

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292145 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.05

(51) Int. Cl. *A61K 38/30* (2006.01)
A61K 35/744 (2015.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.03.09

(54) КОМПОЗИЦИЯ С АНТИВИРУСНЫМ ДЕЙСТВИЕМ, СОДЕРЖАЩАЯ ЛАКТОФЕРРИН И ШТАММЫ-ПРОБИОТИКИ БАКТЕРИЙ, ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 102020000005011
(32) 2020.03.09
(33) IT
(86) PCT/IB2021/051959
(87) WO 2021/181276 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 композиции, содержащей лактоферрин и возможно штаммы-пробиотики бактерий и/или N-ацетилцистеин и/или гиалуроновую кислоту для перорального применения в качестве противовирусного агента, предпочтительно для применения в лечении вирусных инфекций дыхательной системы, вызванных SARS-коронавирусом (например, COVID-19).

202292145 A1

202292145

A1

РСТ/IB2021/051959 МПК: *A61K 38/30* (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)
A61K 35/774 (2015.01)

**КОМПОЗИЦИЯ С АНТИВИРУСНЫМ ДЕЙСТВИЕМ, СОДЕРЖАЩАЯ
ЛАКТОФЕРРИН И ШТАММЫ-ПРОБИОТИКИ БАКТЕРИЙ,
ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей лактоферрин, для перорального применения в качестве противовирусного средства, предпочтительно для применения в лечении вирусных инфекций дыхательной системы и вызванных или обусловленных указанными вирусными инфекциями симптомов или расстройств, предпочтительно SARS-коронавирусных вирусных инфекций (например, COVID-19). Кроме того, настоящее изобретение относится к композиции, также содержащей, помимо лактоферрина, штаммы бактерий и/или N-ацетилцистеин и/или гиалуроновую кислоту, для перорального применения в указанных способах лечения вирусных инфекций. В частности, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей лактоферрин или его производные и по меньшей мере один штамм бактерий, предпочтительно относящихся к виду *Lactobacillus paracasei*, такой как, например, штамм *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), и к указанной композиции для применения в способе лечения вирусных инфекций, вызванных SARS-коронавирусом (например, COVID-19).

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).

Предпочтительно настоящее изобретение относится к вирусным инфекциям, вызванным по меньшей мере одним вирусом вида коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV; от англ. Severe acute respiratory syndrome coronavirus). Указанные вирусы вида SARS-CoV представляют собой положительно-нитевые РНК вирусы (группа IV классификации по Балтимору), относящиеся к роду *Betacoronavirus*.

Вирус вида коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром, представляет собой вирус, который вызвал эпидемию SARS 2002–2003 гг. в Китае, относящийся к штамму SARS-CoV.

Он был впервые открыт в ноябре 2002 г. в китайской провинции Гуандун. С 1 ноября 2002 г. по 31 августа 2003 г. этот вирус инфицировал 8096 человек примерно в тридцати странах и вызвал 774 смертельных исхода, в основном в Китае, Гонконге, Тайване и Юго-Восточной Азии. К концу 2019 г. второй вирус вида коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром, названный штаммом SARS-CoV-2 или альтернативно 2019-nCoV, вызвал новую эпидемию SARS в Китае и в остальных странах мира, чаще всего называемую COVID-19 (COroNaVirus Disease 19; он также известен как коронавирус-2, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром, — SARS-CoV-2, или коронавирусную болезнь 2019 г., а также коронавирусный синдром 2019 г.).

Благодаря обширной деятельности по исследованию и разработке автор изобретения обратился к проблеме лечения вирусных инфекций, предпочтительно вирусных инфекций дыхательных путей (верхних и нижних дыхательных путей), в частности вирусных инфекций дыхательных путей, вызванных по меньшей мере одним вирусом вида коронавирус, вызывающим тяжелый острый респираторный синдром (таким как штаммы SARS-CoV, SARS-CoV-2/2019-nCoV; вызывающим заболевание, известное как COVID-19, или SARS-CoV-подобные), и решил эту проблему в результате разработки композиций для перорального применения, содержащих лактоферрин или его производное и возможно по меньшей мере один штамм бактерий и/или N-ацетилцистеин или его соль и/или гиалуроновую кислоту или ее соль, для применения в способах лечения вирусных инфекций или обусловленных ими симптомов или расстройств.

Лактоферрин, также известный как лактотрансферрин, представляет собой многофункциональный глобулярный белок. Лактоферрин относится к семейству трансферринов и имеет молекулярную массу около 80 кДа и два сайта связывания иона железа (Fe^{3+}), аналогично самому трансферрину. Лактоферрин никогда не насыщается железом, и содержание железа в нем варьируется. Лактоферрин обладает антимикробной, бактерицидной, фунгицидной и направленной против различных вирусов активностью. Существует гипотеза, что антимикробная активность лактоферрина обусловлена его аффинностью к Fe^{3+} , и вследствие этой высокой аффинности он конкурирует с железозависимыми микроорганизмами, а также оказывает прямое действие на внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий. Объединение лактоферрина с ионом железа в секретах слизистой оболочки модулирует

активность и способность бактерий и вирусов к агрегации в направлении клеточных мембран. Это связано с тем фактом, что некоторым бактериям и вирусам для осуществления репликации в клетке требуется железо, а лактоферрин, напротив, извлекает его из окружающей среды, тем самым предотвращая пролиферацию указанных бактерий и вирусов.

Лактоферрин проявляет противовирусную активность против ДНК и РНК вирусов, в том числе ротавируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса герпеса и ВИЧ. Антивирусный эффект лактоферрина осуществляется на раннем этапе инфекции. Лактоферрин предотвращает проникновение вируса в клетку-хозяина посредством блокирования рецепторов или прямого связывания с вирусными частицами. В частности, противовирусный эффект лактоферрина в основном заключается в его способности к связыванию гликозаминогликанов плазматической мембраны. Кроме того, из литературы известно, что лактоферрин участвует в иммунном ответе организма-хозяина против острой инвазии коронавируса, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV), посредством повышения активности естественных клеток-киллеров (NK) и посредством стимуляции агрегации и адгезии нейтрофилов. Кроме того, выдвинута гипотеза, что лактоферрин может играть протективную роль в защите организма-хозяина от инфекции SARS-CoV посредством связывания с ГСПГ (широко распространенными ГСПГ, гепаринсульфат-протеогликанами) и посредством блокирования предварительного взаимодействия между SARS-CoV и клетками-хозяевами, с учетом того, что ГСПГ являются незаменимыми молекулами клеточной поверхности, вовлеченными в проникновение SARS-CoV в клетки.

В контексте настоящего изобретения выражение «производные лактоферрина» используется для указания на любой многофункциональный пептид или глобулярный белок, образованный из лактоферрина, который проявляет подобные противовирусные эффекты, например аполактоферрин или лактоферрицин. Лактоферрицин представляет собой производное лактоферрина с известной антибактериальной активностью, аполактоферрин представляет собой лактоферрин, в котором N-концевая доля (или аполактоферрин) принимает разомкнутую конформацию.

Композиции по изобретению на основе лактоферрина или его производного и возможно по меньшей мере одного штамма бактерий и/или N-ацетилцистеина или его соли и/или гиалуроновой кислоты или ее соли, включенные в лекарственную форму

для перорального применения, предпочтительно в твердую форму, эффективны в качестве противовирусных агентов, в частности в лечении вирусных инфекций дыхательных путей и обусловленных ими симптомов или расстройств, в частности инфекций, вызванных по меньшей мере одним вирусом вида коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (такой как штаммы SARS-CoV, SARS-CoV-2 или 2019-nCoV, являющиеся возбудителями заболевания, известного как COVID-19, или SARS-CoV-подобные).

Лекарственные формы композиций по изобретению на основе лактоферрина или его производного и возможно гиалуроновой кислоты или ее соли можно готовить путем добавления определенных эксципиентов и добавок в виде растворов, или эмульсий, или дисперсий, подходящих для распыления и введения с помощью распылительного устройства в нос и горло для применения для ингаляции, перорального или назального применения. Указанные распыляемые композиции эффективны в качестве противовирусных средств, в частности в лечении вирусных инфекций дыхательных путей и обусловленных ими симптомов или расстройств, в частности инфекций, вызванных по меньшей мере одним вирусом вида коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (такой как штамм SARS-CoV, SARS-CoV-2 или 2019-nCoV, являющийся возбудителем заболевания, известного как COVID-19, или SARS-CoV-подобные).

Композиции по изобретению на основе лактоферрина или его производного и возможно по меньшей мере одного штамма бактерий и/или N-ацетилцистеина или его соли и/или гиалуроновой кислоты или ее соли 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 респираторными или сердечно-сосудистыми осложнениями, или с сахарным диабетом, или другими осложнениями, которые могут представлять риск или опасность в случае вирусной инфекции.

Кроме того, композиции по изобретению на основе лактоферрина или его производного и возможно по меньшей мере одного штамма бактерий и/или N-ацетилцистеина или его соли и/или гиалуроновой кислоты или ее соли просты в приготовлении и экономически эффективны.

