

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292142 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.26

(51) Int. Cl. A61K 35/744 (2015.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.03.09

(54) ШТАММЫ БАКТЕРИЙ И ИХ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ
В ЛЕЧЕНИИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ДЫХАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

(31) 102020000005011; 102020000006205

(32) 2020.03.09; 2020.03.24

(33) IT

(86) PCT/IB2021/051954

(87) WO 2021/181272 2021.09.16

(71) Заявитель:
СОФАР С.П.А. (IT)

(72) Изобретатель:
Биффи Андреа, Фьоре Вальтер (IT)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к штаммам бактерий и их композициям для применения в лечении вирусных инфекций дыхательных путей, предпочтительно вызванных коронавирусом, таким как, например, коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (COVID-19), путем стимуляции и/или модулирования цитокинов и/или маркеров, вовлеченных в воспалительные процессы при указанных вирусных инфекциях дыхательных путей.

202292142

A1

A1

202292142

ШТАММЫ БАКТЕРИЙ И ИХ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ДЫХАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

Настоящее изобретение относится к специфическим и отобранным штаммам бактерий и их композициям для применения в лечении вирусных инфекций дыхательных путей, предпочтительно вызванных коронавирусом, таких как, например, коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (COVID-19), путем стимуляции и/или модулирования цитокинов и/или маркеров, вовлеченных в воспалительные процессы при указанных вирусных инфекциях дыхательных путей. В частности, такие специфические штаммы бактерий и их композиции предназначены для применения в стимуляции и/или модулировании профилей цитокинов и/или воспалительных/иммунных путей, снижающем экспрессию по меньшей мере одного провоспалительного маркера и/или стимулирующем экспрессию по меньшей мере одного противовоспалительного маркера.

Вирусные инфекции дыхательных путей, как говорит само название, представляют собой инфекционные заболевания, вызванные вирусами, которые поражают органы верхних и/или нижних отделов дыхательной системы (нос, глотку, гортань, трахею, бронхи и легкие). В частности, настоящее изобретение относится к вирусным инфекциям дыхательных путей, предпочтительно вызванным по меньшей мере одним коронавирусом, таким как, например, коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром, сокращенно обозначаемый SARS (от англ. severe acute respiratory syndrome).

В контексте настоящего изобретения термин «коронавирус» используется для обозначения вируса *семейства Coronaviridae*, подсемейство: *Coronavirinae*, род: *Betacoronavirus*, вид: коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (сокращенно SARSr-CoV, или SARS-коронавирус, или коронавирус), предпочтительно выбранный из следующих штаммов: (I) коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV) (впервые выделен и идентифицирован в 2002 г.), (II) коронавирус-2, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2) (впервые выделен и идентифицирован в 2019

г.) и (III) коронавирус-подобный вирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-подобный вирус).

Коронавирус штамма (I) SARS-CoV имеет происхождение из эпидемии SARS в 2002–2003 гг., при которой инфекция поразила 8000 человек в Азии и вызвала около 700 смертельных случаев. Коронавирус штамма (II) SARS-CoV-2 имел происхождение из эпидемии SARS 2019–2020 гг., которая началась в Китае и распространилась по всему миру; эпидемию SARS, вызванную штаммом SARS-CoV-2, называют COVID-19 (от англ. *CO*rona*VI*rus *D*isease *19*; она также известна как тяжелый острый респираторный синдром, вызванный SARS-CoV-2, или коронавирусная болезнь 2019, или коронавирусный синдром 2019).

Считают, что существует несколько факторов, влияющих на состав кишечной и/или легочной микробиоты индивида, таких как, например, контакт с патогенными организмами, рацион питания и образ жизни, прием лекарственных средств и/или штаммов бактерий внутрь.

В результате интенсивной и обширной деятельности по поиску и разработке автор изобретения идентифицировал, выделил и изучил специфические штаммы бактерий (например, штаммы-пробиотики бактерий или их производные) и их композиции, способные к значимой стимуляции и/или модулированию соответствующих профилей цитокинов и/или воспалительных/иммунных путей, таких как, например, интерлейкины IL-6, IL-8, IL-15, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, рецептор IL-2 (IL-2R), ингибитор синтазы оксида азота (iNOS), оксид азота (NO), белок толл-подобного рецептора 4 (TLR-4), ФНО-альфа и/или интерлейкин IL-10, для лечения вирусных инфекций дыхательных путей (верхних и нижних дыхательных путей), в частности вирусных инфекций дыхательных путей, вызванных по меньшей мере одним вирусом вида коронавирус (например, SARS-CoV-2, или вирус-возбудитель болезни COVID 19), поддержания баланса кишечной микробиоты и его укрепления, и в то же время ограничения кишечной транслокации бактериальных патогенных организмов и, следовательно, риска вторичных бактериальных инфекций.

Штаммы бактерий, выделенные и отобранные в настоящем изобретении, способны к модулированию некоторых воспалительных/иммунных путей, снижающему уровню экспрессии одного или более провоспалительных маркеров и/или стимулирующему уровню экспрессии одного или более противовоспалительных маркеров (например, цитокинов или других биомаркеров). По этой причине указанные

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ

специфические штаммы бактерий и их композиции обоснованно применяют в стимуляции и/или модулировании цитокинов и/или маркеров, вовлеченных в воспалительные процессы, для лечения вирусных инфекций дыхательных путей; преимущественно указанные штаммы бактерий и их композиции обоснованно применяют в способе лечения вирусных инфекций дыхательной системы от коронавируса, предпочтительно коронавируса, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром (например, COVID-19).

В подробном описании для целей настоящего изобретения автор изобретения идентифицировал, выделил и изучил штаммы бактерий, относящихся к роду *Lactobacillus* или *Bifidobacterium*; предпочтительно штаммы бактерий, относящихся к виду, выбранному из: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, более предпочтительно штаммы бактерий (кратко штаммы бактерий или штаммы бактерий по изобретению), идентифицированные как: *Lactobacillus paracasei* DG[®] (товарный знак, зарегистрированный компанией SOFAR S.p.A.), депонированный под депозитарным номером CNCM I-1572 (сокращенно DG[®]), *Lactobacillus paracasei* LPC-S01, депонированный под депозитарным номером DSM 26760 (сокращенно LPC-S01), *Bifidobacterium breve* BbIBS01, депонированный под депозитарным номером DSM 33231 (сокращенно BbIBS01), *Bifidobacterium breve* BbIBS02, депонированный под депозитарным номером DSM 33232 (сокращенно BbIBS02), *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BbIBS01, депонированный под депозитарным номером DSM 33233 (сокращенно BbIBS01), *Lactobacillus plantarum* LpIBS01, депонированный под депозитарным номером DSM 33234 (сокращенно LpIBS01), и *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg или BbIBS01, депонированный под депозитарным номером DSM 32708 (сокращенно MIMBb23sg или BbIBS01).

Все штаммы бактерий, упоминаемые в настоящем изобретении, были депонированы согласно условиям, соответствующим условиям Будапештского договора. Сторона, депонирующая штаммы бактерий, описанные и/или заявленные в настоящей заявке на патент, и их правообладатель выражают свое согласие на предоставление доступа ко всем вышеописанным штаммам в течение всего срока действия патента.

Штаммы бактерий и их композиции, предпочтительно для перорального применения, как указано в настоящем изобретении, эффективны в качестве

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ

модуляторов воспалительных/иммунных путей в значимом снижении уровней экспрессии по меньшей мере одного провоспалительного маркера, такого как, например, IL-6, IL-8, IL-15, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, рецептор IL-2 (IL-2R), iNOS, NO и/или белок TLR-4, и/или в значимой стимуляции (или повышении) уровней экспрессии по меньшей мере одного противовоспалительного маркера, такого как, например, IL-10.

Следовательно, штаммы бактерий по настоящему изобретению и их композиции, благодаря их модулирующему действию на уровни экспрессии вышеупомянутых цитокинов и/или биомаркеров, эффективны в лечении вирусных инфекций и/или воспаления дыхательных путей, предпочтительно вызванных коронавирусом, таким как, например, коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS или COVID-19), и обусловленных ими симптомов или расстройств.

В частности, штаммы бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), продемонстрировали противовирусную активность против SARS-CoV-2.

Для штаммов-пробиотиков бактерий предположили различные механизмы противовирусного действия, включающие: прямое взаимодействие между штаммами бактерий и вирусами, продукцию противовирусных веществ и стимуляцию иммунной системы организма-хозяина. В контексте инфекции SARS-CoV-2 штаммы-пробиотики бактерий, предпочтительно относящихся к роду *Lactobacillus*, могут действовать как барьер против проникновения вируса в клетки-хозяева посредством различных механизмов. Кроме того, введение штаммов-пробиотиков бактерий до, во время или после инфекции COVID-19 повышает естественный иммунитет субъекта.

Результаты, представленные в настоящем описании, полученные в экспериментах *in vitro*, показывают как активность усиления противовирусной иммунной системы под действием штаммов бактерий по настоящему изобретению, предпочтительно относящихся к виду *Lactobacillus paracasei* (например, *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572), так и их способность к предотвращению репликации SARS-CoV-2.

Доказано, что среди прошедших тестирование штаммов-пробиотиков наиболее перспективными в отношении противовирусной иммуномодулирующей активности являются штаммы бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), способные индуцировать

экспрессию интерферона (IFN) и генов, вовлеченных в пути передачи сигналов противовирусного ответа, таких как гены толл-подобного рецептора 7 (TLR7), интерферона, индуцированного доменом геликазы (IFIH), регуляторного фактора интерферона (IRF) 3, IRF7 и митохондриального противовирусного сигнального белка (MAVS).

Это представляет особый интерес в контексте инфекции SARS-CoV-2. Коронавирусы обладают различными механизмами избегания врожденного иммунного ответа, особенно в результате модифицирования ответа IFN I типа. По сравнению с другими респираторными вирусами SARS-CoV-2 индуцирует сниженный противовирусный транскрипционный ответ, характеризующийся низкими уровнями IFN I типа и высокой экспрессией хемокинов. Кроме того, пациенты с тяжелым COVID-19 показали сниженный ответ IFN I типа и более низкий клиренс вируса. Кроме того, подразумевается, что TLR7 является важным образ-распознающим рецептором в распознавании одонитевой РНК (онРНК) CoV, вызывающего ближневосточный респираторный синдром (MERS-CoV; от англ. Middle Eastern Respiratory Syndrome CoV) и CoV, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV), в моделях инфекции на мышах, что делает его вероятным кандидатом функционирования в качестве центрального образ-распознающего рецептора SARS-CoV-2. Полногеномное секвенирование SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 показало, что геном SARS-CoV-2 содержит больше образов онРНК, которые могли бы взаимодействовать с TLR7, чем геном SARS-CoV, что указывает на то, что сигнализация TLR7 может быть более актуальной в патогенезе COVID-19. В нескольких случаях у молодых пациентов мужского пола с тяжелым COVID-19 были идентифицированы редкие предполагаемые варианты X-хромосомы с потерей функции TLR7, которые были ассоциированы с ответами IFN I и II типа.

