. 57-59.».

[13] «Дубынина В. П. Небулайзерная терапия острых и хронических заболеваний дыхательных путей //М: ООО «Интер-Этон», 2008.–48 с. – 2005.».

[14] «Gur D. et al. Inhalational gentamicin treatment is effective against pneumonic plague in a mouse model //Frontiers in microbiology. – 2018. – Т. 9. – С. 741.».

[15] «Méndez L. B., Gookin G., Phalen R. F. Inhaled aerosol particle dosimetry in mice: a review //Inhalation toxicology. – 2010. – Т. 22. – №. 12. – С. 1032-1037.».

[16] «Kolanjiyil A. V. et al. Mice-to-men comparison of inhaled drug-aerosol deposition and clearance //Respiratory physiology & neurobiology. – 2019. – Т. 260. – С. 82-94.».

[17] «Отчет о выполнении НИОКР «Исследование противовирусной активности субстанции Орвидал при интраназальном и внутримышечном введении в различных дозировках и концентрациях в модели гриппозной пневмонии у мышей». ООО «ИФОР». - Томск- 2020 г.».

[18] «Вирусология. Методы / Пер. с англ. Мейхи Б.: 1988; 344.».

[19] «Александровская В. А. и др. Даларгин – фармакологические и клинические аспекты. // Педиатрия, 1993 – № 3 – с. 101-104.».

[20] «Каленикова Е.И., Дмитриева О.Ф., Коробов Н.В., Жуковский С.В., Тищенко В. А., Виноградов В.В. Фармакокинетика даларгина // Вопросы Мед. Химии, 1988, N 1, с. 75-83.».

[21] «Kotzer C.J., Hay D.W., Dondio G., Giardina G., Petrillo P., Underwood D.C. The antitussive activity of delta-opioid receptor stimulation in guinea pigs. J Pharmacol Exp Ther 2000; 292(2): 803–809.».

[22] P. B. M. C. N. P. M. V. P. P. M. N. o. f. t. p. o. d. i. t. i. p. A. J. o. H.-S. P. V. 7. I. 1. 1. J. 2. P. Titilola M. Afolabi.

[23] Патент РФ 2672888 от 18.04.2018. Противовирусное иммунотропное средство для лечения ОРВИ.

[24] Ansaldi, F., Banfi, F., Morelli, P., Valle, L., Durando, P., Sticchi, L., Contos, S., Gasparini, R., & Crovari, P. (2004). SARS-CoV, influenza A and syncytial respiratory virus resistance against common disinfectants and ultraviolet irradiation. Journal of Preventive Medicine and Hygiene, 45(1-2), 5-8.

[25] «Клинические рекомендации «Грипп у взрослых». Некоммерческое партнерство. «Национальное научное общество инфекционистов». Утверждены 30 октября 2014 г».

Формула изобретения

1. Применение тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина диацетата в виде спрея и/или ингаляционной формы для профилактики ОРВИ или предотвращения развития их осложнений.

2. Применение по п.1, отличающееся тем, что тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина диацетат входит в состав композиции, используемой для введения в виде спрея и/или ингаляционного раствора.

3. Применение по п.2, отличающееся тем, что для профилактики ОРВИ применяют ингаляции и/или спрей раствором тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина диацетата с размером частиц 5-50 мкм.

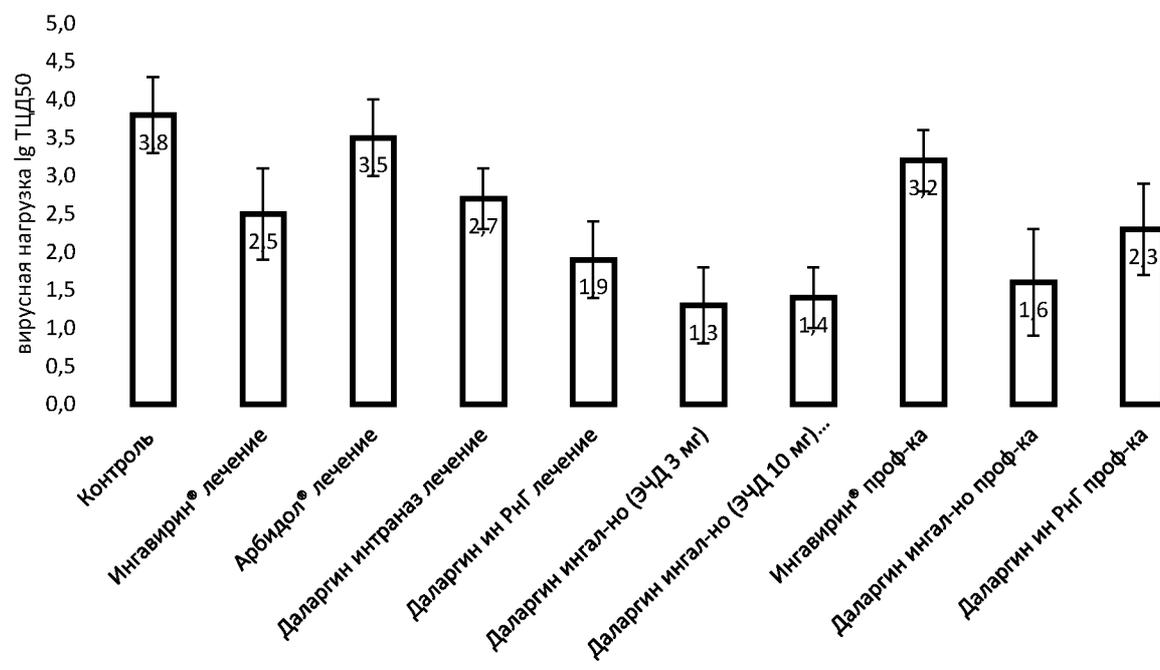
4. Применение по п.2, отличающееся тем, что для защиты от инфицирования ОРВИ производят орошение раствором тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина диацетата всей поверхности носоглотки, ротоглотки, ротовой полости и сублингвально под язык для обеспечения защитного барьерного эффекта на слизистых оболочках.

5. Применение по п.2, отличающееся тем, что для предотвращения развития осложнений при ОРВИ применяют ингаляции раствором тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина диацетата с размером частиц 0,5 – 10 мкм, предпочтительно 0,5-3 мкм.

6. Применение по п.2, отличающееся тем, что в состав композиции, содержащей тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина диацетат, используемой для введения в виде спрея и/или ингаляционного раствора входит ингибитор роста бактерий, например, бензалкония хлорид, как правило в диапазоне 0,005-0,1 масс %, предпочтительно 0,01%.

7. Применение по пп.2 или 6, отличающееся тем, что состав композиции имеет кислый pH в диапазоне от 3 до 7, предпочтительно pH=4,0-5,5.

8. Применение по п.7, отличающееся тем, что в состав композиции, содержащей тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина диацетат, используемой для введения в виде спрея и/или ингаляционного раствора входит ацетатный буфер.



Фиг. 1