Кроме того, представленные в описании настоящего изобретения и его формуле композиции по изобретению, также содержащие, помимо лактоферрина и его

производного и возможно N-ацетилцистеина или его соли и/или гиалуроновой кислоты или ее соли, штаммы бактерий (пробиотики или их производные), могут обладать преимуществом с учетом того, что штаммы бактерий по изобретению способны увеличивать желудочно-кишечное всасывание лактоферрина и, следовательно, его биодоступность в крови у нуждающихся в этом субъектов.

Кроме того, комбинация лактоферрина и его производного с по меньшей мере одним штаммом бактерий по изобретению обеспечивает синергетический или усиливающий эффект относительно ее отдельных компонентов в иммуностимулирующем/противовоспалительном действии композиции в соответствии с изобретением.

Наконец, штаммы бактерий по настоящему изобретению обладают иммунитетом к антибактериальному эффекту лактоферрина или его производного (например, аполактоферрина) и, в то же время, лактоферрин (или его производное) оказывает эффект пребиотика в отношении штаммов бактерий, присутствующих в композиции по изобретению, поддерживая их рост.

В частности, комбинации лактоферрина и по меньшей мере одного штамма 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 описании настоящего изобретения, полученные в экспериментах *in vitro*, показывают оба вида активности — усиление противовирусной иммунной системы композициями по настоящему изобретению, содержащими лактоферрин и по меньшей мере один штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), или комбинацию *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) и *Lactobacillus paracasei*

LPC-S01 (DSM 26760), а также их способность к предотвращению репликации SARS-CoV-2.

Среди прошедших тестирование композиций по настоящему изобретению наиболее перспективными в отношении противовирусной иммуномодулирующей активности оказались те, которые содержат, помимо лактоферрина, штаммы бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), или комбинацию *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) и *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 (DSM 26760), поскольку они способны индуцировать экспрессию интерферона (IFN) и генов, вовлеченных в пути передачи сигнала противовирусного ответа TLR7, IFIH, IRF3, IRF7 и 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 паттерн-распознающим рецептором в распознавании однокитевой 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 паттерн-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 даже 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 тяжелые формы 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 *in vitro* композицией, содержащей лактоферрин и по меньшей мере один штамм бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), вызвала подавление иммунного 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 и относительно штамма *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103).

Кроме того, также наблюдали, что комбинация лактоферрина с комбинацией штаммов бактерий *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) и *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 (DSM 26760) положительно модулирует антивирусные 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 применение композиций в соответствии с настоящим изобретением, содержащих лактоферрин (или его производное) и по меньшей мере один штамм бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei* (например, *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 или комбинация *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.

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

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1А–С схематично представлены рисунки из исследований *in vitro* по оценке антивирусных ответов клеток кишечного эпителия Сасо2 после: (А) отсутствия обработки композицией в соответствии с настоящим изобретением, (В)

предварительной обработки композицией в соответствии с настоящим изобретением, и (С) одновременной обработки композицией в соответствии с настоящим изобретением, в каждом случае относительно обработки вирусом SARS-CoV-2.

На Фиг. 2А–С изображено действие композиции в соответствии с настоящим изобретением на панель цитокинов/хемокинов и молекул, обладающих антивирусным действием или вовлеченных в антивирусные ответы, продуцируемых клетками кишечного эпителия 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 антивирусным действием или вовлеченных в антивирусные ответы, продуцируемых клетками кишечного эпителия Сасо-2, после предварительной обработки указанной композицией, относительно обработки 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), профиль экспрессии цитокинов (провоспалительных и противовоспалительных) в клетках Сасо-2, инфицированных *in vitro* SARS-CoV-2, предварительно обработанных или не обработанных композицией в соответствии с настоящим изобретением, а также сравнение с действием композиции, содержащей лактоферрин и штамм *L. rhamnosus* GG ATCC 53103.

На Фиг. 5А–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, одновременно обработанных или не обработанных композицией в соответствии с настоящим изобретением, а также сравнение с действием композиции, содержащей лактоферрин и штамм *L. rhamnosus* GG ATCC 53103.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Объект настоящего изобретения образует композиция для перорального применения и (сокращенно композиция по изобретению) и для применения в качестве антивирусного агента, предпочтительно для применения в способе профилактического и/или радикального лечения вирусных инфекций дыхательной системы (верхних дыхательных путей и/или нижних дыхательных путей) и вызванных или

обусловленных указанной вирусной инфекцией симптомов или расстройств у нуждающихся в этом субъектов, где указанная композиция содержит:

(1) смесь М (сокращенно смесь М по изобретению), содержащую лактоферрин (сокращенно LF) или его приемлемое производное фармацевтического класса; или, альтернативно, состоящей из них, и возможно

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

Предпочтительно вирусная инфекция, которую лечат с применением композиции по изобретению, представляет собой инфекцию, вызванную вирусом семейства *Coronaviridae*, подсемейство: *Coronavirinae*, род: *Betacoronavirus*, вид: коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (сокращенно SARS-CoV или SARS-коронавирус), предпочтительно выбранный из следующих штаммов: (I) коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV или SARS) (II) коронавирус-2, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2 или 2019-nCoV – возбудитель заболевания, известного как COVID-19) и (III) коронавирус-подобный вирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-подобный или SL-CoV); более предпочтительно SARS-CoV-2 или 2019-nCoV, являющийся возбудителем заболевания, известного как COVID-19.

Сокращенно в контексте настоящего изобретения эти вирусы (например, (I), (II) и (III)) называют «вирусы вида SARS-коронавирус» или просто «SARS-коронавирус».

Симптомы или расстройства, вызванные или обусловленные указанной вирусной инфекцией дыхательных путей (верхних дыхательных путей и/или нижних дыхательных путей), предпочтительно коронавирусной инфекцией, как определено выше (например, SARS-CoV, SARS-CoV-2 или 2019-nCoV, SARS-CoV-подобный), могут представлять собой: тяжелый острый респираторный синдром (SARS), 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, диспноэ (дыхательную недостаточность, нехватку дыхания), 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 композиция для перорального применения в качестве антивирусного агента по настоящему изобретению содержит указанную смесь М, содержащую, помимо лактоферрина или его производного, дополнительно по меньшей мере один штамм бактерий или смесь штаммов бактерий, относящихся к роду *Lactobacillus* или *Bifidobacterium*; предпочтительно по меньшей мере один штамм бактерий, относящихся к виду, выбранному из: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis*, *Bifidobacterium bifidum* и их смесей, предпочтительно к виду *Lactobacillus paracasei*, и их смеси.

Например, композиция для перорального применения в качестве антивирусного агента по настоящему изобретению содержит указанную смесь М, содержащую, помимо лактоферрина или его производного, дополнительно по меньшей мере один штамм бактерий, 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 депозитарным номером 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),

- (с) 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 = BbIBS01, или его производное, где указанный штамм бактерий был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 32708 4 декабря 2017 г. компанией Sofar S.p.A, и

- их смесь;

или, альтернативно, состоящей их них.

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.

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* BbIBS01 (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.

Предпочтительно смесь М композиции по изобретению может содержать лактоферрин или его производное и штамм *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572, или лактоферрин или его производное и штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, или лактоферрин или его производное, штамм *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572 и штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760.

В соответствии с одним аспектом указанная смесь М композиции по настоящему изобретению содержит лактоферрин (или его производное), штамм, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei* (предпочтительно *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572) или, альтернативно, состоит из них, и дополнительно еще по меньшей мере один штамм бактерий, выбранный из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231, *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BbIBS01 DSM 33233, *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234, *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg (или BbIBS01) DSM 32708 и их смесь.

В соответствии с одним аспектом указанная смесь М композиции по настоящему изобретению содержит лактоферрин (или его производное), штамм *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572 или, альтернативно, состоит из них, и дополнительно еще по меньшей мере один штамм бактерий, выбранный из группы, содержащей или состоящей из: *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231, *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BbIBS01 DSM 33233, *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234, *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg (или BbIBS01) DSM 32708 и их смесь, предпочтительно *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg (или BbIBS01) DSM 32708.

В соответствии с одним аспектом указанная смесь М композиции по настоящему изобретению содержит лактоферрин (или его производное), штамм *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572 и/или штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 или, альтернативно, состоит из них, и дополнительно еще по меньшей мере один штамм бактерий, выбранный из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231, *Bifidobacterium breve*

BbIBS02 DSM 33232, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BbIBS01 DSM 33233, *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234, *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg (или BbfIBS01) и их смесь, предпочтительно *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg (или BbfIBS01) DSM 32708.

Следующие воплощения (FR) смеси М композиции по изобретению описаны ниже, где лактоферрин указан как LF, а штаммы бактерий указаны буквами (a)–(g), как определено выше: LF+a+c; LF+a+d; LF+a+e; LF+a+f; LF+a+g; LF+b+c; LF+b+d; LF+b+e; LF+b+f; LF+b+g; LF+a+b+c; LF+a+b+d; LF+a+b+e; LF+a+b+f; LF+a+b+g; LF+a+c+d+e+f; LF+b+c+d+e+f; LF+a+b+c+d+e+f; LF+a+c+d+e+f+g; LF+b+c+d+e+f+g; LF+a+b+c+d+e+f+g; LF+a+c+d; LF+b+c+d; LF+a+b+c+d; LF+a+c+d+g; LF+b+c+d+g; LF+a+b+c+d+g; LF+a+c+d+e; LF+b+c+d+e; LF+a+b+c+d+e; LF+a+c+d+e+g; LF+b+c+d+e+g; LF+a+b+c+d+e+g.