Несбалансированный иммунный ответ, характеризующийся слабой продукцией интерферонов I типа (IFN-I) и усиленным ответом провоспалительных цитокинов, вносит вклад в несколько форм COVID-19. Кроме того, различные сопутствующие заболевания сопровождаются хроническим системным воспалением низкой степени, которое негативно влияет на исходы у пациентов с COVID-19.

Результаты, представленные в настоящем описании, показывают, что профилактическая обработка или одновременная совместная обработка *in vitro* штаммами бактерий, относящихся к видам *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно

Lactobacillus paracasei DG[®] (CNCM I-1572), подавляли иммунный ответ, триггером которого является SARS-CoV-2, в клетках Caco-2, с учетом того, что уровни транскрипции провоспалительных цитокинов IL-6, IL8 и TSLP1 были снижены относительно контроля.

Кроме того, также наблюдали, что комбинация штаммов бактерий *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) и *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 (DSM 26760) положительно модулирует противовирусные иммунные ответы в большей степени относительно штамма *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), при этом дополнительно показано их действие, снижающее репликацию вирусов и модулирующее провоспалительные ответы, индуцированные вирусом SARS-CoV-2, которое даже в этом случае проявляется в большей степени относительно штамма *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103).

Таким образом, профилактическое и/или радикальное применение штаммов бактерий в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно относящихся к виду *Lactobacillus paracasei* (например, *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 или комбинации *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) и *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 (DSM 26760), вносит вклад в ослабление чрезмерного воспалительного ответа, индуцированного инфекцией SARS-CoV-2.

Штаммы бактерий по настоящему изобретению и их композиции не имеют значимых побочных эффектов, и их можно вводить всем категориям нуждающимся в этом субъектов, включая пожилых людей, беременных или кормящих женщин, субъектов педиатрической категории (0–12 лет), субъектов с сердечно-сосудистыми осложнениями, субъектов с сахарным диабетом, субъектов с нарушенным иммунитетом (вследствие врожденного или приобретенного заболевания или получающих лечение иммуносупрессантами, либо субъектов, которые перенесли операцию трансплантации) или субъектов с другими сопутствующими заболеваниями.

Кроме того, штаммы бактерий по настоящему изобретению и их композиции просты в приготовлении и экономически эффективны.

Эти и другие объекты, которые будут прояснены в последующем подробном описании, достигнуты за счет штаммов бактерий, композиций и смесей по настоящему изобретению благодаря их техническим характеристикам, представленным в описании и заявленным в прилагаемой формуле изобретения.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1^о-С схематично представлены рисунки из исследований *in vitro* по оценке противовирусных ответов клеток кишечного эпителия Сасо-2 после: (А) отсутствия обработки штаммом бактерий в соответствии с настоящим изобретением, (В) предварительной обработки штаммом бактерий в соответствии с настоящим изобретением, и (С) одновременной обработки штаммом бактерий в соответствии с настоящим изобретением, в каждом случае относительно обработки вирусом SARS-CoV-2.

На Фиг. 2А–С изображено действие штамма бактерий в соответствии с настоящим изобретением на панель цитокинов/хемокинов и молекул, обладающих противовирусным действием или вовлеченных в противовирусные ответы, продуцируемых эпителиальными клетками кишечника Сасо-2, по сравнению с действием штамма *L. rhamnosus* GG ATCC 53103.

На Фиг. 3А–С изображено действие штамма бактерий в соответствии с настоящим изобретением на панель цитокинов/хемокинов и молекул, обладающих противовирусным действием или вовлеченных в противовирусные ответы, продуцируемых клетками кишечного эпителия Сасо-2, после предварительной обработки указанной композицией, по сравнению с обработкой вирусом SARS-CoV-2.

На Фиг. 4А–С представлен уровень экспрессии вирус-специфических генов, которые кодируют РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp) и ген Е (CoVE), и профиль экспрессии цитокинов (провоспалительных и противовоспалительных) в клетках Сасо-2, инфицированных *in vitro* SARS-CoV-2, предварительно обработанных или не обработанных штаммом-пробиотиком бактерий в соответствии с настоящим изобретением, а также сравнение с действием штамма *L. rhamnosus* GG ATCC 53103.

На Фиг. 5А–В представлен уровень экспрессии вирус-специфических генов, которые кодируют РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp) и ген Е (CoVE), и профиль экспрессии цитокинов (провоспалительных и противовоспалительных) в клетках Сасо-2, инфицированных *in vitro* SARS-CoV-2, одновременно обработанных или не обработанных штаммом-пробиотиком бактерий в соответствии с настоящим изобретением, а также сравнение с действием штамма *L. rhamnosus* GG ATCC 53103.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ

Считают, что штаммы бактерий по настоящему изобретению могут играть роль в вовлечении желудочно-кишечного тракта в вирусные инфекции дыхательных путей. Действительно, кишечная микробиота тесно связана с легочной микробиотой посредством кишечно-легочной оси. Внутри кишечно-легочной оси бактерии, вирусы и мицеты тесно взаимодействуют друг с другом посредством прямых и непрямых механизмов, в которых, в частности, задействованы иммунные/воспалительные клетки. Изменение кишечной микробиоты может в результате приводить к усилению кишечной проницаемости, сопряженному с повышенным риском транслокации патогенных организмов (например, бактерий и/или вирусов), что может оказывать негативное воздействие на легочную микробиоту.

В литературе имеются сообщения о присутствии вирусных нуклеиновых кислот в образцах кала некоторых пациентов с COVID-19, и сообщали, что вирус связывается с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ 2), который обнаруживается в эпителиальных клетках легких и тонкого кишечника.

На основании взаимного влияния в кишечно-легочной оси предположили, что даже несмотря на отсутствие прямых клинических доказательств терапевтической роли модулирования кишечной микробиоты в лечении COVID-19, штаммы-пробиотики бактерий могут модулировать кишечную микробиоту таким образом, что она благоприятно влияет на симптомы и защищает дыхательную систему.

Кроме того, при инфицировании дыхательных путей коронавирусом (например, COVID-19), наблюдалось повышение уровня некоторых провоспалительных маркеров, таких как IL-6, IL-8, IL-1, семейство IL-1 (в частности IL-1b) и IL-2R (IL сокращенно обозначает интерлейкин) и снижение уровня противовоспалительных маркеров, таких как IL-10, что, вероятно, связано с изменением кишечной микробиоты, при котором характерно уменьшение количества бактерий, относящихся к роду *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*.

Например, наблюдалось, что вирус SARS-CoV-2, инфицируя верхние и нижние дыхательные пути, может вызывать легкий или очень острый респираторный синдром, приводящий в результате к высвобождению провоспалительных цитокинов, в том числе IL-1 β и IL-6.

Кроме того, наблюдали, что существуют статистически значимые различия ($p < 0,05$) по уровням экспрессии рецептора интерлейкина-2 (IL-2R) и IL-6 в сыворотке крови пациентов с коронавирусной инфекцией либо легкой, либо серьезной, либо

критической степени тяжести заболевания ($p < 0,05$); на основании повышенной экспрессии (IL-2R) и IL-6 в сыворотке крови можно прогнозировать тяжесть пневмонии 2019-nCoV и давать прогноз для пациентов.

Таким образом, было показано, что подавление провоспалительных цитокинов семейства IL-1 и особенно интерлейкина IL-6 обладает терапевтическим эффектом при многих воспалительных заболеваниях, включая вирусные инфекции дыхательных путей, предпочтительно вызванные коронавирусом.

Штаммы бактерий, такие как пробиотики или их производные, способны оказывать полезное действие на баланс микробиоты и тем самым восстанавливать нарушенный кишечный барьер и затруднять транслокацию бактериальных и вирусных патогенных организмов, посредством продукции КЦЖК (короткоцепочечных жирных кислот), повышения экспрессии белков, которые формируют плотные контакты, таких как окклюдин и зонулин, что, таким образом, улучшает барьерную функцию и положительно модулирует различные воспалительные/иммунные пути.

Объект настоящего изобретения образует штамм бактерий для применения в способе профилактического и/или радикального лечения вирусных инфекций и/или воспаления дыхательной системы у нуждающегося в этом субъекта, предпочтительно вирусных инфекций дыхательной системы, вызванных коронавирусом, более предпочтительно коронавирусом, вызывающим тяжелый острый респираторный синдром (например, SARS-CoV или COVID-19), и обусловленных или вызванных им заболеваний, или симптомов, или расстройств, где указанный штамм бактерий относится к роду *Lactobacillus* или *Bifidobacterium*, предпочтительно где указанный штамм бактерий относится к виду, выбранному из: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* *subsp. lactis* и *Bifidobacterium bifidum*, еще более предпочтительно, где указанный штамм бактерий относится к виду *Lactobacillus paracasei*, такому как, например, *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) и/или *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 (DSM 26760).

Объект настоящего изобретения образует по меньшей мере один штамм бактерий (кратко, штамм/ы бактерий по изобретению), выбранный из группы, содержащей:

- (а) штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* DG[®] (товарный знак, зарегистрированный компанией SOFAR S.p.A.) и депонированный в Национальной

коллекции культур микроорганизмов в Институте Пастера в Париже под депозитарным номером CNCM I-1572 (депонирован 5 мая 1995 г. компанией Sofar S.p.A под названием *Lactobacillus casei* подв. *casei* под N° CNCM I-1572, и впоследствии его классификация изменена на *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572; следует отметить, что он по-прежнему и исключительно представляет собой один и тот же штамм бактерий независимо от названия *Lactobacillus casei* DG[®] CNCM I-1572 или *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572),

- (b) штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 и депонированный в немецкой коллекции микроорганизмов (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ)) под депозитарным номером DSM 26760 (депонирован 11 января 2013 г. компанией Sofar S.p.A, и 15 мая 2017 по запросу этот депозит был преобразован в депозит согласно Будапештскому договору),

- (c) штамм бактерий, относящийся к виду *Bifidobacterium breve*, идентифицированный как *Bifidobacterium breve* BbIBS01 и депонированный в *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33231 (депонирован 31 июля 2019 г. компанией Sofar S.p.A),

- (d) штамм бактерий, относящийся к виду *Bifidobacterium breve*, идентифицированный как *Bifidobacterium breve* BbIBS02 и депонированный в *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33232 (депонирован 31 июля 2019 г. компанией Sofar S.p.A.),

- (e) штамм бактерий, относящийся к виду *Bifidobacterium animalis*, идентифицированный как *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BbIBS01 и депонированный в *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33233 (депонирован 31 июля 2019 г. компанией Sofar S.p.A.),

- (f) штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus plantarum*, идентифицированный как *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 и депонированный в *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33234 (депонирован 31 июля 2019 г. компанией Sofar S.p.A.),

- (g) штамм бактерий, относящийся к виду *Bifidobacterium bifidum*, идентифицированный как *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg или BbIBS01, или его

производное, где указанный штамм бактерий был депонирован в *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ) под депозитарным номером DSM 32708 (депонирован 4 декабря 2017 г. компанией Sofar S.p.A);

или, альтернативно, состоящей из них,

где указанный по меньшей мере один штамм бактерий предназначен для применения в модулировании по меньшей мере одного воспалительного/иммунного пути, при этом указанное модулирование включает в себя или альтернативно состоит в следующем:

- снижение уровней экспрессии по меньшей мере одного провоспалительного маркера, выбранного из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: интерлейкин IL-6, IL-8, IL-15, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, рецептор IL-2 (IL-2P), iNOS (индуцибельная синтаза оксида азота), NO (оксид азота), белок TLR-4, ФНО-альфа и их смеси, и/или

- повышение уровней экспрессии противовоспалительного маркера IL-10;

где указанный по меньшей мере один штамм бактерий, посредством указанного модулирования воспалительных/иммунных путей, предназначен для применения в способе профилактического и/или радикального лечения вирусных инфекций и/или воспаления дыхательной системы у нуждающегося в этом субъекта, предпочтительно вирусных инфекций дыхательной системы, вызванных коронавирусом, более предпочтительно коронавирусом, вызывающим тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV, например, SARS-CoV-2 или COVID-19), и обусловленных или вызванных им заболеваний, или симптомов, или расстройств.

