

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293232 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.27

(22) Дата подачи заявки
2021.05.10

(51) Int. Cl. A61K 39/12 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(54) ПАРАПОКСВИРУС ДЛЯ ПОДГОТОВИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ И ЛЕЧЕНИЯ
КОРОНАВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

(31) 20173670.9

(32) 2020.05.08

(33) EP

(86) PCT/EP2021/062250

(87) WO 2021/224503 2021.11.11

(71) Заявитель:

АЙКУРИС ГМБХ УНД КО. КГ (DE)

(72) Изобретатель:

Паулсен Даниэла (NL), Биркманн
Александр, Лишка Петер, Пфафф
Тамара, Циммерманн Хольгер (DE)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к лечению коронавирусных инфекций и к подготовке субъектов к такой инфекции путем введения парапоксвируса. Это лечение должно помочь иммунной системе в борьбе с вирусом и тем самым предотвратить и облегчить симптомы коронавирусного заболевания.

A1

202293232

202293232

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575833ЕА/032

ПАРАПОКСВИРУС ДЛЯ ПОДГОТОВИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ И ЛЕЧЕНИЯ КОРОНАВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

ОБЛАСТЬ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к лечению коронавирусных инфекций и к подготовке субъектов к такой инфекции путем введения парапоксвируса. Это лечение предназначено для помощи иммунной системе в борьбе с вирусом и предотвращения и облегчения таким образом симптомов коронавирусного заболевания.

ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Коронавирусы представляют собой оболочечные вирусы с положительно-смысловой одноцепочечной РНК, которые вызывают заболевания у млекопитающих и птиц. У людей они вызывают респираторные инфекции, включая обычную простуду, хотя некоторые вирусы, такие как коронавирусы SARS и MERS, могут быть смертельными.

Новые коронавирусы периодически появляются в разных регионах мира. SARS-CoV (коронавирус, связанный с тяжелым острым респираторным синдромом) возник в 2002 году и стал причиной 916 смертей во время эпидемии, имея уровень смертности около 12%. MERS-CoV (ближневосточный коронавирусный респираторный синдром) появился в 2012 году, когда было зарегистрировано 543 случая смерти и уровень смертности около 39%.

Недавно вспышка коронавируса, получившего название SARS-CoV-2, началась в Ухане, Китай, и распространилась по всему миру. Болезнь, вызываемая SARS-CoV-2, COVID-19 (коронавирусное заболевание 2019 г.), была объявлена ВОЗ пандемией 11 марта 2020 г. Тяжесть COVID-19 варьирует от бессимптомной или легкой до тяжелой, и у значительной части пациентов с клинически очевидной инфекцией развивается тяжелая форма заболевания. Уровень летальности варьирует в зависимости от страны и, как считается, составляет от 2% до 3%, но истинный уровень смертности неизвестен, поскольку неизвестно общее количество случаев. Хотя SARS-CoV-2, по-видимому, имеет более низкий уровень смертности, чем SARS-CoV и MERS-CoV, он оказался более заразным и смог распространиться по всему миру: к 6 мая было подтверждено около 3,66 миллиона случаев и 257000 подтвержденных случаев смерти и, предположительно, еще много неподтвержденных. Знания о COVID-19 неполны и постоянно дополняются.

Периодические эпидемии коронавируса показывают, что эти вирусы продолжают угрожать миру, поскольку они возникают спонтанно, легко распространяются и могут иметь серьезные последствия для жизни человека, включая не только проблемы со здоровьем, но и серьезные социальные и экономические последствия. Поэтому существует большая медицинская потребность в профилактике и лечении. Однако, поскольку известно, что часто происходит мутация и рекомбинация коронавирусов, они представляют собой постоянную проблему для борьбы с болезнями. В настоящее время нет ни вакцин, ни противовирусных препаратов для профилактики или лечения

коронавирусной инфекции человека. Огромное количество противовирусных препаратов в настоящее время тестируются по всему миру для определения их эффекта на коронавирус, но многообещающие кандидаты терпят неудачу.

Неожиданно, авторы изобретения обнаружили, что парапоксвирус полезен для подготовительной терапии субъектов и для лечения коронавирусных инфекций. Parapoxvirus ovis (PPVO) вызывает острые кожные инфекции у коз и овец, и хотя у людей он не приводит к серьезным заболеваниям, он индуцирует комплексный врожденный и адаптивный иммунный ответ у людей и лечит инфекции, вызванные некоторыми специфическими вирусами, такими как HBV (WO 2019/048640 A1). Однако иммунный ответ, индуцированный парапоксвирусом, является комплексным и не обязательно полезен для лечения вирусных инфекций в целом. Следовательно, нельзя было ожидать, что парапоксвирус будет полезен для подготовительной терапии субъектов и для лечения коронавирусных инфекций.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте настоящее изобретение относится к парапоксвирусному агенту для применения в (i) подготовке субъекта к коронавирусной инфекции или (ii) лечении коронавирусной инфекции у субъекта. Во втором аспекте изобретение относится к композиции или набору, включающему парапоксвирусный агент и коронавирусный агент. В третьем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции или набору, включающему парапоксвирусный агент для медицинского применения в соответствии с изобретением, где фармацевтическая композиция или набор включает парапоксвирусный агент и предпочтительно дополнительное лекарственное средство.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1: Стимуляция инактивированного парапоксвируса (iPPVO) индуцировала противовирусную активность против SARS-CoV-2, которая была усилена комбинаторными подходами. Культуры цельной крови стимулировали при помощи iPPVO +/- 5 мкг/мл ConA. Там, где не добавляли ConA, вместо него добавляли PBS. Носитель iPPVO +/- ConA или PBS +/- ConA, соответственно, служили в качестве контролей. 5 мкл/мл ConA испытывали в качестве костимула. Культуры инкубировали в течение 3 дней и собирали супернатанты. Супернатант переносили в клетки Vero-eGFP, которые через 2-4 часа инфицировали SARS-CoV-2 для определения противовирусной активности соответствующих образцов супернатанта и инкубировали в течение 5 дней. Флуоресценцию eGFP как показатель живых клеток анализировали с использованием программного обеспечения ImageJ. Среднее значение клеточного контроля, к которому не добавляли вирус, служило в качестве положительного контроля (среднее значение CC) и было установлено как 100% (см. верхнюю пунктирную линию). Клетки, инфицированные SARS-CoV2, но не обработанные, давали максимально возможное разрушение живых клеток и служили в качестве отрицательного контроля, определяемого как среднее значение вирусного контроля (среднее значение VC). Противовирусную активность образцов рассчитывали относительно среднего значения CC положительного контроля и

выражали в %.