Указанные воплощения (FR) смеси М, содержащей лактоферрин и смесь штаммов бактерий, могут дополнительно содержать N-ацетилцистеин (NAC) или его соль. Предпочтительные воплощения, содержащие NAC или его соль, представляют собой: LF+a+NAC; LF+b+NAC; LF+a+b+NAC; LF+a+g+NAC; LF+b+g+NAC; LF+a+b+g+NAC; LF+a+c+d+e+f+NAC; LF+b+c+d+e+f+NAC; LF+a+b+c+d+e+f+NAC; LF+a+c+d+e+f+g+NAC; LF+b+c+d+e+f+g+NAC; LF+a+b+c+d+e+f+g+NAC.

Указанные воплощения (FR) смеси М, содержащей лактоферрин и смесь штаммов бактерий и возможно N-ацетилцистеин (NAC) или его соль, могут дополнительно содержать гиалуроновую кислоту (HA) или его соль. Предпочтительные воплощения, содержащие HA или ее соль, представляют собой: LF+a+HA; LF+b+HA; LF+a+b+HA; LF+a+g+HA; LF+b+g+HA; LF+a+b+g+HA; LF+a+c+d+e+f+HA; LF+b+c+d+e+f+HA; LF+a+b+c+d+e+f+HA; LF+a+c+d+e+f+g+HA; LF+b+c+d+e+f+g+HA; LF+a+b+c+d+e+f+g+HA; LF+a+NAC+HA; LF+b+NAC+HA; LF+a+b+NAC+HA; LF+a+g+NAC+HA; LF+b+g+NAC+HA; LF+a+b+g+NAC+HA; LF+a+c+d+e+f+NAC+HA; LF+b+c+d+e+f+NAC+HA; LF+a+b+c+d+e+f+NAC+HA; LF+a+c+d+e+f+g+NAC+HA; LF+b+c+d+e+f+g+NAC+HA; LF+a+b+c+d+e+f+g+NAC+HA.

Упомянутые выше штаммы бактерий, присутствующие в смеси М композиции по изобретению, могут представлять собой жизнеспособные штаммы бактерий (или пробиотики) или производные штаммов бактерий, такие как парaproбиотики, постбиотики, лизаты, тиндализированные 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 инактивированный 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 инактивированный 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, инактивированные 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 одном воплощении смесь М композиции по изобретению, помимо лактоферрина и его производного и возможно по меньшей мере одного штамма бактерий, дополнительно содержит N-ацетилцистеин (NAC) или его приемлемую соль фармацевтического класса.

В контексте настоящего изобретения приемлемая соль N-ацетилцистеина (NAC) фармацевтического класса включает все соли, известные в данной области техники и/или специалистам в данной области техники и подходящие для применения в настоящем изобретении. Предпочтительным примером приемлемой соли N-ацетилцистеина фармацевтического класса является L-лизиновая соль N-ацетилцистеина (NAL).

N-ацетилцистеин представляет собой вещество, идентифицированное под наименованием IUPAC 2R-ацетамидо-3-сульфанилпропановая кислота, номер CAS: 616-91-1. N-ацетилцистеин является производным N-ацетилата аминокислоты цистеин, которое обладает антиоксидантной и муколитической активностью. Антиоксиданты представляют собой вещества, которые замедляют или предотвращают окисление других веществ. Муколитики представляют собой вещества, которые разжижают слизь, секретируемую дыхательной системой, и облегчают деятельность по эвакуации слизи из бронхов и трахеи. Известно, что основными детерминантами вязкости и эластичности секретов дыхательной системы являются фукомицины и иммуноглобулины IgG. N-ацетилцистеин, в частности, характеризуется способностью к расщеплению сульфидных мостиков в белках: в случае слизи N-ацетилцистеин вызывает деполимеризацию мукопротеиновых комплексов (агломератов гликопротеинов) до звеньев меньшего размера, обеспечивая снижение вязкости, и оказывает важное муколитическое и разжижающее действие на слизистые и слизистогнойные секреты.

Например, смесь М композиции по изобретению может содержать лактоферрин или его производное и N-ацетилцистеин или его соль, или, альтернативно, состоящей из них.

В следующем примере смесь М композиции по изобретению может содержать лактоферрин или его производное, N-ацетилцистеин или его соль и по меньшей мере один штамм бактерий или смесь штаммов бактерий, выбранных 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* nov. *lactis* BbIBS01 DSM 33233 и *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234, *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg = BbIBS01, и их смесь, предпочтительно *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 (например: LF, NAC и DG[®], или LF, NAC и LPC-S01, или LF, NAC, DG[®] и LPC-S01, и другие воплощения, упоминаемые в настоящем описании), или альтернативно, состоящей из них.

В одном воплощении смесь М композиции по изобретению, помимо лактоферрина или его производного и возможно по меньшей мере одного штамма бактерий и/или N-ацетилцистеина (NAC) или его соли, дополнительно содержит гиалуроновую кислоту (НА) или ее приемлемую соль фармацевтического класса; предпочтительно где смесь М содержит лактоферрин или его производное и N-ацетилцистеин и/или гиалуроновую кислоту или ее приемлемую соль фармацевтического класса; предпочтительно где смесь М содержит лактоферрин или его производное, по меньшей мере один пробиотик (или его производное) в соответствии с любым из воплощений, определенных в настоящем изобретении (например, *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572), N-ацетилцистеин и/или гиалуроновую кислоту, либо их приемлемую соль фармацевтического класса. В настоящем изобретении описаны примеры смесей М композиции по настоящему изобретению, содержащей гиалуроновую кислоту (НА) или ее соль.

Гиалуроновая кислота (например, CAS 9004-61-9) представляет собой несulfатированный гликозаминогликан и не содержит белкового центра. Гиалуроновая кислота и ее соли являются макромолекулами. В частности, гиалуроновая кислота или ее соли, предпочтительно натрия гиалуронат, в контексте настоящего изобретения предпочтительно имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 20 кДа до 4000 кДа (например, 100 кДа, 500 кДа, 1500 кДа, 1000 кДа, 2000

кДа или 3000 кДа), предпочтительно в диапазоне от 50 кДа до 1500 кДа, еще более предпочтительно от 150 кДа до 1000 кДа.

В контексте настоящего изобретения выражение «гиалуроновая кислота» предпочтительно используется для указания на соль щелочного или щелочноземельного металла, такого как, например, натрий, калий, магний или кальций; предпочтительно соль гиалуроновой кислоты представляет собой соль натрия (натрия гиалуронат).

Гиалуроновая кислота, которую можно использовать в контексте настоящего изобретения, может быть линейной или разветвленной и иметь растительное происхождение (например, может быть получена посредством микробной ферментации растительного субстрата, такого как соя), при этом биотехнологический процесс состоит в обеспечении спонтанной ферментации продуцирующими ее дрожжами или бактериями.

Присутствие гиалуроновой кислоты в композиции по изобретению в комбинации с N-ацетилцистеином или его солью усиливает муколитическую эффективность N-ацетилцистеина (снижение вязкости слизи и легкость откашливания/удаления слизи у субъекта, страдающего повышенной выработкой слизи).

Лактоферрин может присутствовать в композициях по изобретению или в смесях М по изобретению (в соответствии с одним из воплощений настоящего изобретения, таким как LF сам по себе, LF и штаммы бактерий, LF и NAC, LF и NAC и штаммы бактерий в процентах по массе от 10% до 90% относительно суммарной массы смеси М композиции (например, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% или 85%), предпочтительно от 20% до 80%, более предпочтительно от 30% до 70% или от 30% до 50%.

В воплощении, где, помимо лактоферрина или его производного, смесь М дополнительно содержит N-ацетилцистеин или его соль, и отношение по массе в смеси М между лактоферрином и его производным и N-ацетилцистеином или его солью (лактоферрин: N-ацетилцистеин) находится в диапазоне от 10:1 до 1:10 (например, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 или 1:9), предпочтительно от 5:1 до 1:5, более предпочтительно от 2:1 до 1:2.

Композиция по изобретению, содержащая указанную смесь М в соответствии с любым из воплощений настоящего изобретения (т.е. LF сам по себе, LF и штаммы

бактерий, LF и NAC, LF и NAC и штаммы бактерий), 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.

Композицию для перорального применения по настоящему изобретению можно готовить в виде твердой формы, выбранной из: таблеток, жевательных таблеток, растворимых таблеток для перорального применения, гранул, порошка, 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 находится в твердой форме.

В смеси М композиции по изобретению в соответствии с любым из воплощений, описанных в настоящем изобретении, лактоферрин может находиться в форме липосом, например, в форме липосом на основе фосфолипидов.