Классификация штаммов бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei*, изменена согласно номенклатуре на *Lacticaseibacillus paracasei*.

Предмет описания настоящего изобретения *Bifidobacteria*, такие как *Bifidobacterium breve* BbIBS01 (DSM 33231), *Bifidobacterium breve* BbIBS02 (DSM 33232), *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BlIBS01 (DSM 33233), имеют человеческое происхождение и обнаруживаются в природе в кишечнике человека; при этом *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 (DSM 33234) была выделена из желудочно-кишечного тракта человека.

Объект настоящего изобретения образует композиция для применения в способе профилактического и/или радикального лечения вирусных инфекций и/или воспаления дыхательной системы у нуждающегося в этом субъекта, предпочтительно вирусных

инфекций дыхательной системы, вызванных коронавирусом, более предпочтительно коронавирусом, связанным с тяжелым острым респираторным синдромом (например, SARS-CoV или COVID-19), и обусловленных или вызванных им заболеваний, или симптомов, или расстройств, где указанная композиция содержит: (i) смесь М, содержащая или альтернативно состоящая из одного штамма бактерий рода *Lactobacillus* или *Bifidobacterium*, предпочтительно где указанный штамм бактерий относится к виду, выбранному из: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* нодв. *lactis* и *Bifidobacterium bifidum*, еще более предпочтительно где указанный штамм бактерий относится к виду *Lactobacillus paracasei*, такому как, например, *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572, *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760; и, возможно, указанная композиция дополнительно содержит (ii) по меньшей мере одну приемлемую добавку и/или один приемлемый эксципиент фармацевтического класса.

Объект настоящего изобретения образует композиция (сокращенно композиция по изобретению), содержащая:

(i) смесь М (сокращенно смесь М по изобретению), содержащую или альтернативно состоящую из по меньшей мере одного штамма бактерий, выбранного из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572, *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231, *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232, *Bifidobacterium animalis* нодв. *lactis* BbIBS01 DSM 33233, *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234 и *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg или BbIBS01 DSM 32708 и их смесь; и, возможно,

(ii) по меньшей мере одну приемлемую добавку и/или один приемлемый эксципиент фармацевтического класса;

где указанная по меньшей мере одна композиция предназначена для применения в модулировании по меньшей мере одного воспалительного/иммунного пути, при этом указанное модулирование содержит или альтернативно состоит из:

- снижения уровней экспрессии по меньшей мере одного провоспалительного маркера, выбранного из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: интерлейкина IL-6, IL-8, IL-15, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, рецептора IL-2 (IL-2R), iNOS, NO, белка TLR-4, ФНО-альфа и их смеси, и/или

- повышения уровней экспрессии противовоспалительного маркера IL-10;

где указанная композиция, посредством указанного модулирования воспалительных/иммунных путей, предназначена для применения в способе профилактического и/или радикального лечения вирусных инфекций дыхательной системы (дыхательных путей) у нуждающегося в этом субъекта, предпочтительно вирусных инфекций дыхательной системы, вызванных коронавирусом, более предпочтительно коронавирусом, вызывающим тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV, например, SARS или COVID-19), и обусловленных или вызванных им заболеваний, или симптомов, или расстройств.

Объект настоящего изобретения образует способ профилактического и/или радикального лечения вирусной инфекции и/или воспаления дыхательной системы у нуждающегося в этом субъекта, предпочтительно вирусных инфекций и/или воспаления дыхательной системы, вызванных коронавирусом, или SARS-CoV (или COVID-19), и обусловленных им заболеваний, или симптомов, или расстройств, посредством введения (перорально или путем ингаляции) терапевтически эффективного количества указанного по меньшей мере одного штамма бактерий или его композиции по настоящему изобретению.

В контексте настоящего изобретения выражение «значимое» снижение, или повышение, или модулирование, или стимуляция может, например, использоваться для указания на «значимое с точки зрения статистики» или «значимое с клинической точки зрения». Кроме того, «значимое с точки зрения статистики» (или просто «статистически значимое») можно понимать как $p < 0,1$, или $p < 0,05$, или $p < 0,01$.

Предпочтительно штаммы бактерий по настоящему изобретению или композиции по настоящему изобретению предназначены для применения в значимом снижении уровней экспрессии провоспалительного цитокина IL-6 и/или IL-8.

Предпочтительно штаммы бактерий по настоящему изобретению или композиция по настоящему изобретению предназначены для применения в значимом повышении (или стимуляции) уровней экспрессии противовоспалительного цитокина IL-10.

Например, штаммы бактерий по настоящему изобретению или композиция по настоящему изобретению предназначены для применения в значимом снижении уровней экспрессии провоспалительного цитокина IL-6 и/или IL-8 и в значимом повышении (или стимуляции) уровней экспрессии противовоспалительного цитокина IL-10.

Таким образом, штаммы бактерий по настоящему изобретению или композиции по настоящему изобретению для применения в качестве модуляторов воспалительных/иммунных путей, ведущих к отношению ответов $Th1/Th2 \leq 1 - 1$, например, изменения уровней экспрессии по меньшей мере одного, выбранного из IL-6, IL-8, IL-15, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, рецептора (IL-2R), iNOS, NO и белок TLR-4 и ФНО-альфа измеряют для Th1, при этом изменения уровней экспрессии IL-10 или других подходящих Th2 измеряют для Th2.

В случае вирусных инфекций наблюдали, что отношение Th1/Th2 в большей степени смещено в сторону ответа Th1, который, как только индуцирован, приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов (например, IL-6) и снижению уровня противовоспалительных цитокинов (например, IL-10). Таким образом, необходимо как можно скорее подавлять ответ Th1 и уравнивать Th1/Th2 таким образом, чтобы воспаление и последующее повреждение тканей можно было контролировать.

Симптомы или расстройства, обусловленные или вызванные указанной вирусной инфекцией дыхательных путей, предпочтительно коронавирусом (например, SARS-CoV, SARS-CoV-2, SARS-CoV-подобный) или коронавирусом, вызывающим тяжелый острый респираторный синдром (например, SARS или COVID-19), могут представлять собой: респираторные осложнения, астму, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), бронхит, эмфизему, муковисцидоз, кашель, коклюш, пневмонию, плеврит, бронхиолит, простудное заболевание, синусит, ринит, трахеит, фарингит, ларингит, острый ларинготрахеобронхит, эпиглоттит, бронхоэктаз, затрудненное дыхание, лихорадку, утомляемость, мышечную боль, мышечную болезненность, заложенность носа, насморк, першение в горле, желудочно-кишечные симптомы, такие как, например, тошнота и диарея, почечную недостаточность, потерю аппетита и/или общее недомогание.

В одном воплощении указанная композиция по изобретению не содержит лактоферрин или его производное (например, аполактоферрин, лактоферрицин) и/или N-ацетилцистеин или его соль и/или гиалуроновую кислоту или ее соль.

Упомянутые выше штаммы бактерий, присутствующие в смеси М композиции по изобретению, могут представлять собой жизнеспособные штаммы бактерий (или пробиотики), производные штаммов бактерий, такие как парaproбиотики, лизаты-постбиотики, тиндализованные и/или инактивированные, полученные в соответствии со способами и оборудованием, известными специалистам в данной области техники.

«Пробиотики» представляют собой живые и жизнеспособные микроорганизмы (т. Е. штаммы бактерий), которые при введении в надлежащем количестве приносят пользу здоровью хозяина; термин «пробиотики» относится к микроорганизмам, присутствующим в пищевых продуктах или добавленным к ним (определение Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО) и Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ)).

В контексте настоящего изобретения термин «производное» штамма бактерий (или «производное» жизнеспособного штамма бактерий) используется для указания на штамм бактерий, тиндализированный, или обработанный ультразвуком, или инаktivированный с использованием других методов, известных специалистам в данной области техники (например, с использованием гамма-лучей), либо лизаты штамма бактерий или экстракты штамма бактерий (сокращенно парaproбиотики), либо любое производное и/или компонент штамма бактерий, предпочтительно экзополисахарид, пристеночную фракцию, метаболиты или биопродукты метаболизма, образуемые штаммом бактерий (сокращенно постбиотики) и/или любой продукт, полученный из штамма бактерий. Предпочтительно термин «производное» штаммов бактерий по настоящему изобретению используется для указания на тиндализированный или инаktivированный штамм бактерий (например, с использованием гамма-лучей).

Иными словами, термин «производное» жизнеспособного штамма-пробиотика бактерий в контексте настоящего изобретения по существу используется для указания на парaproбиотик или постпробиотик.

В контексте настоящего изобретения термин «парaproбиотики» используется для указания на клетки бактерий (интактные или разрушенные), которые являются нежизнеспособными (т. е. неспособны к репликации), или к неочищенным клеточным экстрактам, которые при введении в надлежащем количестве приносят пользу здоровью хозяина (подобно жизнеспособному штамму бактерий, из которого они получены). Примерами парaproбиотиков являются штаммы бактерий, инаktivированные нагреванием (например, тиндализированные штаммы бактерий), соникацией (ультразвуком), гамма-облучением (гамма-лучами), или лизаты штаммов бактерий, или экстракты штаммов бактерий.

В контексте настоящего изобретения термин «постбиотики» используется для указания на любое вещество, высвобождаемое или продуцируемое посредством

метаболической активности жизнеспособного штамма-пробиотика бактерий, где указанные постбиотики при введении в надлежащем количестве приносят пользу здоровью хозяина (подобно жизнеспособному штамму бактерий, из которого они получены). Примерами постбиотиков являются экзополисахариды, пристеночные фракции, метаболиты или биопродукты метаболизма.

В соответствии с предпочтительным аспектом смесь М композиции по изобретению содержит или альтернативно состоит из штамма бактерий, относящегося к виду *Lactobacillus paracasei*.

Предпочтительно смесь М композиции по изобретению содержит или альтернативно состоит из штамма *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572.

Альтернативно смесь М композиции по изобретению может содержать или альтернативно состоять из штамма *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и штамма LPC-S01 DSM 26760.