Фиг. 2: iPPVO D1701 и iPPVO NZ2 стимулируют противовирусную активность против SARS-CoV-2. Культуры цельной крови стимулировали при помощи iPPVO. Носитель iPPVO служил в качестве отрицательного контроля. iPPVO D1701 служил в качестве положительного контроля. Культуры инкубировали в течение 3 дней и собирали супернатанты. Супернатант переносили в клетки Vero-eGFP, которые через 2-4 часа инфицировали SARS-CoV-2 для определения противовирусной активности соответствующих образцов супернатанта и инкубировали в течение 5 дней. Флуоресценцию eGFP в качестве показателя живых клеток, которые были защищены от SARS-CoV-2 благодаря противовирусной активности цитокинов в соответствующем супернатанте, измеряли с использованием программного обеспечения ImageJ. Противовирусную активность положительного контроля устанавливали как 100% (см. верхнюю пунктирную линию). Противовирусную активность образцов рассчитывали относительно положительного контроля и выражали в %. Нижняя пунктирная линия отмечает значение отрицательного контроля.

Фиг. 3: Титры инфекционных частиц SARS-CoV-2 в легких у хомяков, получавших iPPVO NZ2. Каждая точка представляет животное соответствующей группы. Горизонтальные линии представляют средние значения.

Фиг. 4: Выживаемость мышей, получавших iPPVO D1701 и инфицированных SARS-CoV-2. Животные, достигшие гуманных конечных результатов, были подвергнуты эвтаназии. Перекрывающиеся линии частично смещены для лучшей читаемости. Статистическую оценку осуществляли при помощи логарифмического рангового критерия (Мантеля-Кокса), *указывает значимую разницу при $p \leq 0,05$.

Фиг. 5: Масса тела мышей, получавших iPPVO D1701 и инфицированных SARS-CoV-2. Животные, достигшие гуманных конечных результатов, были подвергнуты эвтаназии, и они отмечены крестиком (†). Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка. Статистическую оценку осуществляли при помощи множественного t-критерия (с поправкой Холма-Сидака), ** указывает значимую разницу при $p \leq 0,01$.

Фиг. 6: Балльная клиническая оценка мышей, получавших iPPVO D1701 и инфицированных SARS-CoV-2. Животные, достигшие гуманных конечных результатов, были подвергнуты эвтаназии, и они отмечены крестиком (†). Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка. Статистическую оценку осуществляли при помощи множественного t-критерия (с поправкой Холма-Сидака), * и ** указывают значимую разницу при $p \leq 0,05$ и $p \leq 0,01$, соответственно.

Фиг. 7: Количественная оценка вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в легких и головном мозге мышей. Точки на графике представляют количество копий вируса каждого животного со средним геометрическим для каждой группы. Каждая точка представляет одну мышь. Снижение вирусной нагрузки у мышей, получавших iPPVO (слева), показано кратным уменьшением по сравнению с контрольной группой, получавшей плацебо (плацебо-контроль) (справа). Статистическую оценку данных

осуществляли при помощи U-критерия Манна-Уитни по сравнению с плацебо-контролем (ns: незначимый, **: $p \leq 0,01$).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Прежде чем настоящее изобретение будет подробно описано ниже, следует понимать, что это изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами и реагентами, описанными в настоящей заявке, поскольку они могут варьировать. Также следует понимать, что используемая в настоящей заявке терминология предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, все используемые в настоящей заявке технические и научные термины имеют те же значения, которые обычно понимает специалист в данной области.

Предпочтительно, используемые в настоящей заявке термины определены так, как описано в “A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)”, Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. and Kölbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland).

Несколько документов цитируются по всему тексту настоящего описания. Каждый из цитируемых в настоящей заявке документов (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, спецификации изготовителей, инструкции и т.д.), как выше, так и ниже, полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки.

Далее будут описаны элементы настоящего изобретения. Эти элементы перечислены вместе с конкретными вариантами осуществления, однако следует понимать, что их можно комбинировать любым образом и в любом количестве для создания дополнительных вариантов осуществления. Различным образом описанные примеры и предпочтительные варианты осуществления не должны толковаться как ограничивающие настоящее изобретение только явно описанными вариантами осуществления. Следует понимать, что настоящее описание поддерживает и охватывает варианты осуществления, которые сочетают конкретно описанные варианты осуществления с любым количеством раскрытых и/или предпочтительных элементов. Кроме того, любые перестановки и комбинации всех описанных элементов в настоящей заявке следует считать раскрытыми в описании настоящей заявки, если контекст не указывает иное.

Повсеместно в описании и последующей формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово “включают”, и варианты, такие как “включает” и “включающий”, следует понимать как подразумевающие включение указанного целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий. В предпочтительных вариантах осуществления “включать” может означать “состоять из”. Используемые в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если содержание явно не требует иного.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к парапоксвирусному агенту

для применения в (i) подготовке субъекта к коронавирусной инфекции или (ii) лечении коронавирусной инфекции у субъекта.

Парапоксвирусный агент

Парапоксвирус в предпочтительном варианте осуществления представляет собой Pararoxvirus ovis (PPVO). Это включает любой штамм PPVO, предпочтительно любой штамм вида PPVO, классифицированный Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV). Примерами штаммов являются NZ2, NZ7, NZ10, D1701, OV/20, OV/7, OV/C2, OV/mi-90, OV-Torino, SAOO, Bo29, orf11, Greek orf штамм 155 и Greek orf штамм 176. Предпочтительными штаммами являются NZ2 и D1701, особенно NZ2.

Парапоксвирусный агент в предпочтительном варианте осуществления представляет собой,

- (a) парапоксвирус как таковой или его фрагмент, или
- (b) агент, который включает генетическую информацию, кодирующую (a).

В более предпочтительном варианте осуществления, он представляет собой

- (i) живой вирион парапоксвируса,
- (ii) инактивированный вирион парапоксвируса,
- (iii) фрагмент (i) или (ii),
- (iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую любой из (i) - (iii),
- (v) вектор, включающий нуклеиновую кислоту по п. (iv), или
- (vi) клетку, включающую нуклеиновую кислоту по п. (iv) или вектор по п. (v).

Живой вирион парапоксвируса может быть аттенуирован или нет. В данной области техники известны аттенуированные вирионы парапоксвируса, т.е. вирионы, лишенные гена вирулентности, такого как *veg*f-e и/или *gif*. Фрагмент может распознаваться иммунной системой и предпочтительно стимулирует иммунный ответ (т.е. он представляет собой антиген и предпочтительно иммуноген) и может представлять собой любой фрагмент, хотя предпочтительно это фрагмент, который связан с паттерн-распознающим рецептором человека (PRR), например TLR9. В одном варианте осуществления фрагмент парапоксвируса представляет собой белок парапоксвируса.