Указанная форма липосом (или лекарственная форма) лактоферрина может снижать клиренс лактоферрина после введения (перорально или интраназально в лекарственной форме в виде спрея) и тем самым увеличивать его всасывание. В дополнение к этому вещества, переносимые липосомами, защищены от действия ферментов (протеаз, нуклеаз) или денатурирующей среды (рН). Липосомы представляют собой полые микросферы, образованные одним или более чем одним липидным бислоем, мембрана которых состоит из холестерина (или сложных эфиров холестерина) и фосфолипидов, таких как фосфатидилхолин, диацетилфосфат и фосфатидилэтаноламин. Липосомы имеют размеры, которые могут варьироваться от 20 нм до 25 нм, вплоть до 2,5 мкм.

В контексте настоящего изобретения термин для перорального применения используется для указания как на пероральное (или гастроэнтеральное) введение, так и на подъязычное (или трансбуккальное) введение.

Композиция по изобретению для перорального применения, предпочтительно в твердой форме, эффективна в качестве противовирусного агента, в частности, в лечении инфекций дыхательных путей, вызванных вирусом SARS-коронавирус, предпочтительно SARS-CoV или 2019-nCoV, являющимся возбудителем заболевания, известного как COVID-19, при этом суточные дозы лактоферрина находятся в диапазоне от 5 мг до 1000 мг, предпочтительно от 10 мг до 500 мг, более предпочтительно от 20 мг до 400 мг, например, от 50 мг до 350 мг, от 50 мг до 300 мг, от 50 мг до 250 мг, от 50 мг до 200 мг, от 100 мг до 200 мг, например, от 10 мг до 180 мг, от 10 мг до 160 мг, от 10 мг до 140 мг, от 10 мг до 120 мг, от 10 мг до 100 мг, от 10 мг до 90 мг, от 10 мг до 80 мг, от 10 мг до 70 мг, от 10 мг до 60 мг, от 10 мг до 50 мг.

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.

Если смесь М по настоящему изобретению содержит, помимо лактоферрина и возможно N-ацетилцистеина и/или гиалуроновой кислоты, указанный по меньшей мере один штамм бактерий или их смесь, указанные штаммы бактерий присутствуют в композиции по изобретению в концентрации, находящейся в диапазоне от 10×10^6 КОЕ до 10×10^{12} КОЕ, предпочтительно от 0×10^8 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*).

Композиции по изобретению в соответствии с любым из описанных воплощений могут быть предназначены для применения в качестве вспомогательной терапии, или дополнительных подходов к противовирусной терапии, или подходов к лечению заболевания, вызванного SARS-коронавирусом.

Объект настоящего изобретения составляет способ профилактического и/или радикального лечения вирусных инфекций дыхательной системы (верхних и/или нижних дыхательных путей) и обусловленных ими симптомов или расстройств у нуждающихся в этом субъектов, где указанный способ лечения предусматривает введение терапевтически эффективного количества композиции в соответствии с

настоящим изобретением (такой как лактоферрин и возможно штамм бактерий и/или N-ацетилцистеин и/или гиалуроновая кислота).

Если не указано иное, выражение «композиция, или смесь, или другое, содержащее компонент в количестве, «включенном в диапазон от x до y» 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) 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.

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

FR-A1. Композиция для применения в способе лечения вирусной инфекции,

где указанная композиция содержит (i) смесь M, содержащую лактоферрин или его приемлемое производное фармацевтического класса; и возможно (ii) по меньшей мере одну приемлемую добавку и/или один приемлемый эксципиент фармацевтического класса, или, альтернативно, состоящую из них; и где указанная композиция предназначена для перорального применения.

FR-A2. Композиция для применения в соответствии с FR-A1, где указанная композиция предназначена для применения в способе лечения вирусной инфекции дыхательной системы и симптомов или расстройств, вызванных или обусловленных указанной вирусной инфекцией.

FR-A3. Композиция для применения в соответствии с FR-A1 или 2, где указанная вирусная инфекция вызвана вирусом семейства *Coronaviridae*, подсемейство: *Coronavirinae*, род: *Betacoronavirus*, вид: коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром, выбранный из штаммов: коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV), коронавирус-2, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2, или COVID-19, или 2019-nCoV) и коронавирус-подобный вирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-подобный или SL-CoV); предпочтительно COVID-19.

FR-A4. Композиция для применения в соответствии с FR-A2 или 3, где указанные симптомы или расстройства, вызванные или обусловленные указанной вирусной инфекцией дыхательной системы, выбраны из: тяжелого острого респираторного синдрома (SARS), 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 и бронхоэктаза.

FR-A5. Композиция для применения в соответствии с любым из предшествующих FR-A, где смесь М дополнительно содержит по меньшей мере один штамм бактерий, относящийся к роду *Lactobacillus* или *Bifidobacterium*; предпочтительно по меньшей мере один штамм бактерий, относящихся к виду, выбранному из: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* *нодв. lactis* и *Bifidobacterium bifidum*.

FR-A6. Композиция для применения в соответствии с FR-A5, где указанный по меньшей мере один штамм бактерий выбран 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, *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg (или BbIBS01) DSM 32708 и их смесь.

FR-A7. Композиция для применения в соответствии с FR-A6, где указанная смесь М содержит или альтернативно состоит из лактоферрина или его производного и штамма *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 или альтернативно штамма *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 или их смеси.

FR-A8. Композиция для применения в соответствии с FR-A6, где указанная смесь М содержит или альтернативно состоит из лактоферрина или его производного и смеси штаммов бактерий, содержащей или альтернативно состоящей из: штамм *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 и смесь штаммов *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231, *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232, *Bifidobacterium animalis* *noëv. lactis* BbIBS01 DSM 33233 и *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234 и возможно *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg или BbIBS01 DSM 32708.

FR-A9. Композиция для применения в соответствии с любым из предшествующих FR-A, где смесь М дополнительно содержит N-ацетилцистеин или его приемлемую соль фармацевтического класса; предпочтительно, где смесь М содержит лактоферрин и его производное и N-ацетилцистеин или его приемлемую соль фармацевтического класса; предпочтительно где смесь М содержит лактоферрин и его производное, по меньшей мере один пробиотик, выбранный из FR-A 5–8, и N-ацетилцистеин или его приемлемую соль фармацевтического класса.

FR-A10. Композиция для применения в соответствии с любым из предшествующих FR-A, где смесь М дополнительно содержит гиалуроновую кислоту или ее приемлемую соль фармацевтического класса; предпочтительно, где смесь М содержит лактоферрин и его производное и N-ацетилцистеин и/или гиалуроновую кислоту или их приемлемую соль фармацевтического класса; предпочтительно где смесь М содержит лактоферрин и его производное, по меньшей мере один пробиотик, выбранный из FR-A 5–8, и N-ацетилцистеин и/или гиалуроновую кислоту или ее приемлемую соль фармацевтического класса.

FR-A11. Композиция для применения по любому из предшествующих FR-A, где композиция находится в твердой форме, выбранной из: таблеток, жевательных таблеток, трансбуккальных таблеток, гранул, хлопьев, растворимого порошка, растворимого порошка или гранул для перорального применения, капсул; или в форме жидкости, 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 в твердой форме.

Ниже представлены воплощения настоящего изобретения FR-B.

FR-B1. Композиция для применения в способе лечения вирусной инфекции дыхательной системы и симптомов или расстройств, вызванных или обусловленных указанной вирусной инфекцией,

где указанная вирусная инфекция вызвана вирусом семейства *Coronaviridae*, подсемейства *Coronavirinae*, рода *Betacoronavirus*, вида коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV),

где указанная композиция содержит

(1) смесь М; и возможно

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

где указанная смесь М содержит лактоферрин или его приемлемое производное фармацевтического класса и по меньшей мере один штамм бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei*, или, альтернативно, состоит из них; и где указанная композиция предназначена для перорального применения.

FR-B2. Композиция для применения в соответствии с FR-B1, где указанный вирус вида коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV), выбран из штаммов: коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV), коронавирус-2, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2 или 2019-nCoV), являющийся возбудителем заболевания COVID-19, и коронавирус-подобный вирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-подобный или SL-CoV); более предпочтительно SARS-CoV-2.

FR-B3. Композиция для применения в соответствии с FR-B1 или FR-B2, где указанный по меньшей мере один штамм бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei*, выбран из группы, содержащей:

- штамм бактерий, относящихся 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 (депонирован 5 мая 1995 г. компанией Sofar S.p.A как *Lactobacillus casei* подв. *casei* 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 (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),

и их смесь;

или, альтернативно, состоящей из них.

FR-B4. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-B1–FR-B3, где указанная смесь (M) 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 депозитарным номером DSM 33231 (депонирован 31 июля 2019 г. компанией Sofar S.p.A.),

- штамм бактерий, относящихся 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.),

- штамм бактерий, относящихся к виду *Bifidobacterium animalis*, идентифицированный как *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BIIBS01 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.),

- штамм бактерий, относящихся 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.),

- штамм бактерий, относящихся к виду *Bifidobacterium bifidum*, идентифицированный как *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg или BbfIBS01, или его производное, где указанный штамм бактерий был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 32708 4 декабря 2017 г. компанией Sofar S.p.A, и

- их смесь;

или, альтернативно, состоящей из них.