Показано, что штамм *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 обладают идеальными характеристиками для усиления кишечной микробиоты и модулирования соответствующих воспалительных/иммунных путей таким образом, что обладают эффективностью в способе лечения вирусных инфекций у нуждающихся в этом субъектов, предпочтительно вирусных инфекций дыхательной системы, вызванных коронавирусом, более предпочтительно коронавирусом, вызывающим тяжелый острый респираторный синдром (SARS или COVID-19).

В частности, штамм *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 можно применять в лечении вирусных заболеваний по настоящему изобретению при условии, что они могут снижать уровни экспрессии интерлейкинов IL-6, IL-8, IL-15 или семейства IL-1 (например, IL-1 α и/или IL-1 β), IL-2, рецептора (IL-2R), iNOS (тем самым контролируя высвобождение NO) и/или белка TLR-4, ФНО-альфа; кроме того, штамм *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 может стимулировать уровни экспрессии IL-10.

Кроме того, наблюдали, что:

- *L. casei* DG[®] CNCM I-1572 и/или *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 выживают во время транзита по желудочно-кишечному тракту и достигают кишечника живыми и жизнеспособными. Тестирование *L. casei* DG[®] CNCM I-1572 было проведено в исследованиях извлечения; исследования извлечения являются единственным

доказательством, что этот штамм действительно способен к прохождению через желудочно-кишечный тракт и колонизации в кишечнике человека;

- *L. casei* DG[®] CNCM I-1572 способен к положительному модулированию структуры/функции кишечной микробиоты, тем самым оказывая благоприятное действие на баланс микробиоты посредством статистически значимого увеличения популяций *Lactobacilli* (которые уменьшаются у пациентов с коронавирусной инфекцией) и посредством сокращения популяций патогенных и/или условно-патогенных бактерий;

- *L. casei* DG[®] CNCM I-1572 и/или *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 способны к положительному модулированию воспалительных/иммунных путей, индуцируя статистически значимое снижение IL-1 α , IL-15, IL-6 и IL-8 и статистически значимое повышение IL-10. Для *L. casei* DG[®] CNCM I-1572 такой эффект может объясняться присутствием его особого ЭПС (экзополисахарида), который покрывает бактерию подобно своего рода естественной «микроинкапсуляции»;

- *L. casei* DG[®] CNCM I-1572 индуцирует статистически значимое повышение уровней короткоцепочечных жирных кислот в кале, таких как ацетат и особенно бутират.

Ниже приведены дополнительные примеры композиции по изобретению в зависимости от изменения смеси М.

Указанная смесь М по изобретению может содержать или альтернативно состоять из: (a) *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 или его производного, и, кроме того, смеси штаммов бактерий, содержащей (c) *B. breve* BbIBS01 DSM 33231, (d) *B. breve* BbIBS02 DSM 33232, (e) *B. animalis* подв. *lactis* BlIBS01 DSM 33233, (f) *L. plantarum* LpIBS01 DSM 33234 и, возможно, (g) *B. bifidum* MIMBb23sg = BbfIBS01 DSM 32708 или их производные.

Указанная смесь М по изобретению может содержать или альтернативно состоять из: (a) *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 или его производного и (b) *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 или его производного и, кроме того, смеси штаммов бактерий, содержащей (c) *B. breve* BbIBS01 DSM 33231, (d) *B. breve* BbIBS02 DSM 33232, (e) *B. animalis* подв. *lactis* BlIBS01 DSM 33233, (f) *L. plantarum* LpIBS01 DSM 33234 и, возможно, (g) *B. bifidum* MIMBb23sg = BbfIBS01 DSM 32708 или их производные.

Указанная смесь М по изобретению может содержать или альтернативно состоять из: (a) *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 или его производного и, кроме того, по

меньшей мере одного штамма бактерий (или его производного), выбранного из: (с) *B. breve* BbIBS01 DSM 33231, (d) *B. breve* BbIBS02 DSM 33232, (e) *B. animalis* подв. *lactis* BbIBS01 DSM 33233, (f) *L. plantarum* LpIBS01 DSM 33234 и (g) *B. bifidum* MIMBb23sg = BbfIBS01 DSM 32708, и их смеси.

Указанная смесь М по изобретению может содержать или альтернативно состоять из: (a) *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 или его производного и b) *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 или его производного и, кроме того, по меньшей мере один штамм бактерий (или его производное), выбранный из: (с) *B. breve* BbIBS01 DSM 33231, (d) *B. breve* BbIBS02 DSM 33232, (e) *B. animalis* подв. *lactis* BbIBS01 DSM 33233, (f) *L. plantarum* LpIBS01 DSM 33234 и (g) *B. bifidum* MIMBb23sg = BbfIBS01 DSM 32708, и их смеси.

Композиция по изобретению, содержащая указанную смесь М в соответствии с любым из воплощений настоящего изобретения, предпочтительно содержащую или альтернативно состоящую из штамма *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или штамма *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, кроме того, она может содержать по меньшей мере один пребиотик, например, выбранный из: инулина, фруктоолигосахарида (FOS), галактоолигосахарида (GOS), гуаровой камеди и их смеси; предпочтительно инулина.

Например, композиция по изобретению может содержать или альтернативно состоять из штамма *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и штамма *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 и инулина.

Кроме того, композиция по изобретению, содержащая указанную смесь М в соответствии с любым воплощением настоящего изобретения, предпочтительно содержащую или альтернативно состоящую из штамма *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или штамма *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 и возможно по меньшей мере одного пребиотика (например, инулина), может дополнительно содержать:

- по меньшей мере один витамин, такой как, например, витамины из группы В, витамин С, витамин D, витамин А и витамин Е; и/или
- вещества-антиоксиданты, такие как, например, глутатион, полифенолы, такие как ресвератрол и транс-ресвератрол, коэнзим Q10, астаксантин, ликопин; и/или
- растительные экстракты (*растительного происхождения*), такие как *Echinacea*, *Uncaria tomentosa*, ферментированная папайя, ягоды и имбирь (*Zingiber officinale*); и/или

- минеральные вещества, такие как, например, цинк, селен, магний, железо, калий, медь; и/или
- аминокислоты, такие как глутамин, аргинин, триптофан; и/или
- омега-3 жирные кислоты.

Лекарственные формы композиций по настоящему изобретению в соответствии с любым из описанных воплощений можно готовить для перорального применения, для назальной ингаляции (например, спрей или капли), для пероральной ингаляции (например, спрей, сухие порошки для ингаляции). В контексте настоящего изобретения термин для перорального применения используется для указания как на пероральное (или гастроэнтеральное) введение, так и на подъязычное (или трансбуккальное) введение.

При включении композиции по настоящему изобретению в лекарственную форму для перорального применения она может находиться в твердой форме, выбранной из: таблеток, жевательных таблеток, трансбуккальных таблеток, гранул, хлопьев, растворимого порошка или гранул, растворимого порошка или гранул для перорального применения, капсул; или альтернативно в жидкой форме, выбранной из: растворов, суспензий, дисперсий, эмульсий, жидкости, которую можно дозировать в форме спрея, сиропов; или альтернативно в полужидкой форме, выбранной из: мягкого геля, геля; предпочтительно композиция по изобретению предназначена для перорального применения в твердой или жидкой форме.

Предпочтительно указанный по меньшей мере один штамм бактерий или смесь штаммов бактерий присутствует в композиции по изобретению (или присутствует каждый штамм бактерий) в концентрации, включенной в диапазон от 10×10^6 КОЕ до 10×10^{12} КОЕ, предпочтительно от 10×10^8 КОЕ до 10×10^{10} КОЕ, более предпочтительно в концентрации около 10×10^8 КОЕ или 10×10^9 КОЕ, относительно суточной дозы (КОЕ: *колониеобразующая единица*).

Вышеуказанные суточные дозы можно вводить нуждающемуся в этом субъекту в виде однократной дозы (одной дозы) или в многократных дозах, например, две, три или четыре суточные дозы.

Композиции по изобретению в соответствии с любым из описанных воплощений могут быть предназначены для применения в качестве вспомогательной терапии дополнительных подходов к лечению вирусных инфекций дыхательной системы,

предпочтительно коронавируса, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром (например, COVID-19).

Композиция по изобретению, содержащая указанную смесь М в соответствии с любым из воплощений настоящего изобретения, может дополнительно содержать указанную по меньшей мере одну добавку и/или один эксципиент фармацевтического или пищевого класса, т. е. вещество, не обладающее терапевтической активностью, подходящее для фармацевтического или пищевого применения. В контексте настоящего изобретения добавки и/или эксципиенты, приемлемые для фармацевтического или пищевого применения, содержат все вспомогательные вещества, известные специалистам в данной области техники для приготовления композиций в твердой, мягкой или жидкой форме, такие как, например, разбавители, растворители (в том числе вода, глицерин, этиловый спирт), солюбилизаторы, подкисляющие вещества, загустители, подсластители, агенты, усиливающие вкус и аромат, красящие вещества, смазывающие вещества, поверхностно-активные вещества (ПАВ), консерванты, стабилизаторы, стабилизирующие буферные растворы и их смеси.

Если не указано иное, выражение «композиция, или смесь, или другое, содержащее компонент в количестве, «включенном в диапазон от х до у» используется для указания на то, что указанный компонент может присутствовать в композиции, или смеси, или другого во всех количествах, присутствующих в указанном диапазоне, даже если оно не указано, включая крайние значения диапазона.

Если не указано иное, указание на то, что композиция или смесь «содержит» один или более компонентов или веществ, означает, что другие компоненты или вещества могут присутствовать помимо того или тех, которые указаны конкретно.

В контексте настоящего изобретения выражение «способ лечения» используется для указания на вмешательство у нуждающегося в этом субъекта, включающее в себя введение терапевтически эффективного количества (в соответствии с известным специалистам в данной области техники) штамма бактерий, или композиции, или смеси веществ с целью устранения, сокращения/уменьшения или профилактики заболевания или болезненного состояния и его симптомов или расстройств.

В контексте настоящего изобретения термин «субъект/ы» используется для указания субъектов-людей или животных, предпочтительно млекопитающих (например, домашних животных, таких как собаки, кошки, лошади, овцы или крупный

рогатый скот). Предпочтительно композиции по изобретению предназначены для применения в способах лечения субъектов-людей.

ПРИМЕРЫ

Примером композиции в соответствии с изобретением является коммерческий продукт Enterolactis® (товарный знак, зарегистрированный компанией Sofar S. p. A, Италия), содержащий штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572.

Дополнительным примером композиции в соответствии с изобретением является коммерческий продукт Enterolactis® Duo (товарный знак, зарегистрированный от имени и по поручению компании Sofar S. p. A, Италия), содержащий штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572 и инулин (Enterolactis® Duo).

Ниже представлены воплощения настоящего изобретения FR -A (№№).

FR-A1. Композиция для применения в способе лечения вирусной инфекции дыхательной системы у нуждающегося в этом субъекта и обусловленных ею заболеваний или симптомов, где указанная композиция содержит: (i) смесь (M), содержащую или альтернативно состоящую из по меньшей мере одного штамма бактерий, выбранного из: *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572, *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231, *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232, *Bifidobacterium animalis* nov. lactis BbIBS01 DSM 33233, *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234, *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg = BbfIBS01 DSM 32708 и их смеси; и, возможно, (ii) по меньшей мере одну приемлемую добавку и/или один приемлемый эксципиент фармацевтического класса.