Иллюстративные фрагменты представляют собой (иллюстративная кодирующая последовательность (положения нуклеотидов SEQ ID NO: 3, представляющей штамм NZ2) в скобках перед фрагментом): (3-539) ORF L1, (781-449) ORF L2r, (1933-1664) ORF L3r, (3269-2790) ORF L4r, (2799-3851) ORF L5, (2962-3753) ORF L6, (3784-3122) ORF L7r, (4341-4129) ORF L8r, (4904-4428) ORF 1ar, (6517-4970) ORF 1r, (8042-6684) ORF 2r, (9989-8070) ORF 3r, (11195-10062) ORF 4r, (11493-11227) ORF 5r, (11802-12038) ORF 6, (12358-12080) ORF 7r, (13980-12364) ORF 8r, (14826-14053) ORF 9ar, (15080-15394) ORF 10, (16838-15423) ORF 11r, (19021-16847) ORF 12r, (19704-19156) ORF 13r, (20314-19736) ORF 14r, (20401-22101) ORF 15, (22125-22940) ORF 6, (23003-23866) ORF 17, (26908-23873) ORF 18r, (26926-27213) ORF 19, (27626-27216) ORF 20r, (29754-27616) ORF 21r, (32217-29800) ORF 22r, (33380-32418) ORF 23r, (33602-33393) ORF 24r, (34466-33612) ORF 25r, (34735-34502) ORF 26r, (35905-34739) ORF 27r, (37194-35905) ORF 28r, (37200-39248)

ORF 29, (41037-39229) ORF 30r, (41374-42066) ORF 31, (42336-41731) ORF 32r, (42407-41997) ORF 33r, (42410-43765) ORF 34, (43770-43958) ORF 35, (43980-44534) ORF 36, (45727-44537) ORF 37r, (45760-46557) ORF 38, (46567-47568) ORF 39, (47572-48303) ORF 40, (48352-48621) ORF 41, (49887-48634) ORF 42r, (49917-50793) ORF 43, (50719-51102) ORF 44, (51059-51511) ORF 44a, (51584-52591) ORF 45, (52509-53066) ORF 46, (53523-53023) ORF 47r, (53607-57473) ORF 48, (58070-57528) ORF 49r, (57700-58662) ORF 50, (59674-58673) ORF 51r, (62089-59678) ORF 52r, (62198-62881) ORF 53, (62909-63862) ORF 55, (63858-64271) ORF 56, (64309-66831) ORF 57, (67266-66799) ORF 58r, (67803-67273) ORF 58ar, (67915-68607) ORF 59, (68624-70984) ORF 60, (70994-72898) ORF 61, (72938-73507) ORF 62, (73540-74211) ORF 63, (76120-74207) ORF 64r, (76749-76186) ORF 65r, (77698-76799) ORF 66r, (79343-77709) ORF 67r, (79816-79367) ORF 68r, (80529-79858) ORF 69r, (80774-80529) ORF 70r, (82815-80788) ORF 71r, (83835-82834) ORF 72r, (83874-85583) ORF 73, (85535-84402) ORF 74r, (88096-85574) ORF 75r, (87759-88667) ORF 76, (88920-88642) ORF 77r, (91652-88938) ORF 78r, (91667-92674) ORF 79, (93466-92681) ORF 80r, (93761-93486) ORF 81r, (94060-93788) ORF 82r, (94238-94080) ORF 83r, (94508-94242) ORF 84r, (95571-94498) ORF 85r, (96187-95600) ORF 86r, (96202-97665) ORF 87, (97915-97643) ORF 88r, (98251-99537) ORF 89, (99537-99974) ORF 90, (100001-101140) ORF 91, (101168-104650) ORF 92, (106354-104795) ORF 93r, (107947-106400) ORF 94r, (108256-107990) ORF 95r, (108719-108300) ORF 96r, (109679-108738) ORF 97r, (109861-109682) ORF 98r, (110830-10033) ORF 99r, (110208-110417) ORF 100, (110469-110651) ORF 100a, (110915-111397) ORF 101, (111419-111913) ORF 102, (111949-112485) ORF 103, (112593-113450) ORF 104, (113323-112967) ORF 105r, (113526-114152) ORF 106, (114199- - 115236) ORF 107, (115353-115787) ORF 108, (115859 - 116551) ORF 109, (116729-117523) ORF 110, (117572-117114) ORF 111r, (117423-118085) ORF 112, (118968-118375) ORF 114r, (118508-119119) ORF 115, (119588-120202) ORF 116, (120314-21231) ORF 117, (121380-123920) ORF 118, (121288-122256) ORF 119, (122350-123924) ORF 120, (123962-125566) ORF 121, (125193-124591) ORF 122r, (125689-123935) ORF 123r, (123839-123297) ORF 123ar, (125652-126170) ORF 124, (126121-125699) ORF 125r, (126279-127769) ORF 126, (127851-128408) ORF 127, (128520-130076) ORF 128, (130105-131700) ORF 129, (131790-133283) ORF 130, (133246-133920) ORF 131, (133972-134370) ORF 132, (134418-134693) ORF 133a, (134402-134992) ORF R1, (134853-134419) ORF R2r, (135628-135897) ORF R3, (136780-137112) ORF R4, и (137558-137022) ORF R5r. Группа фрагментов включает гомологи иллюстративных фрагментов, перечисленных выше, то есть гомологичные фрагменты другого парапоксвируса (например, виды или штаммы, как описано выше). Она также включает функциональные варианты иллюстративных фрагментов, перечисленных выше (функция является такой, как в основном определенная для фрагментов выше). Таким образом, группа фрагментов включает варианты с идентичностью последовательности по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или предпочтительно по меньшей мере 99% с теми фрагментами, которые кодируются иллюстративными кодирующими последовательностями SEQ ID NO: 3, указанными выше.

Инактивированный вирион парапоксвируса можно получить любыми способами, известными в данной области техники, подходящими для инактивации оболочечных вирусов, например, путем физической инактивации (например, путем воздействия тепла, особенно пастеризации или УФ-излучения) или путем химической инактивации (например, при воздействии низкого pH, детергента или инактивирующего агента, такого как этиленмин, бинарный этиленмин, формальдегид, глутаровый альдегид, 2,2'-дитиодипиридин или бета-пропиолактон). В предпочтительном варианте осуществления инактивированный вирион парапоксвируса представляет собой этиленмин- или бинарный этиленмин-инактивированный вирион, предпочтительно бинарный этиленмин-инактивированный вирион.

Парапоксвирусный агент может содержать генетическую информацию (ДНК или РНК), кодирующую гетерологичный (т.е. не относящийся к парапоксвирусу) антиген и/или иммуномодулятор, или альтернативно он может не содержать генетическую информацию, кодирующую гетерологичный антиген и/или иммуномодулятор. В одном варианте осуществления он не содержит генетическую информацию, кодирующую гетерологичный антиген, но необязательно содержит генетическую информацию, кодирующую иммуномодулятор.