FR-B5. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-B1–FB-B4, где указанная смесь М содержит лактоферрин или его производное и штамм *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 или, альтернативно, состоит из них.

FR-B6. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-B1–FB-B5, где указанный по меньшей мере один штамм бактерий представляет собой пробиотик, или парaproбиотик, или жизнеспособный штамм-постбиотик бактерий.

FR-B7. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-B1–FB-B6, где смесь М дополнительно содержит N-ацетилцистеин или его приемлемую соль фармацевтического класса.

FR-B8. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-B1–FB-B7, где смесь М дополнительно содержит гиалуроновую кислоту или ее приемлемую соль фармацевтического класса.

FR-B9. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-B1–FB-B8, где лактоферрин находится в форме липосом; предпочтительно в форме липосом на основе фосфолипидов.

FR-B10. Композиция для применения в соответствии с любым из FR-B1–FB-B9, где указанные вызванные или обусловленные указанной вирусной инфекцией симптомы и/или расстройства выбраны из: тяжелого острого респираторного синдрома (SARS), 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, диспноэ, дыхательной недостаточности, нехватки дыхания, лихорадки, утомляемости, мышечных болей, мышечной болезненности, заложенности носа, насморка, першения в горле, тошноты, диареи, почечной недостаточности, потери аппетита, общего недомогания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Было проведено тестирование композиции в соответствии с изобретением, содержащей лактоферрин и по меньшей мере один штамм бактерий, как определено в контексте настоящего изобретения, для верификации следующего:

- штамма бактерий (пробиотика) в качестве усилителя лактоферрина (для повышения всасывания и биодоступности);

- иммуностимулирующего/противовоспалительного действия композиции в соответствии с изобретением (оценка экспрессии некоторых воспалительных цитокинов, таких как, например, IL-8);

- пребиотическое действие лактоферрина в отношении пробиотика с конечным эффектом усиления роста штаммов бактерий.

1. Цель

Автор изобретения провел исследования *in vitro* в целях оценки способности композиций в соответствии с настоящим изобретением, содержащих лактоферрин и по меньшей мере один штамм бактерий, относящихся 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 антивирусные ответы в клетках кишечного эпителия (антивирусный иммуномодулирующий эффект); и

(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 лактобацилл, 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). Штаммы инкубировали в течение 72 часов при 37°C в анаэробных условиях.

Штамм ATCC 53103 был приобретен в Американской коллекции типовых культур (ATCC), тогда как поставщиком штаммов DG[®] (CNCM I-1572) и LPC-S01 (DSM 26760) была компания Sofar S.p.A. (г. Милан, Италия).

Лактоферрин был приобретен в виде продукта Globoferrina[®] (Sofar, Италия), серия № M90578, дата истечения срока годности 11/2021. Globoferrina[®] использовали в комбинации с пробиотиками при конечной концентрации 100 мкг/мл.

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 E6 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 следующей обработке (Фиг. 1).

Обработка только лактоферрином и пробиотиками в отсутствие вируса SARS-CoV-2 (Фиг. 1A).

Предварительная обработка композицией по настоящему изобретению относительно обработки вирусом SARS-CoV-2 (Фиг. 1B).

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

Лактоферрин добавляли в концентрации 100 мкг/мл вместе со штаммом бактерий. Через 3 часа клетки промывали 1-кратным фосфатно-солевым буфером (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.

Совместная обработка композицией по настоящему изобретению относительно обработки вирусом SARS-CoV-2 (Фиг. 1C).

К конфлюэнтным клеткам Сасо-2 добавляли штамм бактерий (жизнеспособный; МИ 1:10) вместе с SARS-CoV-2 (МИ 1: 2). Лактоферрин добавляли (100 мкг/мл) вместе

со штаммом бактерий. 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.

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. Различие считали статистически значимым при $p < 0,05$.

4. Результаты.

4.1. Антивирусный иммунный ответ *in vitro*.

Антивирусные иммуномодулирующие эффекты композиции в соответствии с изобретением оценивали *in vitro* с использованием клеток кишечного эпителия человека Caco-2.

Как показано на Фиг. 2А–2С, обработка композициями в соответствии с настоящим изобретением индуцировала значимые изменения профиля экспрессии нескольких генов, вовлеченных в антивирусный иммунный ответ.

Была проведена оценка способности *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 (отдельно или в комбинации с *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760) в комбинации с лактоферрином к стимуляции антивирусного иммунного ответа и ее сравнение со способностью к стимуляции антивирусного иммунного ответа комбинации *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) (штамм сравнения) с лактоферрином.

Обработка клеток Caco-2 *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) совместно с лактоферрином (LF) приводила к повышению уровня антивирусного цитокина

интерферона альфа (IFN-альфа 1) и продемонстрировала тенденцию к повышающей регуляции интерферона бета (IFN-бета 1) (Фиг. 2А).

Кроме того, комбинация *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) с лактоферрином (LF) вызывала 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 сигнальных путях антивирусного ответа (Фиг. 2В и 2С).

Кроме того, добавление лактоферрина (LF) к комбинации *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) и *L. paracasei* LPC-S01 (DSM 26760) значимо повышало экспрессию упоминаемых выше генов распознавания вируса и генов передачи сигнала антивирусного ответа, в частности, за счет повышения экспрессии генов IFN-альфа1, TLR7, IFIH1, IRF3, IRF7 и MAVS (Фиг. 2А–2В).

4.2. Ингибирующее действие на репликацию SARS-CoV-2 *in vitro*.

Для оценки антивирусной активности композиции в соответствии с изобретением против SARS-CoV-2 был проведен анализ инфекции SARS-CoV-2 в клетках Сасо-2.

Перед инфицированием вирусом клетки предварительно обрабатывали композицией в соответствии с настоящим изобретением 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 значимое снижение экспрессии вирус-специфических генов, кодирующих РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), в клетках Сасо-2, обработанных композицией, содержащих штамм *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) и лактоферрин, что указывает на возможность ингибирования репликации SARS-CoV-2 *in vitro* предварительной обработкой композицией в соответствии с настоящим изобретением.

Кроме того, также оценивали титр SARS-CoV-2 на собранных супернатантах: предварительная обработка *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) в комбинации с лактоферрином (LF) определила ингибирование инфекции SARS-CoV-2 на 52,8% и сравнили с ремдесивиром, который является антивирусным 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 композицией в соответствии с настоящим изобретением 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 композицией в соответствии с настоящим изобретением 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 Caco-2, предварительно обработанных или не обработанных композицией в соответствии с настоящим изобретением (Фиг. 4). Указанная протективная активность композиций в соответствии с настоящим изобретением против воспалительного ответа, триггером которого является инфекция SARS-COV-2, сравнивали с комбинацией штамма *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) (штамм сравнения) с лактоферрином.

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 Caco-2 композицией в соответствии с настоящим изобретением, содержащей штамм *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) и лактоферрин (LF), приводила к значимому снижению уровней экспрессии мРНК генов IL6, IL8 и TSLP1 и повышению уровней экспрессии мРНК генов TGF-бета1 (Фиг. 4А–4С) относительно контроля и относительно обработки *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103).

Аналогичные результаты были получены для композиции, содержащей лактоферрин (LF) и комбинацию *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) и *L. paracasei* LPC-S01 (DSM 26760).

Кроме того, также наблюдали, что предварительная обработка инфицированных клеток Caco-2 композицией в соответствии с настоящим изобретением, содержащим штамм *B. bifidum* MIMBb23sg (= BbflBS01) DSM 32708 и лактоферрин (LF), 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 E (CoVE) (Фиг. 4А–4С) относительно контроля и относительно обработки *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103).

4.4. Одновременная обработка композицией в соответствии с настоящим изобретением 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 композиции в соответствии с настоящим изобретением, содержащие лактоферрин и по меньшей мере один штамм бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), или комбинацию *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) и *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 (DSM 26760), способны к положительному модулированию противовирусных и противовоспалительных ответов, тем самым являясь полезными средствами вспомогательной противовирусной терапии SARS-CoV-2.

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, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), в комбинации с лактоферрином, 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).

Кроме того, профилактическая обработка или одновременная обработка *in vitro* композицией в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно лактоферрином и *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 композиций в соответствии с настоящим изобретением, содержащих лактоферрин (или его производное) и по меньшей мере один штамм бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), 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) в комбинации с лактоферрином показал усиленную активность по сравнению со штаммом *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) в комбинации с лактоферрином, 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 лактоферрина с комбинацией 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).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для применения в способе лечения вирусной инфекции дыхательной системы и симптомов или расстройств, вызванных или обусловленных указанной вирусной инфекцией,

где указанная вирусная инфекция вызвана вирусом семейства Coronaviridae, подсемейства Coronavirinae, рода Betacoronavirus, вида коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV),

где указанная композиция содержит

(1) смесь М; и возможно

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

где указанная смесь М содержит лактоферрин или его приемлемое производное фармацевтического класса и по меньшей мере один штамм бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei* или, альтернативно, состоит из них; и где указанная композиция предназначена для перорального применения.