FR-A2. Композиция для применения в соответствии с FR-A1, где указанная композиция предназначена для применения в способе лечения вирусной инфекции дыхательной системы, вызванной коронавирусом, предпочтительно вирусом SARS-CoV-2, у нуждающегося в этом субъекта и обусловленных ею заболеваний или симптомов.

FR-A3. Композиция для применения в соответствии с FR-A1 или 2, где указанная композиция предназначена для применения в способе лечения коронавируса, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром (SARS или COVID-19), у нуждающегося в этом субъекта и обусловленных им заболеваний или симптомов.

FR-A4. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-A1-3, где указанная композиция модулирует по меньшей мере один воспалительный/иммунный путь посредством:

- снижения уровней экспрессии по меньшей мере одного провоспалительного маркера, выбранного из интерлейкина IL-6 и/или интерлейкина IL-8; и/или
- повышения уровней экспрессии противовоспалительного маркера IL-10.

FR-A5. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-A1-4, где указанная композиция модулирует по меньшей мере один воспалительный/иммунный путь посредством:

- снижения уровней экспрессии по меньшей мере одного провоспалительного маркера, выбранного из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: интерлейкин IL-6, IL-8, IL-15, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, рецептор IL-2 (IL-2R), iNOS, NO, белок TLR-4, ФНО-альфа и их смеси, и/или
- повышения уровней экспрессии противовоспалительного маркера IL-10.

FR-A6. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-A1-5, где указанные обусловленные заболевания или симптомы выбраны из: респираторных осложнений, астмы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), бронхита, эмфиземы, муковисцидоза, кашля, коклюша, пневмонии, плеврита, бронхоолита, простудного заболевания, синусита, ринита, трахеита, фарингита, ларингита, острого ларинготрахеобронхита, эпиглоттита, бронхоэктаза, затрудненного дыхания, лихорадки, утомляемости, мышечной боли, мышечной болезненности, заложенности носа, насморка, першения в горле, тошноты, диареи, почечной недостаточности и потери аппетита.

FR-A7. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-A1-6, где указанная смесь (M) содержит штамм *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572.

FR-A8. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-A1-6, где указанная смесь (M) содержит штамм *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760.

FR-A9. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-A1-8, где указанная композиция дополнительно содержит по меньшей мере один пребиотик; предпочтительно указанный по меньшей мере один пребиотик выбран из: инулина, фруктоолигосахарида (FOS), галактоолигосахарида (GOS), гуаровой камеди и их смесей, предпочтительно инулина.

FR-A10. Штамм бактерий для применения в способе лечения в соответствии с любым из FR-A1–6, где указанный штамм бактерий выбран из группы, состоящей из: *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572; *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760; *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231; *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232; *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BbIBS01 DSM 33233; *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234; и *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg (= BbIBS01) DSM 32708.

Ниже представлены воплощения настоящего изобретения FR-B (№№).

FR-B1. Композиция для применения в способе лечения вирусной инфекции дыхательной системы, вызванной вирусом, относящимся к виду коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV), у нуждающегося в этом субъекта, таким как коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром, и обусловленных ею заболеваний или симптомов, где указанная композиция содержит:

(i) смесь (M), содержащую или альтернативно состоящую из по меньшей мере одного штамма бактерий, относящегося к виду *Lactobacillus paracasei*; и возможно:

(ii) по меньшей мере одну приемлемую добавку и/или один приемлемый эксципиент фармацевтического класса.

FR-B2. Композиция для применения в соответствии с FR-B1, где указанный по меньшей мере один штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, выбран из группы, содержащей:

- штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* DG[®] и депонированный компанией в Национальной коллекции культур микроорганизмов института Пастера в Париже под депозитарным номером CNCM I-1572,

- штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[™] и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 26760,

и их смесь;

или, альтернативно, состоящей из них.

FR-B3. Композиция для применения в соответствии с FR-B1 или FR-B2, где указанный коронавирус представляет собой вирус штамма коронавируса-2,

вызывающего тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2), ответственного за заболевание COVID-2019.

FR-B4. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-B1- FR-B3, где указанная композиция предназначена для перорального применения.

FR-B5. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-B1–FR-B4, где указанная смесь (M) состоит из штамма *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572.

FR-B6. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-B1–FR-B4, где указанная смесь (M) состоит из штамма *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и штамма *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760.

FR-B7. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-B1–FR-B6, где указанная смесь (M) дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный штамм бактерий, выбранный из группы, содержащей:

- штамм бактерий, относящийся к виду *Bifidobacterium breve*, идентифицированный как *Bifidobacterium breve* BbIBS01 и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33231,

- штамм бактерий, относящийся к виду *Bifidobacterium breve*, идентифицированный как *Bifidobacterium breve* BbIBS02 и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33232,

- штамм бактерий, относящийся к виду *Bifidobacterium animalis*, идентифицированный как *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BbIBS01 и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33233,

- штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus plantarum*, идентифицированный как *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33234,

- штамм бактерий, относящийся к виду *Bifidobacterium bifidum*, идентифицированный как *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg = BbfIBS01 и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 32708, и

- их смесь;

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ

или, альтернативно, состоящей из них.

FR-B8. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-B1–FR-B7, где указанная смесь (M) содержит штамм *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и, кроме того, дополнительный штамм бактерий, выбранный из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231, *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BlIBS01 DSM 33233, *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234, *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg (= BbIBS01) DSM 32708 и их смесь, или альтернативно, состоит из них.

FR-B9. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-B1–FR-B8, где указанный по меньшей мере один штамм бактерий представляет собой пробиотический жизнеспособный бактериальный штамм, или парабиотик, или постбиотик.

FR-B10. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-B1–FR-B9, где указанная композиция дополнительно содержит по меньшей мере один пребиотик; предпочтительно указанный по меньшей мере один пребиотик выбран из: инулина, фруктоолигосахарида (FOS), галактоолигосахарида (GOS), гуаровой камеди и их смесей, предпочтительно инулина.

FR-B11. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-B1–FR-B10, где указанные обусловленные заболевания или симптомы выбраны из: респираторных осложнений, астмы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), бронхита, эмфиземы, муковисцидоза, кашля, коклюша, пневмонии, плеврита, бронхиолита, простудного заболевания, синусита, ринита, трахеита, фарингита, ларингита, острого ларинготрахеобронхита, эпиглоттита, бронхоэктаза, затрудненного дыхания, лихорадки, утомляемости, мышечной боли, мышечной болезненности, заложенности носа, насморка, першения в горле, тошноты, диареи, почечной недостаточности и потери аппетита.

FR-B12. Штамм бактерий для применения в способе лечения в соответствии с любым из FR-B1–FR-B11, где указанный штамм бактерий выбран из группы, состоящей из:

- *Lactobacillus paracasei* DG[®], депонированный в Национальной коллекции культур микроорганизмов института Пастера в Париже под депозитарным номером CNCM I-1572;

- *Lactobacillus paracasei* LPC-S01, депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 26760;
- *Bifidobacterium breve* BbIBS01, депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33231;
- *Bifidobacterium breve* BbIBS02, депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33232;
- *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BlIBS01, депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33233;
- *Lactobacillus plantarum* LpIBS01, депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33234; и
- *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg = BbfIBS01, депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 32708.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1. Цель

Автор изобретения провел исследования *in vitro* в целях оценки способности композиций в соответствии с настоящим изобретением, содержащих по меньшей мере один штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, такой как *Lactobacillus paracasei* DG® (CNCM I-1572) и/или *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 (DSM 26760), стимулировать врожденный противовирусный иммунный ответ у субъекта таким образом, чтобы бороться с вирусной инфекцией, в частности вирусной инфекцией дыхательных путей, вызванной вирусом SARS-CoV-2 (COVID-19).

В частности, проводили следующие оценки *in vitro*:

(1) способность композиций в соответствии с настоящим изобретением усиливать противовирусные ответы в клетках кишечного эпителия (противовирусный иммуномодулирующий эффект); и

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ

(2) способность композиций в соответствии с настоящим изобретением оказывать влияние на инфекцию SARS-CoV-2 в клетках кишечного эпителия человека (модель инфекции SARS-CoV-2 *in vitro*).

2. Материал

2.1. Клетки, вирусы, штаммы бактерий и реактивы.

Линию клеток аденокарциномы ободочной кишки человека Caco-2 (ATCC® HTB-37™) и

линию эпителиальных клеток почек обезьяны Vero E6 (ATCC® CRL-1586™)

культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) с добавлением 10% (об/об) фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 1% (об/об) натрия пирувата и 1% (об/об) пенициллина/стрептомицина (все получено от компании Gibco-Thermo Fisher Scientific, г. Уолтем, США) при 37°C в увлажненном инкубаторе, содержащем 5% CO₂.

Штаммы-пробиотики бактерий, такие как:

- *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), новая номенклатура *Lacticaseibacillus rhamnosus*;

- *Lactobacillus paracasei* DG® (CNCM I-1572; *L. casei* DG®, Enterolactis®, SOFAR SpA), новая номенклатура *Lacticaseibacillus paracasei*;

- *L. Lactobacillus paracasei* LPC-S01 (DSM 26760), новая номенклатура *Lacticaseibacillus paracasei*; и

- *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg (или BbfIBS01) (DSM 32708).

Штаммы культивировали на чашках со средой MRS (среда де Мана-Рогоза-Шарпа, Difco, BD) и инкубировали в течение 72 часов при 37°C в анаэробных условиях.

Штамм GG (ATCC 53103) был приобретен в Американской коллекции типовых культур (ATCC), тогда как поставщиком штаммов DG® (CNCM I-1572), LPC-S01 (DSM 26760) и MIMBb23sg (DSM 32708) была компания Sofar SpA (г. Милан, Италия).

В качестве контроля для теста вводили стерильную среду DMEM с высоким содержанием глюкозы с добавлением 20% глицерина.

2.2. Приготовление и титрование исходных вирусных культур

SARS-CoV-2 был выделен у пациента отделения микробиологии Университетской клиники в Падуе. Штамм вируса был размножен на клетках Vero E6 и охарактеризован с помощью полногеномного секвенирования. Титр вируса определяли с помощью метода анализа бляшкообразования. Кратко, конфлюэнтные клетки VERO

Е6 в 24-луночных планшетах (Costar, Merck, Италия) инокулировали 10-кратными серийными разведениями исходной вирусной культуры в течение 1 часа. Затем питательную среду удаляли, и клетки инкубировали со свежей средой, содержащей карбоксиметилцеллюлозу (СМС, Merck). Клетки фиксировали через 72 часа после инфекции (п. и.) 5% масс./об. формальдегидом (Merck) и окрашивали кристаллическим фиолетовым (Merck). Титр вируса измеряли в бляшкообразующих единицах (БОЕ/мл) на основании подсчета бляшек, образовавшихся в культуре клеток после инфекции. Все эксперименты по инфицированию проводили в лаборатории 3-го уровня биологической безопасности (BSL-3) на кафедре молекулярной медицины Университета Падуи, г. Падуя, Италия.