В предпочтительном варианте осуществления парапоксвирусный агент представляет собой парапоксвирус дикого типа. Предпочтительно он представляет собой вирион PPVO, более предпочтительно инактивированный вирион PPVO (iPPVO).

Способы применения

Парапоксвирусный агент можно использовать отдельно или в комбинации с дополнительной схемой лечения для (i) подготовки субъекта к коронавирусной инфекции или (ii) лечения коронавирусной инфекции у субъекта.

В предпочтительном варианте осуществления подготовительной терапии и лечения дополнительная схема лечения может включать введение коронавирусного агента.

В частности, для подготовительной терапии дополнительная схема лечения может включать введение дополнительного иммуностимулирующего средства (например, адъюванта, агониста TLR, PRR, например цитозольного PRR, такого RIG-I-подобные рецепторы, включая RIG-I, MDA5 и LGP2, или митогена, в частности Т-клеточного митогена или активатора, такого как фитогемагглютинин (PHA), конканавалин (Con) A, агглютинин зародышей пшеницы (WGA), митоген фитолакки (PWM), лектин или анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), или В-клеточного митогена или активатора, такого как PWM, липополисахарид (LPS), анти-CD40 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антитело к В-клеточному антигенному рецептору или его антигенсвязывающий фрагмент. Иммуностимулирующее средство предпочтительно способствует противовирусному состоянию клеток. В частности, для лечения дополнительная схема лечения может включать введение одного или более дополнительных лекарственных средств и/или одной или нескольких дополнительных терапий (немедикаментозного/медикаментозного лечения), подходящих для лечения

субъекта, инфицированного коронавирусом или страдающего коронавирусом заболеванием. Одно или более дополнительных лекарственных средств предпочтительно выбирают из группы, состоящей из дополнительного иммуностимулирующего средства (как показано выше), противовирусного средства, антибиотика, адъюванта, глюкокортикоида, антигипертензивного средства (например, ингибитора ACE), гипогликемического лекарственного средства, противошокового лекарственного средства и лекарственного средства, подходящего для лечения одного или более симптомов коронавирусного заболевания и/или для дополнения одной или более дополнительных терапий (например, болеутоляющее средство, седативное, жаропонижающее, противовоспалительное, такое как IL-10, лекарство от кашля или иммунодепрессант). Одну или более дополнительных терапий предпочтительно выбирают из группы, состоящей из оксигенотерапии и экстракорпоральной поддержки органов (ECOS). Оксигенотерапия может быть пассивной (т.е. полагаться на дыхание субъекта) или активной (т.е. доставлять кислород в легкие, не полагаясь на дыхание субъекта). К пассивным терапиям относятся оксигенотерапия без давления и оксигенотерапия под давлением. Активные терапии включают искусственную вентиляцию легких и экстракорпоральную мембранную оксигенацию (ECMO, также особую форму ECOS). Примеры для ECOS включают ECMO, непрерывную заместительную почечную терапию (CRRT), гемофильтрацию (HF) и гемоперфузию (HP), например, для удаления воспалительных цитокинов и поддержки левого желудочка.

Конкретными примерами дополнительных лекарственных средств для подготовительной терапии и лечения являются: ивермектин, ингибиторы TMPRSS2 (например, хлорид аммония, ингибитор сериновой протеазы камостат мезилат) необязательно вместе с ингибитором CatB/L (например, E-64d), фавипиравир, пимодивир, балоксавир, необязательно вместе с марбоксилем, блокаторы IL-6 (например, сарилумаб, тоцилизумаб), сарилумаб, зитивекумаб, лопинавир, необязательно вместе с ритонавиром, хлорохин, гидроксихлорохин, ремдесивир, α -кетоамиды (например, циклопентилметил, циклогексилметил или α -кетоамид 13b), талидомид, маравирик, тенофовир, необязательно вместе с дизопроксидом, долутегравир, нелфинавир, ралтегравир, типранавир и интерфероны типа I (IFN-I, конкретно IFN- β 1). Предпочтительными примерами являются ремдесивир и талидомид.

Парапоксвирусный агент можно вводить любым путем, включая, но не ограничиваясь этим, внутривенный, внутримышечный, пероральный, парентеральный, местный, внутрикожный или подкожный путь. В конкретном варианте осуществления его можно вводить непосредственно в дыхательные пути, предпочтительно в нижние дыхательные пути, более предпочтительно в легкие (легочная доставка). Таким образом, его можно вводить в виде аэрозоля и/или путем ингаляции.

Доза парапоксвирусного агента (фактически всех агентов, описанных в настоящей заявке, включая дополнительное иммуностимулирующее средство, дополнительное лекарственное средство и коронавирусный агент) представляет собой фармацевтически

эффективную дозу, которую может определить специалист в данной области. Например, в случае, если агент представляет собой вирион (живой или инактивированный), она может находиться в диапазоне от 10^6 до 10^{10} частиц. Дозу можно вводить один или более раз, например, в течение периода <12 недель, <6 недель, <4 недель, <2 недель или <1 недели.

Коронавирус

Коронавирус в предпочтительном варианте осуществления представляет собой альфа-коронавирус или бета-коронавирус. Более предпочтительно он представляет собой респираторный коронавирус, т.е. коронавирус, вызывающий респираторное заболевание. Примерами альфа-коронавирусов являются HCoV-229E и CoV-NL63, а примерами бета-коронавирусов являются SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV, HCoV-HKU1 и HCoV-OC43. Предпочтительно, чтобы коронавирус представлял собой коронавирус MERS или SARS, причем предпочтительно, чтобы коронавирус SARS представлял собой вирус вида *“коронавирус, связанный с тяжелым острым респираторным синдромом”*, согласно классификации Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV). В наиболее предпочтительном варианте он представляет собой SARS-CoV-2.

Специалистам в данной области известно, что коронавирусы мутируют и что новые штаммы SARS-CoV-2 выделяются ежедневно, при этом к 6 апреля 2020 г. был выделен 461 штамм. Таким образом, с точки зрения определения последовательности предпочтительный вирус по изобретению имеет геном, включающий или состоящий из последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 (исходный штамм вспышки 2019 г. “Тяжелый острый респираторный синдром коронавируса 2, изолят Ухань-Ху-1”, эталонная последовательность NCBI NC_045512.2, версия от 30 марта 2020 г.) или его вариант с идентичностью последовательности по меньшей мере с 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или предпочтительно по меньшей мере 99%. В качестве альтернативы или в дополнение, предпочтительный вирус по изобретению имеет геном, включающий или состоящий из последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 2 (консенсусная последовательность SARS-CoV-2 из 153 сборок генома) или его вариант с идентичностью последовательности по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или предпочтительно по меньшей мере 99%. Предпочтительно, чтобы этот вариант был классифицирован Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV) как штамм SARS-CoV-2.