2. Композиция для применения по п. 1, где указанный вирус вида коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV), выбран из штаммов: коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV), коронавирус-2, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2 или 2019-nCoV), являющийся возбудителем заболевания COVID-19, и коронавирус-подобный вирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-подобный или SL-CoV); более предпочтительно SARS-CoV-2.

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

- штамм бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* DG[®] и депонированный в Национальной коллекции культур микроорганизмов института Пастера в Париже под номером доступа CNCM I-1572 (депонирован 5 мая 1995 г. компанией Sofar S.p.A как *Lactobacillus casei* подв. *casei* 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 (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),

и их смесь,

или, альтернативно, состоящей из них.

4. Композиция для применения по любому из п.п. 1–3, где указанная смесь (М) 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 (депонирован 31 июля 2019 г. компанией Sofar S.p.A.),

- 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.),

- 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.),

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

- штамм бактерий, относящийся к виду *Bifidobacterium bifidum*, идентифицированный как *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg или BbfIBS01, или его производное, где указанный штамм бактерий был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 32708 4 декабря 2017 г. компанией Sofar S.p.A, и

- их смесь;

или, альтернативно, состоящей их них.

5. Композиция для применения по любому из п.п. 1–4, где указанная смесь М содержит лактоферрин или его производное и штамм *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 или, альтернативно, состоит из них.

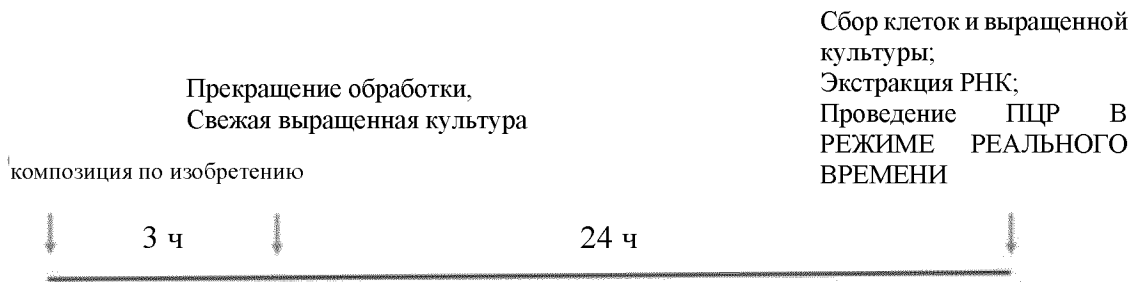
6. Композиция для применения по любому из п.п. 1–5, где указанный по меньшей мере один штамм бактерий представляет собой пробиотик, или парaproбиотик, или постбиотический жизнеспособный бактериальный штамм.

7. Композиция для применения по любому из п.п. 1–6, где смесь М дополнительно содержит N-ацетилцистеин или его приемлемую соль фармацевтического класса.

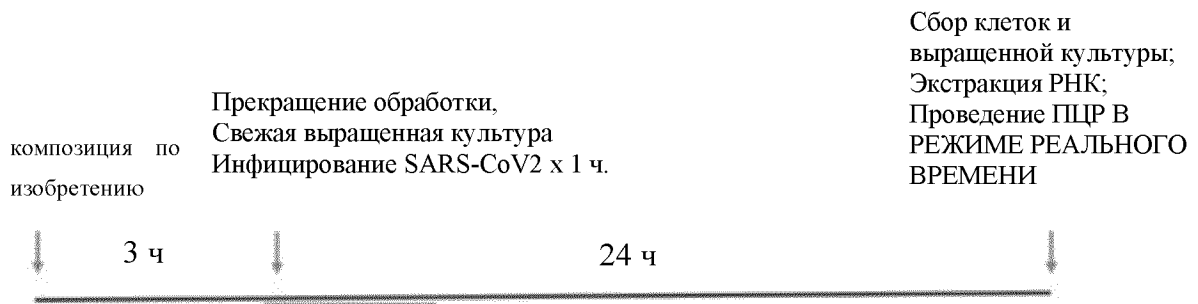
8. Композиция для применения по любому из п.п. 1–7, где смесь М дополнительно содержит гиалуроновую кислоту или ее приемлемую соль фармацевтического класса.

9. Композиция для применения по любому из п.п. 1–8, где лактоферрин находится в форме липосом; предпочтительно в форме липосом на основе фосфолипидов.

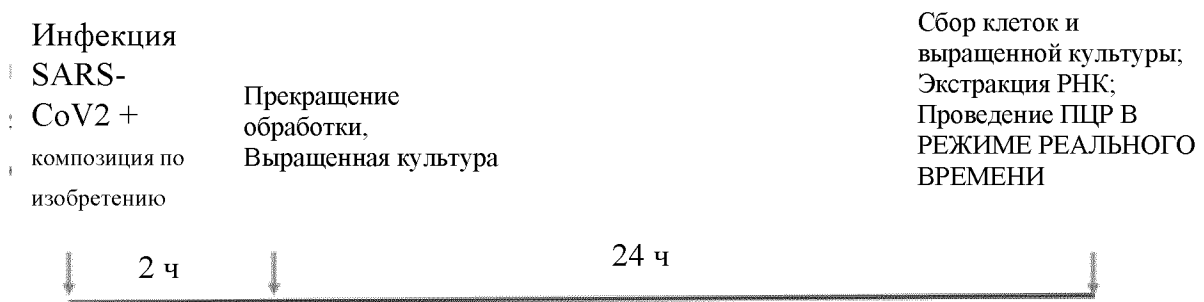
10. Композиция для применения по любому из п.п. 1–9, где указанные вызванные или обусловленные указанной вирусной инфекцией симптомы и/или расстройства выбраны из: тяжелого острого респираторного синдрома (SARS), респираторных осложнений, астмы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), бронхита, эмфиземы, муковисцидоза, кашля, коклюша, пневмонии, плеврита, бронхоолита, простудного заболевания, синусита, ринита, трахеита, фарингита, ларингита, острого ларинготрахеобронхита, эпиглоттита, бронхоэктаза, затрудненного дыхания, диспноэ, дыхательной недостаточности, нехватки дыхания, лихорадки, утомляемости, мышечных болей, мышечной болезненности, заложенности носа, насморка, першения в горле, желудочнокишечных симптомов, тошноты, диареи, почечной недостаточности, потери аппетита, общего недомогания.