2.3. Подготовка штаммов бактерий.

2.3.1. Жизнеспособные клетки

Жидкие культуры готовили в бульоне де Мана-Рогоза-Шарпа (MRS) путем инкубации в течение 18 часов при 37°C в анаэробных условиях. После инкубации штаммы центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об/мин, и осадки клеток дважды промывали стерильной дистиллированной водой. Оптическую плотность при 600 нм (OD₆₀₀) отмытых культур доводили до 0,3, чтобы достичь $2,5 \times 10^6$ КОЕ в объеме 20 мкл. Стандартизованные отмытые культуры разводили серийно для подсчета жизнеспособных клеток и центрифугировали в течение десяти минут при 3000 об/мин. Осадки ресуспендировали в стерильной среде DMEM (Gibco-Thermo Fisher Scientific, г. Уолтем, США) с добавлением 20% глицерина (Merck).

3. Способы

3.1. Культура клеток Сасо-2 и дизайн эксперимента

Клетки Сасо-2 высевали в 12-луночные планшеты (2×10^5 клеток/мл). После достижения конфлюэнтности клетки промывали 1-кратным фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ) (Gibco-Thermo Fisher Scientific, г. Уолтем, США) и инкубировали в среде без антибиотиков (AFM) или подвергали одной из следующих обработок (Фиг. 1).

Обработка одними пробиотиками в отсутствие вируса SARS-CoV-2 (Фиг. 1A).

Предварительная обработка пробиотиками относительно обработки вирусом SARS-CoV-2 (Фиг. 1B).

К конфлюэнтным клеткам Сасо-2 добавляли штамм бактерий (жизнеспособный; множественность инфекции (МИ) 1:10).

Через 3 часа клетки промывали 1-кратным ФСБ (Gibco-Thermo Fisher Scientific, г. Уолтем, США) и инкубировали со свежей средой с добавлением антибиотиков (пенициллин/стрептомицин), затем инфицировали SARS-CoV-2 (МИ 1:2) в течение 1 часа. Через 24 часа п.и. клетки собирали для экстракции РНК.

Одновременная обработка пробиотиками и вирусом SARS-CoV-2 (Фиг. 1С).

К конфлюэнтным клеткам Caco-2 добавляли штамм бактерий (жизнеспособный; МИ 1:10) вместе с SARS-CoV-2 (МИ 1: 2). Через 3 часа клетки промывали и инкубировали со свежей средой еще в течение 24 часов, после чего собирали для экстракции РНК.

3.2. Экстракция РНК и ПЦР в режиме реального времени

Суммарную РНК выделяли с помощью набора реактивов E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit I (Omega Bio-Tek, Tebu-Bio, Италия), следуя инструкциям производителя. Загрязняющую ДНК удаляли путем инкубации с наборами свободных от РНКаз ДНКаз I (Omega Bio-Tek). Синтез и амплификацию комплементарной ДНК проводили с помощью набора реактивов iTaq[™] Universal Probes One-Step Kit (Bio-Rad, г. Милан, Италия) в соответствии с рекомендациями производителя в системе для определения последовательностей ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Экспрессию целевого гена нормализовали по экспрессии гена сравнения GAPDH.

Данные представлены в виде средней кратности изменения по сравнению с контролем.

3.3. Статистический анализ.

Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SD (SD: Стандартное отклонение). Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism Software 6.0 (GraphPad Software Inc., г. Ла-Холья, США). Сравнения проводили с использованием двустороннего t-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$ (на фигурах показаны следующие обозначения: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4. Результаты.

4.1. Штаммы-пробиотики *Lacticaseibacillus* повышают противовирусный иммунный ответ *in vitro*.

Антивирусные иммуномодулирующие эффекты штаммов-пробиотиков *Lacticaseibacillus* оценивали *in vitro* с использованием клеток кишечного эпителия человека Caco-2.

Как показано на Фиг. 2А–2С, обработка штаммами-пробиотиками бактерий в соответствии с настоящим изобретением, такими как *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), индуцировала значимые изменения профиля экспрессии нескольких генов, вовлеченных в противовирусный иммунный ответ.

Уровень противовирусного цитокина интерферона альфа (ИФН-альфа 1) значительно улучшался под действием штамма *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), и отмечалась тенденция к повышающей регуляции интерферона бета (ИФН-бета 1) (Фиг. 2А).

Кроме того, *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) вызывал значимое повышение экспрессии TLR7, который является образ-распознающим рецептором, вовлеченным в обнаружение РНК-вируса, гена IFIH1, кодирующего MDA5, который является молекулярным сенсором вирусной РНК, а также IRF3, IRF7 и MAVS, которые участвуют в противовирусных сигнальных путях ответа (Фиг. 2В и 2С).

На основании этих результатов по усилению противовирусного иммунного ответа штамм *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) был выбран для дальнейшего тестирования.

4.2. Ингибирующее действие штаммов-пробиотиков *Lactobacillus paracasei* на репликацию SARS-CoV-2 *in vitro*.

Для оценки противовирусной активности нескольких штаммов-пробиотиков против SARS-CoV-2 был проведен анализ инфекции SARS-CoV-2 в клетках Сасо-2.

Перед инфицированием вирусом клетки предварительно обрабатывали штаммами-пробиотиками в течение 3 часов, а затем инфицировали SARS-CoV-2 в течение 1 часа (Фиг. 1В). Уровень экспрессии вирус-специфических генов, кодирующих РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp) и ген Е (CoVE), которые являются критичными для сборки SARS-CoV-2, анализировали на суммарной РНК, полученной из собранных клеток.

Наблюдалась значимая индукция экспрессии обоих генов (RdRp и CoVE) в клетках Сасо-2, обработанных *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) (Фиг. 4А), что указывает на возможность ингибирования репликации SARS-CoV-2 *in vitro* предварительной обработкой штаммами-пробиотиками.

Кроме того, также оценивали титр SARS-CoV-2 на собранных супернатантах: после предварительной обработки *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) определили ингибирование инфекции SARS-CoV-2 на 45,8% и сравнили с ремдесивиром, который является противовирусным лекарственным средством широкого спектра действия (Gilead

Sciences) (Фиг. 3А, значение выражено в виде ингибирования, и Фиг. 3В, значение выражено в виде эффективности).

4.3. Предварительная обработка штаммами бактерий по настоящему изобретению защищает против воспалительного ответа, триггером которого является SARS-CoV-2, *in vitro*.

Известно, что под действием инфекции SARS-CoV-2 уровни провоспалительных и профибротических цитокинов увеличиваются, и в самых тяжелых случаях вследствие сверхпродукции провоспалительных цитокинов прогноз для пациентов может значительно ухудшиться.

Чтобы определить, может ли предварительная обработка штаммами-пробиотиками защищать от воспалительного ответа, триггером которого является инфекция SARS-CoV-2, *in vitro*, было проведено тестирование профиля экспрессии воспалительных и противовоспалительных цитокинов в инфицированных SARS-CoV-2 клетках Сасо-2, предварительно обработанных или не обработанных *L. paracasei* (Фиг. 4). Все измеренные уровни транскрипции всех цитокинов после инфекции SARS-CoV-2 проявляли тенденцию к повышающей регуляции (данные не представлены).

В частности, предварительная обработка инфицированных клеток Сасо-2 штаммом *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), приводила к значимому снижению уровней экспрессии мРНК генов IL6, IL8 и TSLP1 и повышению уровней экспрессии генов IL10 (Фиг. 4А–4С) относительно контроля и относительно обработки *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103).

Кроме того, также наблюдали, что предварительная обработка инфицированных клеток Сасо-2 штаммом *B. bifidum* MIMBb23sg (= BbfIBS01) DSM 32708 вызывала значимое снижение уровней экспрессии мРНК генов IL6, IL8 и TSLP1 и уровней экспрессии вирус-специфических генов, кодирующих РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), и гена Е (CoV-E) (Фиг. 4А–4С) относительно контроля и относительно обработки *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103).

4.4. Одновременная обработка штаммами бактерий по настоящему изобретению защищает против воспалительного ответа, триггером которого является SARS-CoV-2, *in vitro*.

Результаты, аналогичные представленным в параграфе 4.3, были получены в исследовании с одновременной обработкой клеток Сасо-2 (Фиг. 1С и Фиг. 5А–В).

5. Вывод.

Полученные результаты показали, что штаммы бактерий в соответствии с настоящим изобретением, относящиеся к виду *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), обладают способностью к положительному модулированию противовирусных и противовоспалительных ответов и, таким образом, полезны в качестве вспомогательной терапии при противовирусной терапии SARS-CoV2.

В частности, тесты *in vitro* настоящего исследования показывают как активность усиления противовирусной иммунной системы, так и способность к предотвращению репликации SARS-CoV-2 примерно на 50% в результате применения композиций по настоящему изобретению.

Доказано, что среди прошедших тестирование штаммов-пробиотиков наиболее перспективными в отношении противовирусной иммуномодулирующей активности являются штаммы бактерий, относящиеся к виду *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), способные индуцировать экспрессию интерферона (ИФН) и генов, вовлеченных в пути передачи сигналов противовирусного ответа, таких как гены толл-подобного рецептора 7 (TLR7), интерферона, индуцированного доменом геликазы (ИФН), регуляторного фактора интерферона (IRF) 3, IRF7 и митохондриального противовирусного сигнального белка (MAVS).

Кроме того, профилактическая обработка или одновременная обработка *in vitro* штаммами бактерий, относящимися к виду *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), вызывает подавление воспалительного ответа, триггером которого является инфекция SARS-CoV-2 в клетках Сасо-2, с учетом того, что уровни транскрипции провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8 и TSLP1 были снижены относительно контроля.

Таким образом, профилактическое применение штаммов бактерий в соответствии с настоящим изобретением, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), или их композиций вносит вклад в ослабление избыточного воспалительного ответа, индуцированного инфекцией SARS-CoV-2.

Как известно из литературы, было показано, что штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) является штаммом-пробиотиком, выдерживающим транзит по желудочно-кишечному тракту, как у взрослых, так и у детей.

В настоящем исследовании штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) показал усиленную активность по сравнению со штаммом *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), то есть относительно пробиотика, более широко изученного и используемого в литературе и обладающего документально подтвержденными иммуномодулирующими свойствами.

Хотя механизм, поддерживающий наблюдаемую в данном исследовании противовирусную активность *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), неизвестен, предполагают, что богатая рамнозой молекула гетероэкзополисахарида (ЭПС), покрывающего клетки этой бактерии, может вносить вклад в особые перекрестные взаимодействия *Lactobacillus paracasei* DG[®] с клетками-хозяевами.