Коронавирусный агент

Коронавирусный агент обычно представляет собой агент, подходящий для лечения коронавирусной инфекции. Это может быть (a) коронавирус как таковой или его фрагмент, который распознается и предпочтительно стимулирует иммунный ответ (например, антиген и предпочтительно иммуноген), (b) агент, который включает генетическую информацию, кодирующую (a), или (c) агент, который препятствует инфицированию клетки коронавирусом или репликации коронавируса в клетке (в терапевтических условиях: способен при введении его в эффективном количестве субъекту, инфицированному коронавирусом, препятствовать заражению клетки

коронавирусом или репликации коронавируса в клетке). Коронавирусный агент предпочтительно выбирают из группы, включающей

- (i) инаktivированный коронавирус,
- (ii) антигенный, предпочтительно иммуногенный, фрагмент коронавируса (например, шиповидный белок или его фрагмент),
- (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую (i) или (ii),
- (iv) вектор, включающий нуклеиновую кислоту по п. (iii),
- (v) клетку, включающую нуклеиновую кислоту по п. (iii) или вектор по п. (iv),
- (vi) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающееся с коронавирусом или его фрагментом, предпочтительно оболочкой,
- (vii) нуклеотидный/нуклеозидный аналог, предпочтительно коронавирус-специфический,
- (viii) коронавирус-специфическую молекулу РНКи (РНК-интерференции),
- (ix) малую молекулу, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающиеся с сайтом межбелкового взаимодействия (PPI) между белком коронавируса и рассматриваемым белком, и
- (x) плазму крови субъекта, выздоровевшего от коронавирусной инфекции, предпочтительно от коронавирусного заболевания.

Коронавирус может быть инаktivирован, как описано выше для парапоксвируса.

PPI по п. (ix) предпочтительно представляет собой взаимодействие белка SARS-CoV-2 или его гомолога другого коронавируса и рассматриваемого белка (идентификатор белка Uniprot для каждого рассматриваемого белка <название, приведенное ниже >_HUMAN), выбранное из

- SARS-CoV2 E и AP3B1, BRD4, BRD2, CWC27, ZCH18 или CTL2;
- SARS-CoV2 M и MPPB, YIF1A, AT1B1, ACADM, ETFA, STOM, VKGC, VATA, PSMD8, REEP5, MPPA, ANO6, PREP, ZNT9, FAKD5, ZNT7, GCP3, COQ8B, SAAL1, REEP6, INT4, ODC, GCP2, SYTM, RTN4, FA8A1, AASS, AKP8L, AAR2 или BZW2
- SARS-CoV2 N и U3IP2, PABP1, CSK22, CSK2B, G3BP1, PABP4, LARP1, FA98A, SNIP1, RENT1, MOV10, G3BP2, DDX21, RBM28 или RL36;
- SARS-CoV2 Spike и ACE2, GOGA7 или ZDHC5;
- SARS-CoV2 nsp1 и DPOLA, PRI1, PRI2, DPOA2, GT251 или PKP2;
- SARS-CoV2 nsp10 и AP2A2, ALR, ERG11, AP2M1 или GRPE1;
- SARS-CoV2 nsp11 и TBCA;
- SARS-CoV2 nsp12 и SBNO1, BCKD, AKAP8, MYCB2, SLU7, RIPK1, UBP2L, TYSD1, PDZ11, PRC2B, UBAP2, ZN318, CRTC3, UBP54, Z3H7A, LAR4B, RBM41, HTF4, PPIL3 или PKHA5;
- SARS-CoV2 nsp13 и TBKB1, CTRO, HSBP1, PCNT, FR1OP, KAP2, KAPCA, KAP3, RAD1, CENPF, TLE1, TLE3, TLE5, GOGA3, GOGA2, GOGB1, GRAP1, CE350, MYOME, CP135, CEP68, CNTRL, RB6I2, GCC2, CLIP4, NIN, CE112, MIPO1, UBP13, GCC1, JKIP1, CK5P2, AKAP9, GORS1, FYCO1, CA050, CP250, TBK1, HOOK1 или NINL;

- SARS-CoV2 nsp14 и AGAL, IMDH2 или SIR5;
- SARS-CoV2 nsp15 NTF2, ARF6 или RNF41;
- SARS-CoV2 nsp2 и S27A2, IF4E2, NCPR, GDS1, WASC4, FKB15 или GGYF2;
- SARS-CoV2 nsp4 и IDE, TIM10, ALG11, PO210, TIM29, DJC11, T10B или TIM9;
- SARS-CoV2 nsp5 и HDAC2;
- SARS-CoV2 nsp5_C145A и GPX1 или TRM1;
- SARS-CoV2 nsp6 и ATP5L, VAS1, SGMR1 или AT133;
- SARS-CoV2 nsp7 и ADAS, CYB5B, ACSL3, NB5R3, RALA, COMT, RAB5C, RAB7A, RAB8A, RAB2A, RAB10, RAB14, RHOA, RAB1A, GBB1, GBG5, LMAN2, MOGS, TOIP1, MARC1, QSOX2, HS2ST, NDUF2, SCPDL, SCRB1, NAT14, DCAKD, F162A, TIM14, SELS, PGES2 или RAB18;
- SARS-CoV2 nsp8 и MPP10, SRP72, ATE1, NSD2, SRP19, SRP54, RT25, DDX10, LARP7, MEPCE, NGDN, EXOS8, SYNM, NOL10, CCD86, SPCS, EXOS5, EXOS3, AATF, HECD1, RT02, RT05, EXOS2 или RT27;
- SARS-CoV2 nsp9 и T2FB, FBN1, FBN2, NU214, NUP62, DCAF7, IF4H, NUP54, MIB1, NEK9, ZN503, NUP88, NUP58, MAT2B или FBLN5;
- SARS-CoV2 orf10 и PPT1, CUL2, MA7D1, THTPA, ZY11B, TIM8B, RBX1, ELOC или ELOB;
- SARS-CoV2 orf3a и HMOX1, TRI59, AR6P6, VPS39, CLCC1, VPS11, SUN2 или ALG5;
- SARS-CoV2 orf3b и STML2;
- SARS-CoV2 orf6 и NUP98, RAE1L или MTCH1;
- SARS-CoV2 orf7a и HEAT3 или MDN1;
- SARS-CoV2 orf8 и PLOD2, TOR1A, STC2, TPA, ITB1, CISD3, CO6A1, PVR, DNMT1, LYOX, PCSK6, INHBE, NPC2, MFGM, OS9, NPTX1, PLGT2, PLGT3, ERO1B, PLD3, FXRD2, CHSS2, PUSL1, EMC1, GGH, ERLEC, I17RA, NGLY1, H6ST2, SDF2, NEUR1, GDF15, TM2D3, ERP44, EDEM3, SIL1, OFUT1, SMOC1, PKHF2, FXL12, UGGG2, CHPF2, ATS1, HYOU1, FKBP7, ADAM9 или FKB10;
- SARS-CoV2 orf9b и NHRF1, CHM2A, CSDE1, TOM70, MARK3, MARK2, DPH5, DCTP1, MARK1, PTBP2 или BAG5; и
- SARS-CoV2 orf9c и UBXN8, GPAA1, WFS1, MRP1, PAR2, SCAP, D19L1, SGMR2, ZNT6, TAPT1, ERMP1, NLRX1, RETR3, PIGO, FACR2, ECSIT, ALG8, TM39B, GHITM, ACAD9, NFIP2, BCS1, CIA30, TMED5, NDUB9 или PIGS.