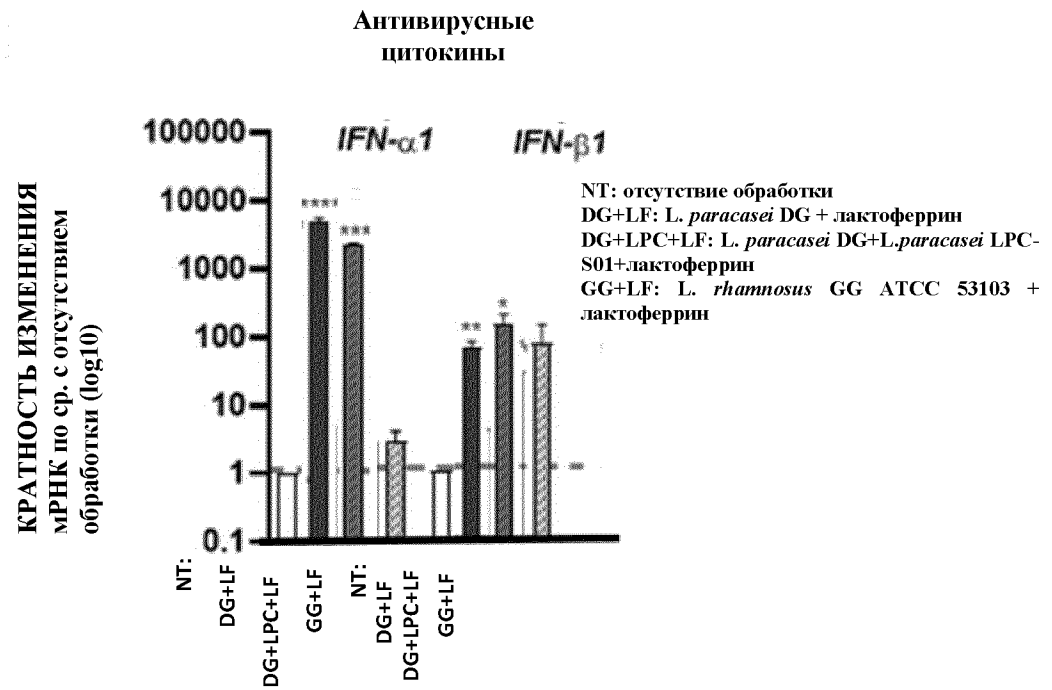
Фиг. 1А



Фиг. 1В

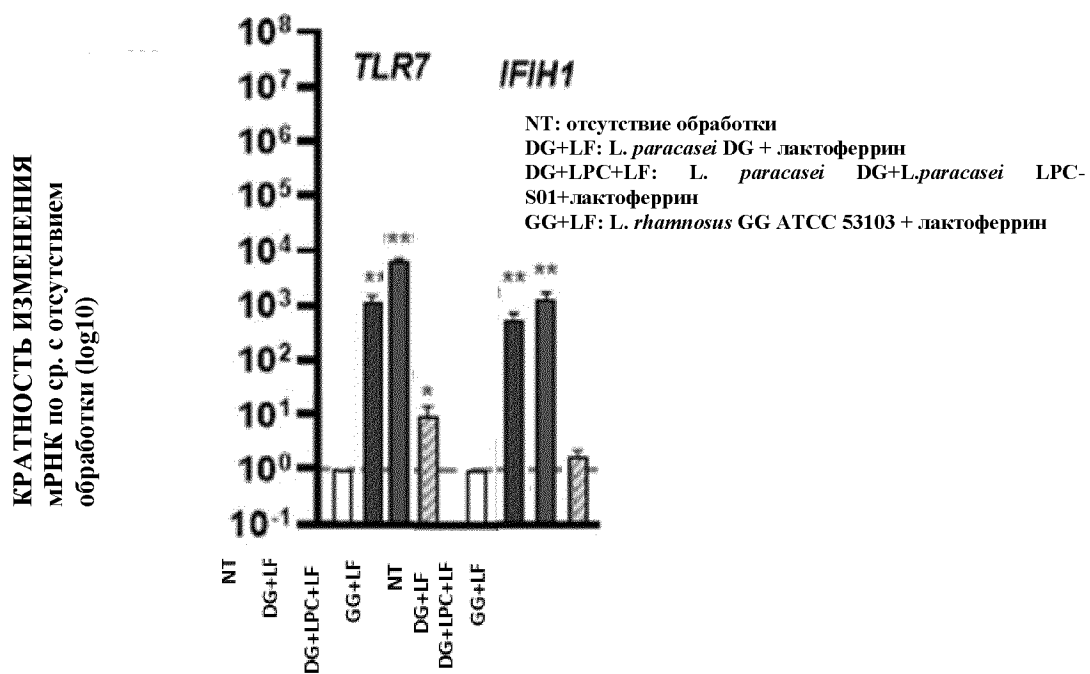


Фиг. 1С



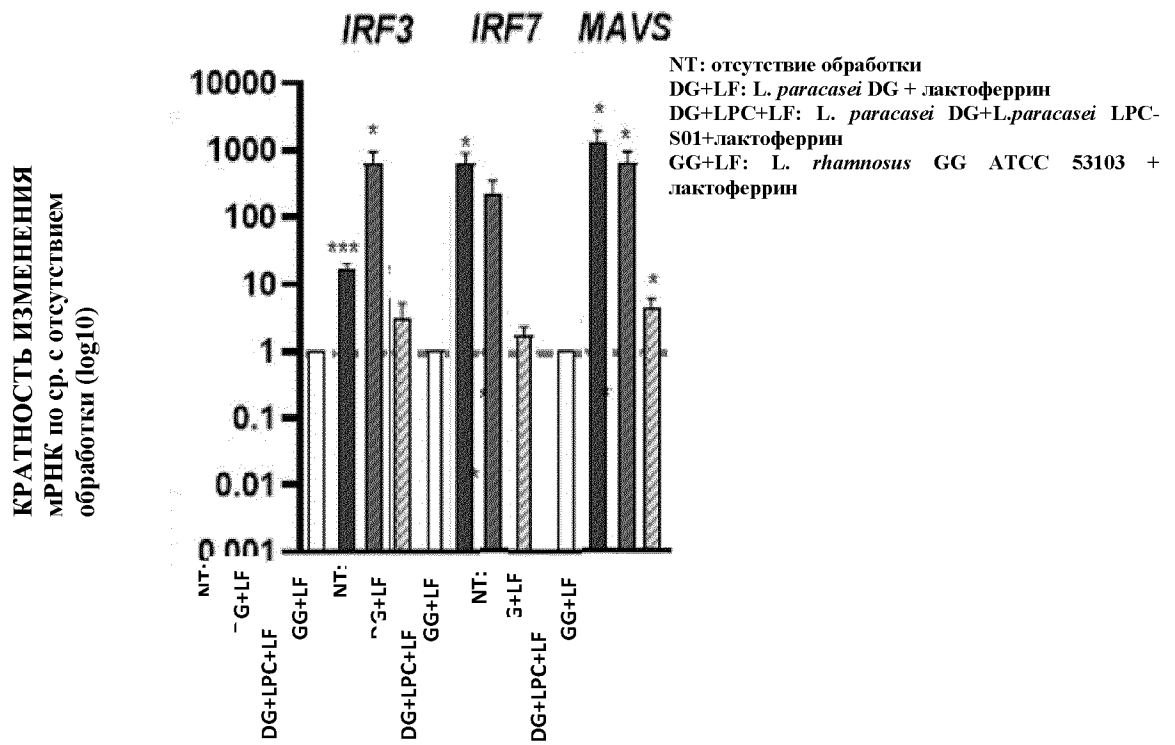
Фиг. 2А

Распознавание вируса

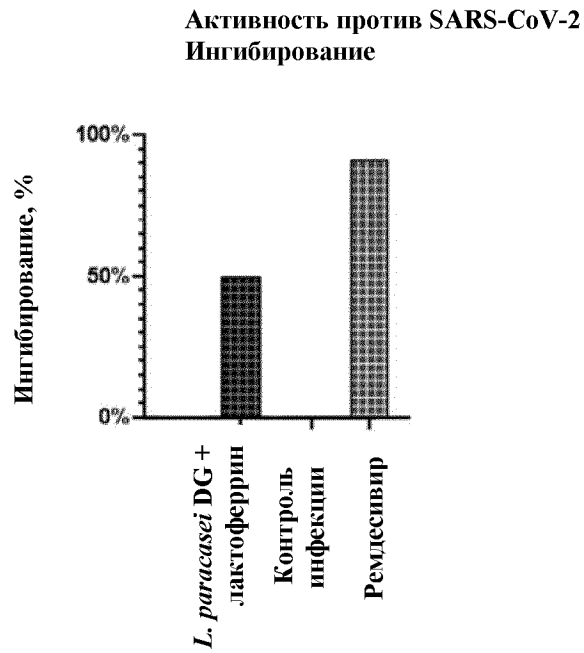


Фиг. 2В

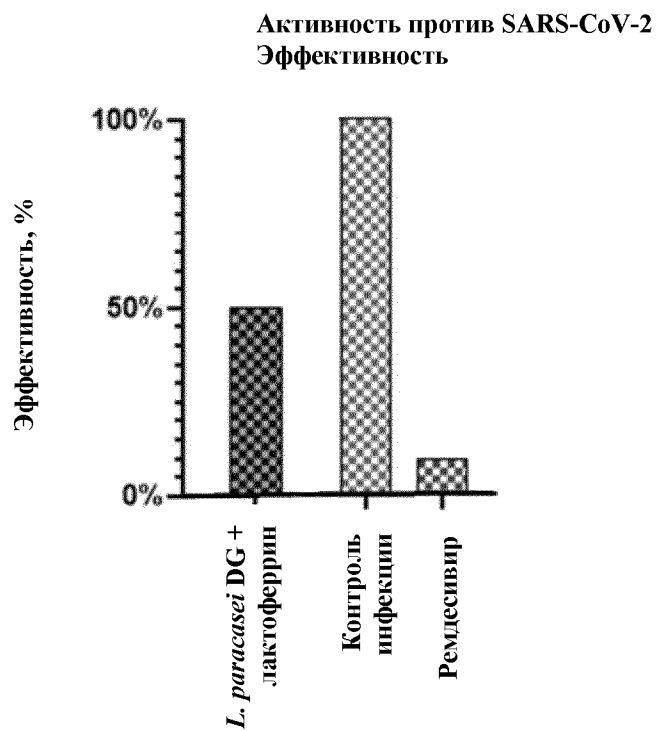
Передача сигнала антивирусного ответа



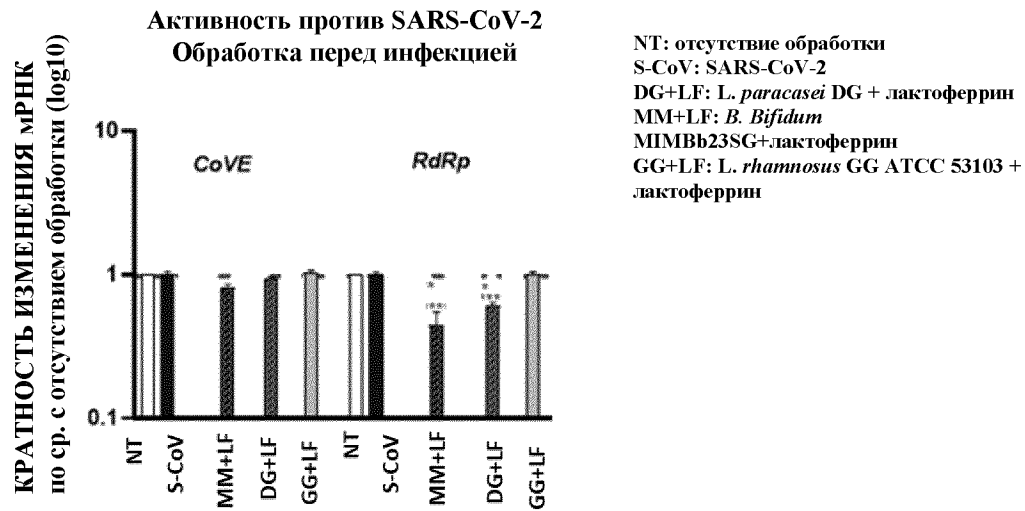
Фиг. 2С