Кроме того, наблюдали, что комбинация штаммов бактерий *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) и *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 (DSM 26760) положительно модулирует противовирусные иммунные ответы в большей степени относительно штамма *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), при этом дополнительно показано их действие, снижающее репликацию вируса и модулирующее провоспалительные ответы, индуцированные вирусом SARS-CoV-2, которое даже в этом случае проявляется в большей степени относительно штамма *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для применения в способе лечения вирусной инфекции дыхательной системы, вызванной вирусом, относящимся к виду коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV), у нуждающегося в этом субъекта, таким как коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром, и обусловленных ею заболеваний или симптомов, где указанная композиция содержит:

(1) смесь (M), содержащая или альтернативно включающая в свой состав по меньшей мере один штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*; и возможно

(2) по меньшей мере одну приемлемую добавку и/или по меньшей мере один приемлемый эксципиент фармацевтического класса.

2. Композиция для применения по п. 1, где указанный по меньшей мере один штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, выбран из группы, содержащей или альтернативно включающей в свой состав:

- штамм бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* DG[®] и депонированный в Национальной коллекции культур микроорганизмов института Пастера в Париже под депозитарным номером CNCM I-1572,

- штамм бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[™] и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 26760,

и их смесь.

3. Композиция для применения по п. 1 или 2, где указанный коронавирус представляет собой вирус штамма коронавирус-2, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2), являющийся возбудителем заболевания COVID-2019.

4. Композиция для применения по любому из п. п. 1–3, где указанная композиция предназначена для перорального применения.

5. Композиция для применения по любому из п. п. 1–4, где указанная смесь (M) включает в свой состав штамм *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572.

6. Композиция для применения по любому из п. п. 1–4, где указанная смесь (М) включает в свой состав штамм *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760.

7. Композиция для применения по любому из п. п. 1–6, где указанная смесь (М) дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный штамм бактерий, выбранный из группы, содержащей:

- штамм бактерий, относящихся к виду *Bifidobacterium breve*, идентифицированный как *Bifidobacterium breve* BbIBS01 и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером депозита DSM 33231,

- штамм бактерий, относящихся к виду *Bifidobacterium breve*, идентифицированный как *Bifidobacterium breve* BbIBS02 и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером депозита DSM 33232,

- штамм бактерий, относящихся к виду *Bifidobacterium animalis*, идентифицированный как *Bifidobacterium animalis* *noëv. lactis* BbIBS01 и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером депозита DSM 33233,

- штамм бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus plantarum*, идентифицированный как *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером депозита DSM 33234,

- штамм бактерий, относящихся к виду *Bifidobacterium bifidum*, идентифицированный как *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg = BbIBS01 и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером депозита DSM 32708, и

- их смесь;

или, альтернативно, состоящей из них.

8. Композиция для применения по любому из п. п. 1–7, где указанная смесь (М) содержит штамм *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и, кроме того, дополнительный штамм бактерий, выбранный из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231, *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232, *Bifidobacterium animalis noëv. lactis* BbIBS01

DSM 33233, *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234, *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg (= BbIBS01) DSM 32708 и их смесь, или, альтернативно, состоит их них.

9. Композиция для применения по любому из п. п. 1–8, где указанный по меньшей мере один штамм бактерий представляет собой пробиотический жизнеспособный бактериальный штамм, или парабиотик, или постбиотик.

10. Композиция для применения по любому из п. п. 1–9, где указанная композиция дополнительно содержит по меньшей мере один пребиотик; предпочтительно указанный по меньшей мере один пребиотик выбран из: инулина, фруктоолигосахарида (FOS), галактоолигосахарида (GOS), гуаровой камеди и их смесей, предпочтительно инулина.

11. Композиция по любому из п. п. 1–10, где указанные обусловленные заболевания или симптомы выбраны из: респираторных осложнений, астмы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), бронхита, эмфиземы, муковисцидоза, кашля, коклюша, пневмонии, плеврита, бронхиолита, простудного заболевания, синусита, ринита, трахеита, фарингита, ларингита, острого ларинготрахеобронхита, эпиглоттита, бронхоэктаза, затрудненного дыхания, лихорадки, утомляемости, мышечной боли, мышечной болезненности, заложенности носа, насморка, першения в горле, тошноты, диареи, почечной недостаточности и потери аппетита.

12. Штамм бактерий для применения в способе лечения по любому из п. п. 1–11, где указанный штамм бактерий выбран из группы, состоящей из:

- *Lactobacillus paracasei* DG[®], депонированный в Национальной коллекции культур микроорганизмов института Пастера в Париже под депозитарным номером CNCM I-1572;

- *Lactobacillus paracasei* LPC-S01, депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 26760;

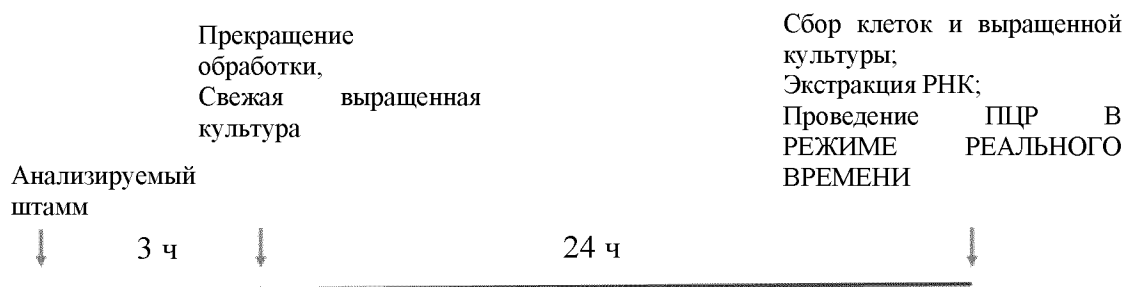
- *Bifidobacterium breve* BbIBS01, депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33231;

- *Bifidobacterium breve* BbIBS02, депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33232;

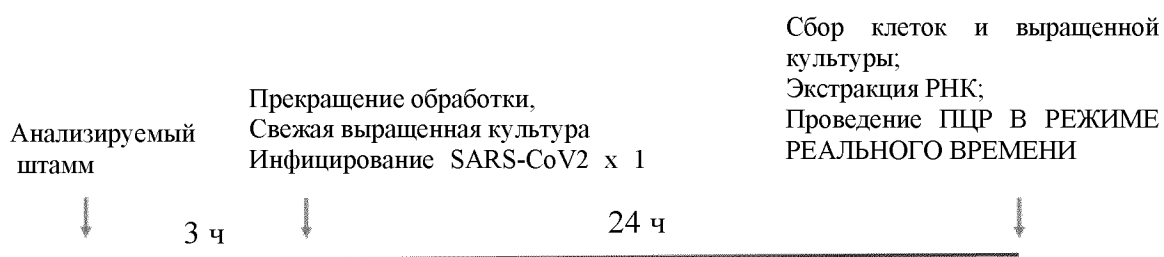
- *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* B1IBS01, депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33233;

- *Lactobacillus plantarum* LpIBS01, депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33234; и

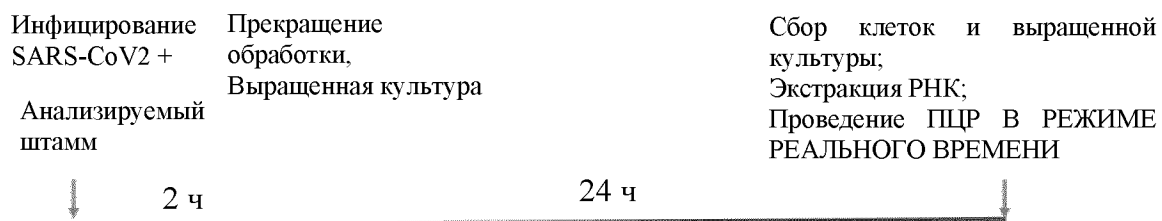
- *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg = BbfIBS01, депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 32708.