Антитело к сайту PPI или его антигенсвязывающий фрагмент можно получить обычными способами. Например, можно создать антитела или их антигенсвязывающие фрагменты к одному из взаимодействующих белков, а затем их скринировать на вмешательство во взаимодействие.

Малую молекулу по п. (ix) предпочтительно выбирают из группы, состоящей из лоратадина, даунорубина, мидостаурина, понатиниба, силмитасертиба, вальпроевой кислоты, галоперидола, метформина, мигаластата, S-верапамила, индометацина,

руксолитиниба, микофеноловой кислоты, энтакапона, рибавирина, E-52862, меримеподиба, RVX-208, XL413, AC-55541, апицидина, AZ3451, AZ8838, бафиломицина A1, CCT 365623, GB110, H-89, JQ1, PB28, PD-144418, RS-PPCC, TMCB, UCPH-101, ZINC1775962367, ZINC4326719, ZINC4511851, ZINC95559591, 4E2RCat, ABBV-744, камостата, каптоприла, CB5083, хлорамфеникола, хлорохина, соединения 10-ингибитора PI4K-III β (Rutaganira, F. U. et al., J. Med. Chem. 59, 1830-1839 (2016)), соединения 2-ингибитора циклофилина (Mackman, R. L. et al., J. Med. Chem. 61, 9473-9499 (2018)), CPI-0610, дабрафениба, DBeQ, dBET6, IHVR-19029, линезолида, лизиноприла, миноксидила, мл240, MZ1, нафамостата, певонедистата, PS3061, рапамицина (сиролимуса), санглиферина A, сапанисертиба (INK128/MIN128), FK-506 (такролимуса), тернатина 4 (DA3), тигециклина, томивосертиба (eFT-508), вердинексора, WDB002, азацитидина, селинексора и зотатифина (eFT226).

Коронавирусная инфекция/заболевание

Коронавирусная инфекция определяется проникновением коронавируса по меньшей мере в одну клетку субъекта и его репликацией по меньшей мере в одной клетке. Предпочтительно инфекция представляет собой инфекцию дыхательных путей, включая верхние дыхательные пути (нос и носовые проходы, околоносовые пазухи, глотку и часть гортани выше голосовых складок (связок)) и нижние дыхательные пути (часть гортани ниже голосовых связок, трахею, бронхи, бронхиолы и легкие, включая дыхательные бронхиолы, альвеолярные ходы, альвеолярные мешочки и альвеолы). Более предпочтительно, она представляет собой инфекцию нижних дыхательных путей, наиболее предпочтительно легких (включая одну или более респираторных бронхиол, альвеолярных ходов, альвеолярных мешочков и альвеол). Инфекцию можно дополнительно охарактеризовать иммунологически по наличию по меньшей мере одного коронавирус-антиген-специфического иммунного фактора, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из В-клеток, фолликулярных хелперных Т-клеток (TFH-клеток), активированных CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток (в частности, также CD38⁺HLA-DR⁺), IgM антител и IgG антител. В качестве альтернативы или в дополнение, ее можно охарактеризовать иммунологически при помощи коронавирус-специфического цитокинового профиля, предпочтительно в крови или в месте инфекции, как указано выше (наиболее предпочтительно в легких). Эти профили могут быть определены квалифицированным специалистом без чрезмерной нагрузки, например, путем взятия образца ткани, например из легкого, инфицирования ее коронавирусом и определения экспрессии цитокинов. Примерами коронавирус-специфических профилей цитокинов являются (a) для SARS-CoV: активация одного или более, предпочтительно всех из IFN-I (например, IFN- β), IFN-II (IFN- γ), IFN-III (IFN- λ 1, IFN- λ 2 и IFN- λ 3), IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-8, MCP-1, MIP-1 α , RANTES, CXCL1, CXCL2, CXCL5 и CXCL9, и предпочтительно отсутствие активации CXCL10; и (b) для SARS-CoV-2: активация одного или более, предпочтительно всех из IL-6, MCP-1, CXCL1, CXCL5 и/или CXCL10, и предпочтительно отсутствие активации любого IFN и/или любого одного или всех из IL-

IL-12, IL-8, MIP-1альфа, RANTES, CXCL2 и CXCL9.

Предпочтительным субъектом является человек. Хотя, как известно авторам изобретения, коронавирус одинаково заражает всех людей, существуют факторы риска заражения коронавирусной инфекцией:

(i) Недавнее (в течение инкубационного периода, т.е. в течение последних 27, 24 или 19 дней, предпочтительно 14 (CDC, NHC) или 10 (ВОЗ) дней) пребывание в районе с продолжающимся распространением коронавирусной инфекции или прибытие из него. Район предпочтительно является 'областью заражения' как это определено ВОЗ. "Недавнее" может означать в течение инкубационного периода коронавируса, предпочтительно в течение последних 27, 24 или предпочтительно 19 дней, более предпочтительно 14 дней или наиболее предпочтительно 10 дней.

(ii) Контакт с субъектом, инфицированным коронавирусом, в частности с субъектом, имеющим один или несколько симптомов заболевания коронавирусом. "Контакт" может означать контактирование с респираторными каплями человека (например, в пределах досягаемости респираторных капель в воздухе или при контакте с поверхностями, к которым прикасается человек или на которые попали респираторные капли).

(iii) Профессия с повышенным риском, которая обычно требует регулярного контакта (контакт определен выше) с широкой общественностью (например, по меньшей мере ежедневно или по меньшей мере еженедельно), например, медицинский работник, в частности в больнице, работник по уходу (например, за детьми или пожилыми людьми) или работник розничной торговли (например, в супермаркете или аптеке).

Коронавирусная инфекция может вызывать или не вызывать симптомы коронавирусного заболевания у субъекта. Термины "коронавирусная инфекция" и "коронавирусное заболевание" различаются в настоящей заявке наличием по меньшей мере одного симптома коронавирусного заболевания. Пока инфекция не сопровождается хотя бы одним симптомом коронавирусного заболевания, она (или субъект) является бессимптомной (включает предсимптомную). Термин "коронавирусное заболевание" в контексте настоящей заявки требует присутствия коронавирусной инфекции и по меньшей мере одного симптома коронавирусного заболевания (также указано в настоящей заявке как "симптоматическая инфекция").