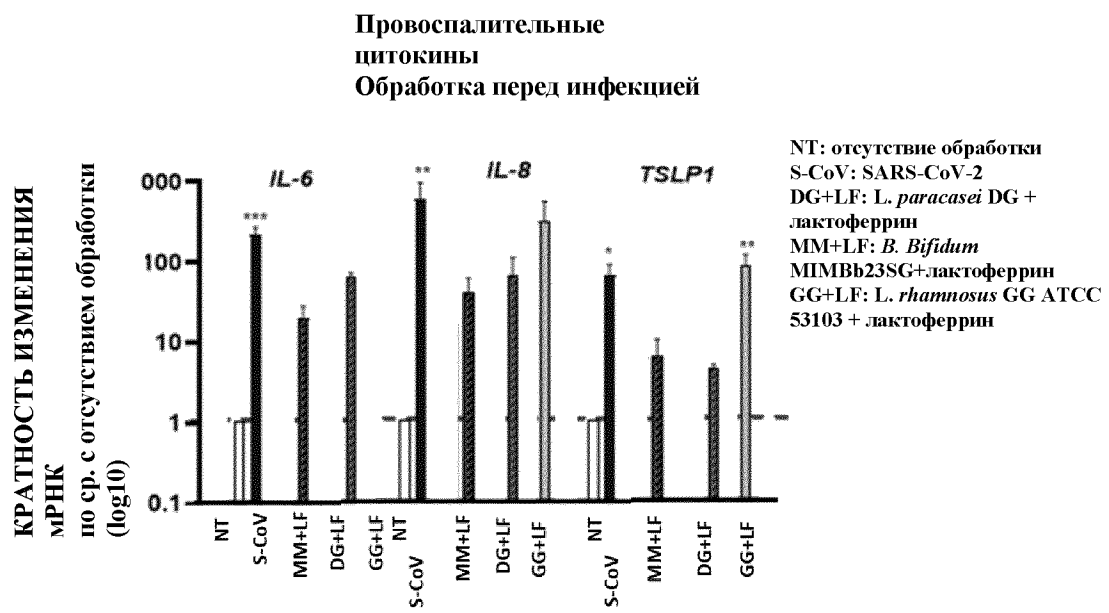
Фиг. 3А



Фиг. 3В



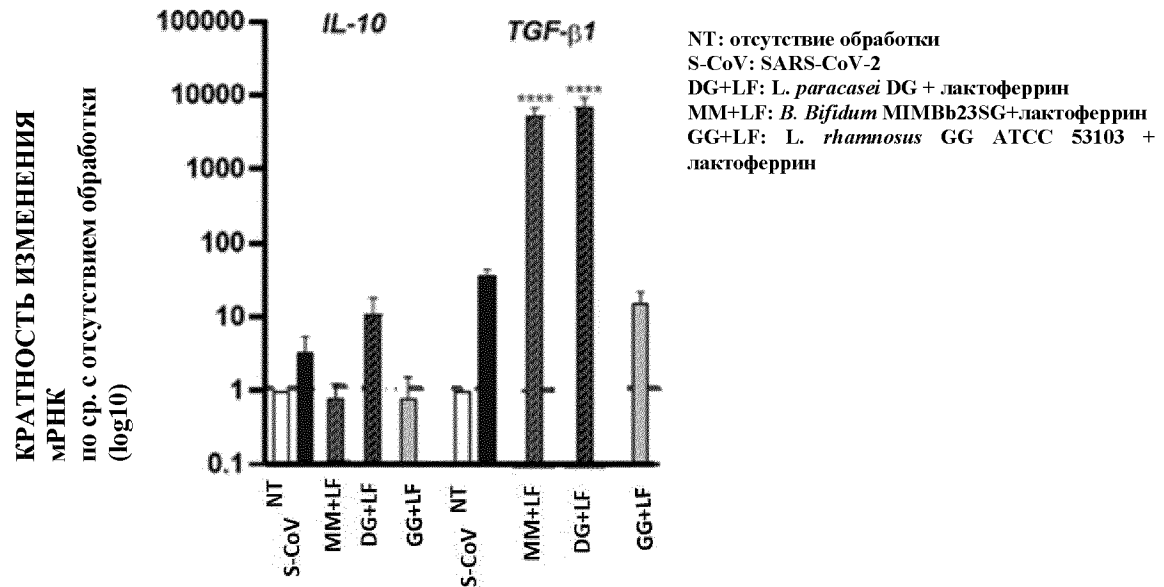
Фиг. 4А



Фиг. 4В

Профоспалительные и профибротические
цитокины

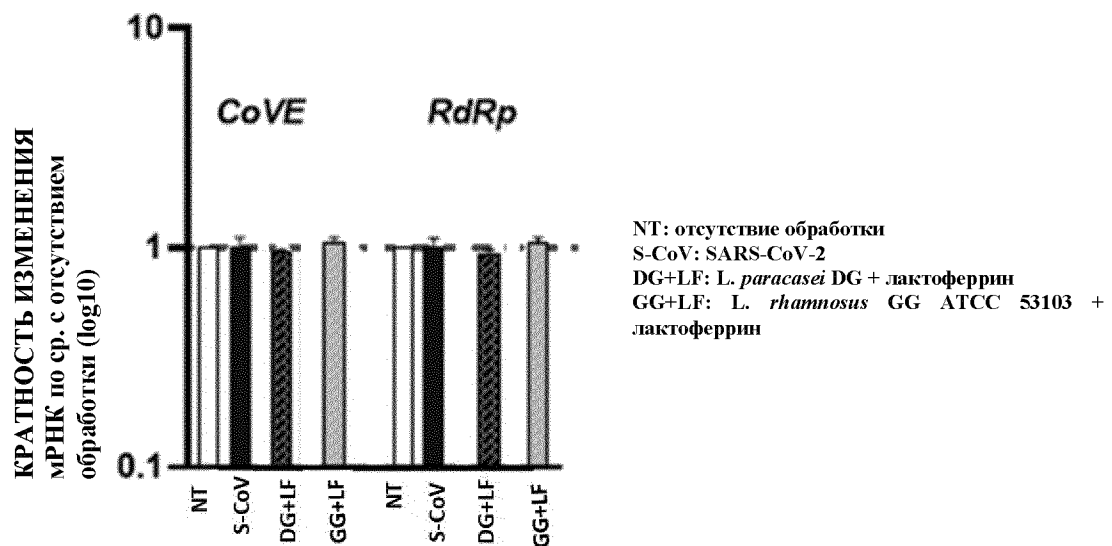
Обработка перед инфекцией



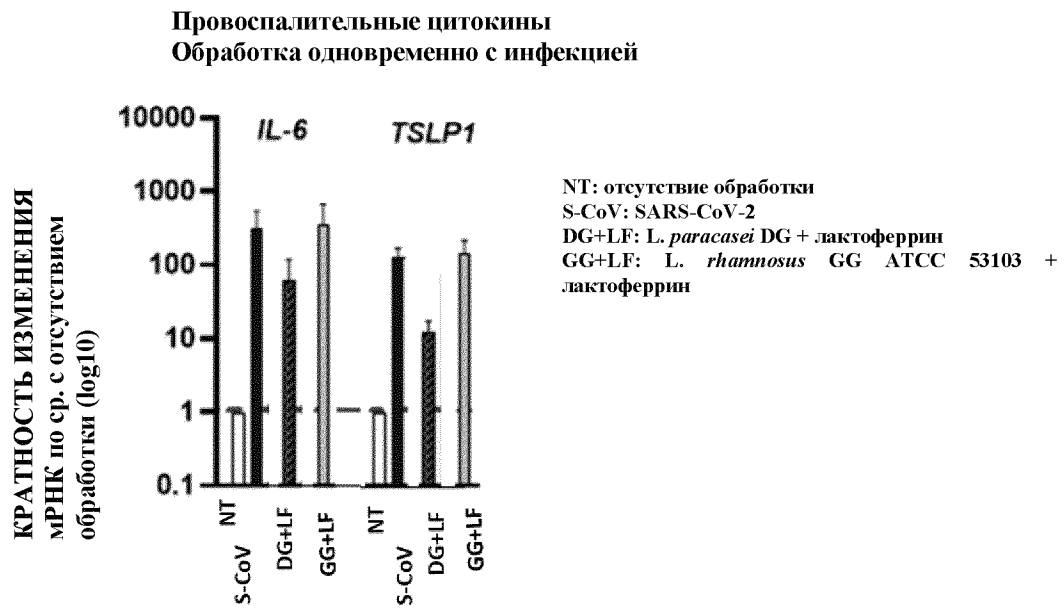
Фиг. 4С

Активность против SARS-CoV-2

Обработка одновременно с инфекцией



Фиг. 5А



Фиг. 5В