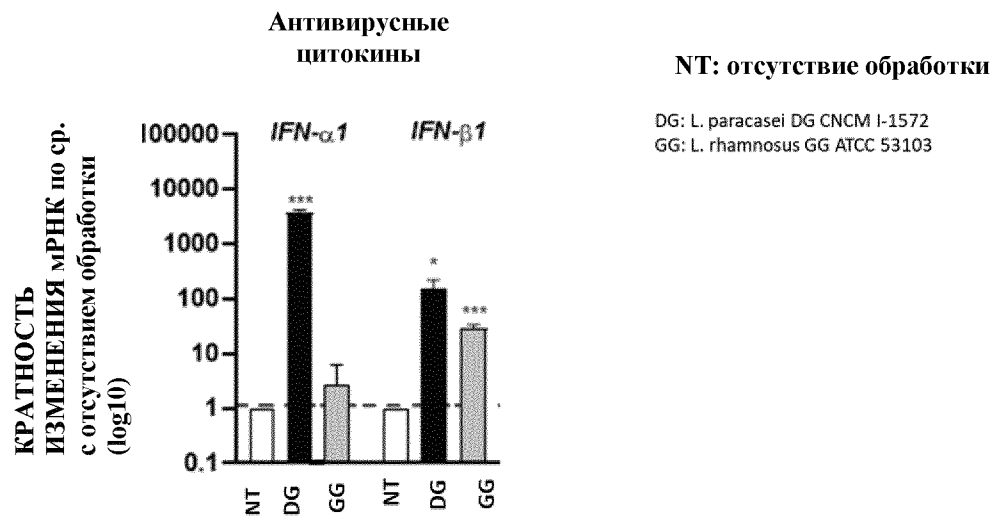
ФИГ. 1А



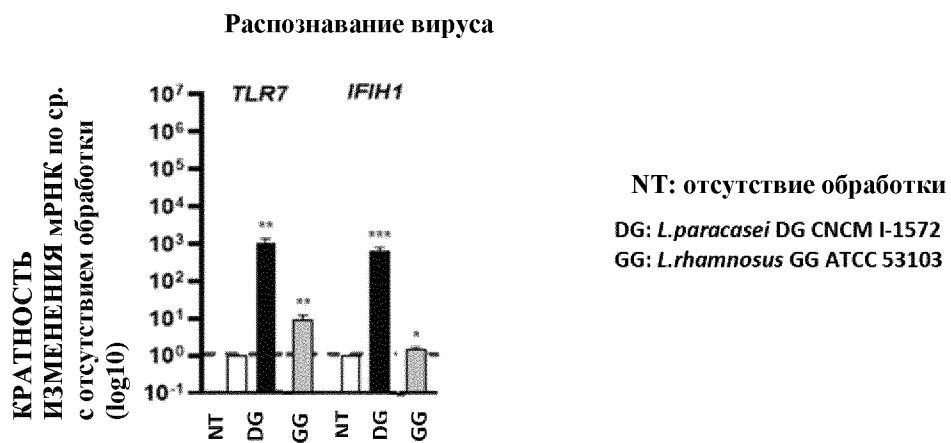
Фиг. 1В



Фиг. 1С

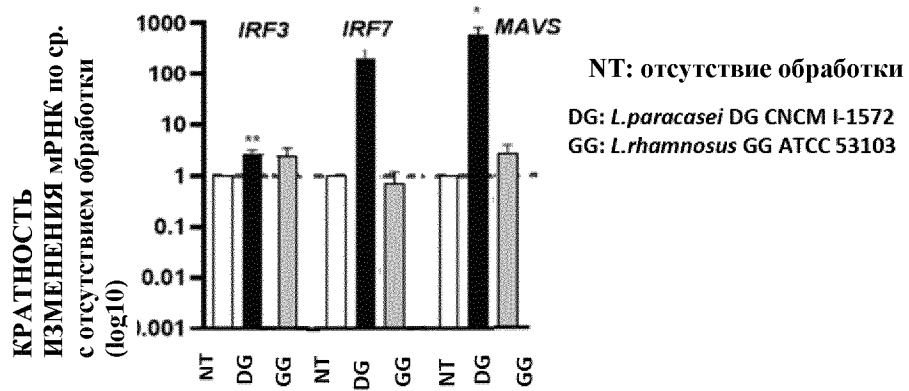


ФИГ. 2А



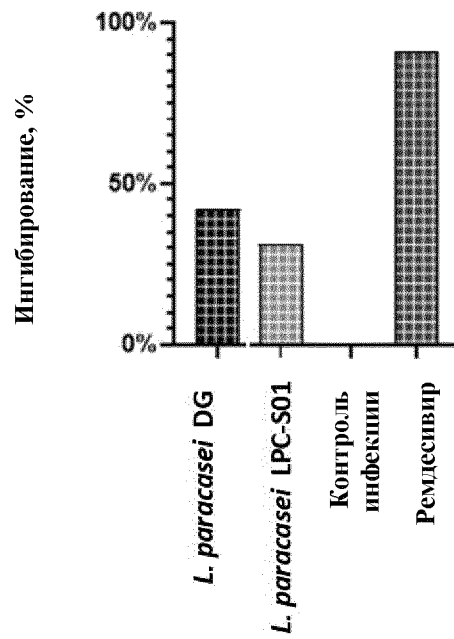
Фиг. 2В

Передача сигнала антивирусного ответа

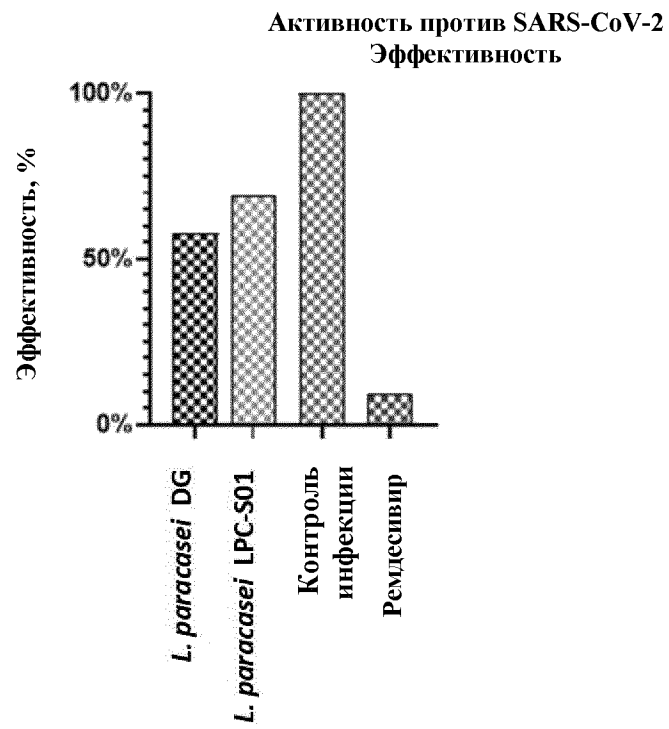


Фиг. 2С

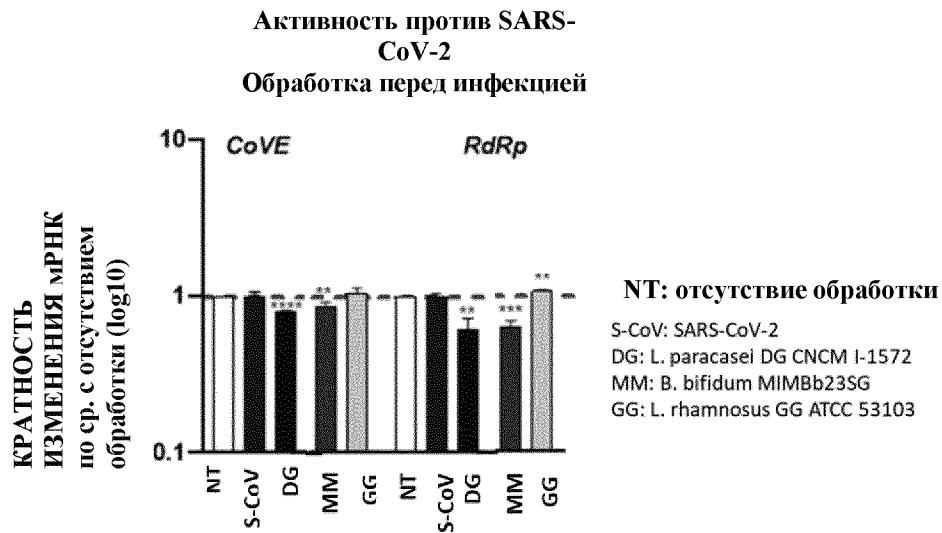
Активность против SARS-CoV-2 Ингибирование



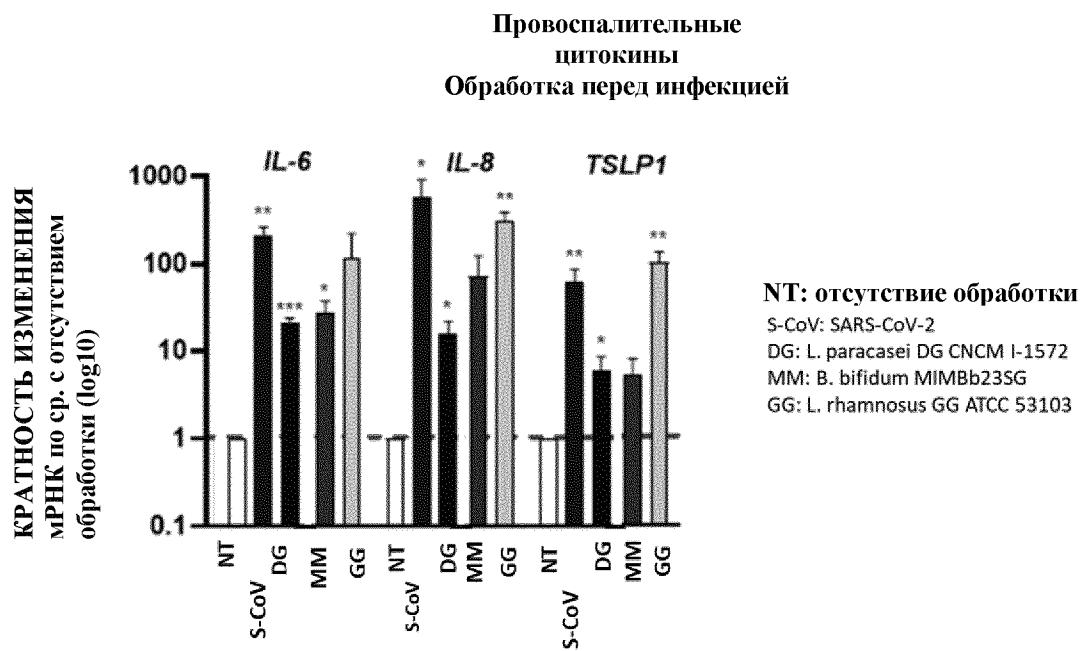
ФИГ. 3А



Фиг. 3В



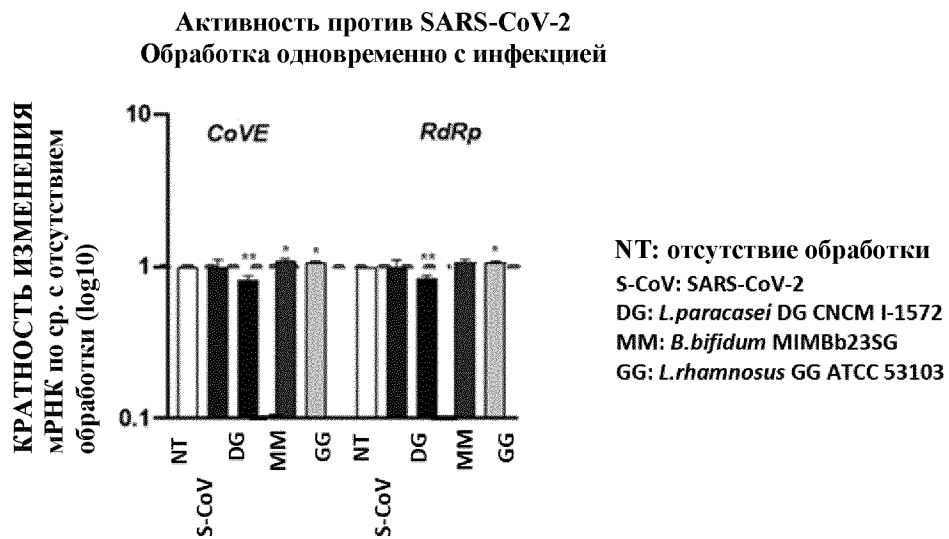
ФИГ. 4А



Фиг. 4В

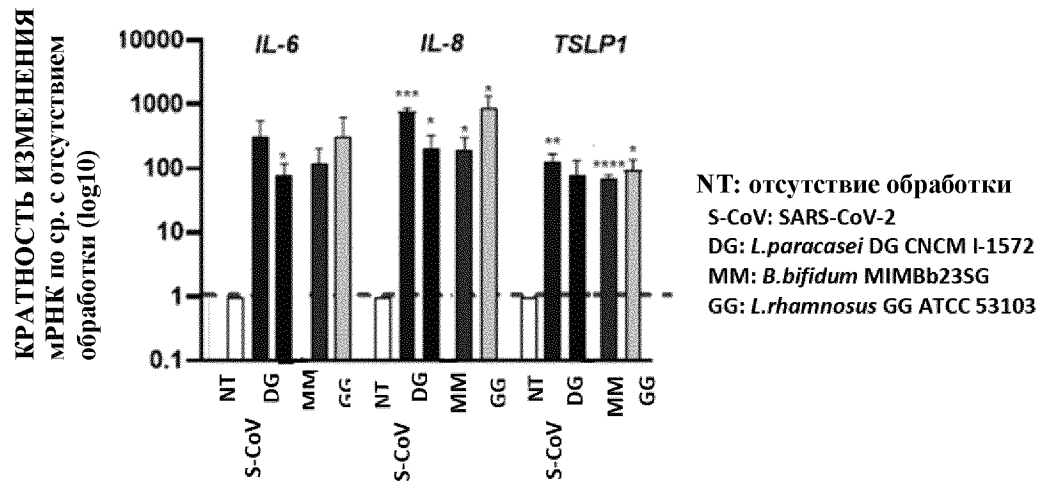


Фиг. 4С



ФИГ. 5А

Провоспалительные цитокины
Обработка одновременно с инфекцией



Фиг. 5В