Симптомы коронавируса включают сухой кашель, лихорадку ($\geq 37,8^{\circ}\text{C}$), насморк и/или заложенность носа, утомляемость, затрудненное дыхание, пневмонию, органную (например, сердечную, легочную, печеночную и/или почечную) недостаточность, зуд в горле, головную боль, боль в суставах, тошноту, диарею, озноб, лимфопению, потерю обоняния и/или вкуса. Предпочтительно, коронавирусное заболевание характеризуется наличием двух или более, трех или более или четырех или более симптомов, предпочтительно включая один или два или более из сухого кашля, лихорадки ($\geq 37,8^{\circ}\text{C}$), затрудненного дыхания, потери обоняния и/или потери вкуса.

Коронавирусное заболевание предпочтительно представляет собой респираторное

заболевание (например, SARS или MERS), более предпочтительно Covid-19. Коронавирусное заболевание может протекать в легкой (нетяжелой) или тяжелой форме. Легкое течение характеризуется наличием одного или более только легких симптомов (т.е. отсутствие тяжелых симптомов) коронавирусного заболевания. Легкие симптомы выбраны из группы, состоящей из сухого кашля, легкой лихорадки (от $\geq 37,8^{\circ}\text{C}$ до $< 40^{\circ}\text{C}$), насморка и/или заложенности носа, утомляемости, зуда в горле, головной боли, боли в суставах, тошноты, диареи, озноба, лимфопении, потери обоняния и потери вкуса. Тяжелые симптомы выбраны из группы, состоящей из затруднения дыхания, в частности острого респираторного дистресс-синдрома, пневмонии, органной (например, сердечной, легочной, печеночной и/или почечной) недостаточности и высокой температуры ($\geq 40^{\circ}\text{C}$). Тяжелое течение клинически характеризуется одним или более из следующих признаков (i) наличие одного или более тяжелых симптомов коронавирусного заболевания, (ii) необходимость госпитализации, в частности необходимость госпитализации в отделение интенсивной терапии (ICU), и/или необходимость в оксигенотерапии (как определено выше), в частности в респираторе (также называемого вентилятором), и/или (iii) смерть субъекта. Необходимость в госпитализации характеризуется одним или более из следующих признаков: клинические или рентгенологические признаки пневмонии, острый респираторный дистресс-синдром и/или наличие двух или более симптомов, включая по меньшей мере лихорадку и постоянный кашель (с мокротой или без нее), в частности постоянный кашель (например, не менее 3 дней). Необходимость в госпитализации в отделение интенсивной терапии характеризуется тяжелой пневмонией и/или одним или более тяжелыми осложнениями. Тяжелая пневмония характеризуется тахипноэ (в возрасте до 2 месяцев: 60 или более вдохов в минуту; в возрасте от 2 до 11 месяцев: 50 или более вдохов в минуту, в возрасте от 1 до 5 лет: 40 или более вдохов в минуту, в возрасте > 5 лет: 30 или более вдохов в минуту), респираторным дистресс-синдромом и/или недостаточной оксигенацией (например, SpO_2 93% или менее у взрослых и 90% или менее у детей). Тяжелые осложнения означают осложнения, которые при отсутствии лечения приводят к летальному исходу, и включают, например, септический шок, острый респираторный дистресс-синдром и органную недостаточность. В качестве альтернативы или в дополнение, тяжелое течение может быть охарактеризовано иммунологически, т.е. наличием или развитием цитокинового шторма, в частности в легких. Коронавирусный цитокиновый шторм характеризуется гипервоспалением, предпочтительно повышением (по сравнению с инфицированным, но бессимптомным субъектом, предпочтительно после инкубационного периода, или средним из множества таких субъектов) одного или более из IL-2, IL-7, TNF-альфа, MIP-1альфа, MCP-1, G-CSF и/или CXCL10, где увеличение можно характеризовать как чрезмерное и/или неконтролируемое. В частности, цитокиновый шторм представляет собой цитокиновый шторм Covid-19. Кроме того, цитокиновый шторм предпочтительно возникает в дыхательных путях, как определено выше для инфекции (включая их предпочтительные части).

Хотя коронавирусное заболевание может протекать тяжело у любого субъекта, независимо от возраста или ранее существовавшего состояния, тем не менее существуют факторы риска тяжелого течения коронавирусного заболевания, включая:

(i) возраст, например, по меньшей мере 40, 50, 60, 70, или 80 лет, с увеличением риска с возрастом,

(ii) мужской пол,

(iii) курение и

(iii) наличие одного или более сопутствующих заболеваний, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из сердечно-сосудистых заболеваний, диабета, респираторных заболеваний (в частности, хронических), гипертензии, СПИДа, рака, заболеваний печени, заболеваний почек и заболеваний легких. Особым сопутствующим заболеванием в качестве фактора риска является респираторное заболевание.

Подготовительная терапия субъекта

Подготовительная терапия субъекта предназначена для подготовки субъекта к коронавирусной инфекции, что обеспечивается иммуномодуляцией, приводя к медицинскому применению изобретения. Ее также можно назвать “подготовительным лечением”, “профилактическим лечением” или, в отношении заболевания в связи с изобретением, “предупреждающее лечение” или “превентивное лечение”. Это не обязательно должно предотвратить коронавирусную инфекцию. Таким образом, субъект еще не заражен коронавирусом.

Таким образом, подготовительная терапия может иметь один или несколько иммунологических эффектов, или (предпочтительно и) она может иметь один или несколько клинических эффектов, и то и другое после того, как субъект будет инфицирован. Эти иммунологические эффекты предпочтительно выбраны из группы, состоящей из

(I-i) увеличения количества одного или более коронавирус-антиген-специфических иммунных факторов (как определено выше) в организме субъекта или в части организма субъекта,

(I-ii) ингибирования (т.е. уменьшения или прекращения) репликации коронавируса в организме субъекта или в части организма субъекта,

(I-iii) уменьшения коронавирусной нагрузки в организме субъекта или в части организма субъекта, и

(I-iv) предотвращения или улучшения коронавирус-специфического цитокинового профиля или цитокинового шторма (как определено выше) в организме субъекта или в части организма субъекта.

При этом частью организма субъекта предпочтительно являются дыхательные пути (верхние или предпочтительно нижние дыхательные пути, более предпочтительно легкие). (I-ii) предпочтительнее (I-i), а (I-iii) предпочтительнее (I-ii). Кроме того, (I-ii) может включать (I-i), а (I-iii) может включать (I-i) и/или (I-ii). (I-iv), как правило, желательно.

Клинические эффекты предпочтительно выбраны из группы, состоящей из
 (C-i) уменьшения контагиозности,
 (C-ii) задержки начала коронавирусного заболевания,
 (C-iii) уменьшения степени одного или более предполагаемых симптомов коронавирусного заболевания, предпочтительно одного или более предполагаемых тяжелых симптомов коронавирусного заболевания,
 (C-iv) предотвращения одного или более симптомов коронавирусного заболевания, предпочтительно одного или более тяжелых симптомов коронавирусного заболевания,
 (C-v) предотвращения тяжелого течения коронавирусного заболевания, и
 (C-vi) предотвращения коронавирусного заболевания.

При этом (C-ii) предпочтительнее (C-i), (C-iii) предпочтительнее (C-ii), (C-iv) предпочтительнее (C-iii), (C-v) предпочтительнее (C-iv), а (C-vi) предпочтительнее (C-v).

Предполагаемыми симптомами являются симптомы, которые еще не присутствуют, но могут или будут возникать. Таким образом, уменьшение степени предполагаемых симптомов относится к профилактическому лечению симптомов.

Соответственно, парапоксвирусный агент может быть предназначен для применения в соответствии с одним или более из (I-i)-(I-iv) и/или в соответствии с одним или более из (C-i)-(C-vi) для субъекта, еще не инфицированного коронавирусом. Другими словами, парапоксвирусный агент способен при его введении в эффективном количестве достигать одного или более из (I-i)-(I-iv) и/или одного или более из (C-i)-(C-vi).

В предпочтительном варианте осуществления субъект, подлежащий подготовительному лечению, характеризуется одним или более факторами риска заражения коронавирусной инфекцией и/или одним или более факторами риска тяжелого течения коронавирусного заболевания.

В другом варианте осуществления субъекта, подлежащего подготовительному лечению, выбирают способом в соответствии с соответствующим дополнительным аспектом изобретения, описанным ниже.

Лечение субъекта

Лечение коронавирусной инфекции (т.е. субъекта, который инфицирован) не обязательно означает лечение или предотвращение коронавирусного заболевания, хотя желательно, чтобы это было так. Таким образом, лечение может относиться к лечению бессимптомной инфекции (т.е. инфицированного субъекта, не имеющего симптомов) или коронавирусного заболевания (т.е. инфицированного субъекта, имеющего один или несколько симптомов).

Лечение может иметь один или несколько иммунологических эффектов, или (предпочтительно и) оно может иметь один или несколько клинических эффектов. Эти иммунологические эффекты предпочтительно являются такими, как определено выше для подготовительной терапии либо в отношении бессимптомной инфекции, либо заболевания. Клинические эффекты при бессимптомной инфекции предпочтительно выбраны из группы, состоящей из (C-i)-(C-vi), как определено выше для

подготовительной терапии. Клинические эффекты при симптоматической инфекции (т.е. при коронавирусном заболевании) предпочтительно выбраны из группы, состоящей из

(C-i), (C-vi), как они оба определены выше для подготовительной терапии,

(C-vii) облегчения одного или более (или, в идеале, всех) симптомов коронавирусного заболевания,

(C-viii) предотвращения одного или более (или, в идеале, всех) дополнительных симптомов коронавирусного заболевания, и

(C-ix) облегчения, предпочтительно предотвращения, тяжелого течения коронавирусного заболевания.

В данном случае “дополнительными симптомами” являются те, которые еще не характеризуют симптоматическую инфекцию.

Соответственно, парапоксвирусный агент может быть предназначен для применения в соответствии с одним или более из (I-i)-(I-iv) и/или в соответствии с одним или более из (C-i)-(C-ix) для субъекта, инфицированного коронавирусом. Другими словами, парапоксвирус способен при введении его эффективного количества достигать одного или более из (I-i)-(I-iv) и/или одного или более из (C-i)-(C-ix). В предпочтительном варианте осуществления парапоксвирусный агент предназначен для профилактики или лечения коронавирусного заболевания.

Как указано выше, субъект, подлежащий лечению, может быть бессимптомным. Альтернативно, субъект, подлежащий лечению, может иметь коронавирусное заболевание. Субъект с коронавирусным заболеванием может не иметь каких-либо серьезных симптомов, например, у него есть только один или несколько легких симптомов. В другом варианте осуществления у него может быть тяжелое течение коронавирусной болезни (исключая (iii) смерть; предпочтительно (i) один или несколько тяжелых симптомов). В предпочтительном варианте осуществления субъект, подлежащий лечению (например, любой из вышеуказанных субъектов, за исключением тех, у кого уже имеется тяжелое течение коронавирусного заболевания), характеризуется одним или более факторами риска тяжелого течения коронавирусного заболевания.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления субъект характеризуется по меньшей мере одним из следующих:

(i) отсутствие цитокинового шторма в легких и, предпочтительно, отсутствие цитокинового шторма вообще,

(ii) возраст до 75, 70 или предпочтительно 65 лет, более предпочтительно от 18 до 65 лет, и/или

(iii) оценка по шкале HScore 169 или меньше, предпочтительно 150 или меньше, 130 или меньше или 110 или меньше,

Предпочтительно субъект характеризуется (ii) и/или (iii), (ii) и HScore 169 или меньше, или (iii) и возрастом от 18 до 65 лет.

HScore генерирует вероятность присутствия вторичного гематофагоцитарного лимфоцитарного гистиоцитоза (sHLH), гипервоспалительного синдрома с профилем

цитокинового шторма, сходным с возникающим при коронавирусном заболеванием (Pehta et al., The Lancet Vol 395 March 28, 2020). HScore выше 169 соответствует 93% чувствительности и 86% специфичности для sHLH. HScore рассчитывают с использованием следующих критериев: температура ($<38,4^{\circ}\text{C}$: 0 баллов, $38,4-39,4^{\circ}\text{C}$: 33 балла, $>39,4^{\circ}\text{C}$: 49 баллов), органомегалия (нет: 0 баллов, гепатомегалия или спленомегалия: 23 балла, гепатомегалия и спленомегалия: 38 баллов), количество цитопений* (одна линия: 0 баллов, две линии: 24 балла, три линии: 34 балла), триглицериды ($<1,5$ ммоль/л: 0 баллов, $1,5-4,0$ ммоль/л: 44 балла, $>4,0$ ммоль/л: 64 балла), фибриноген ($>2,5$ г/л: 0 баллов, $\leq 2,5$ г/л: 30 баллов), ферритин (<2000 нг/мл: 0 баллов, $2000-60000$ нг/мл: 35 баллов, >60000 нг/мл: 50 баллов), аспартатаминотрансфераза в сыворотке (<30 МЕд/л: 0 баллов, ≥ 30 МЕд/л: 19 баллов), гемофагоцитоз в аспирате костного мозга (нет: 0 баллов, да: 35 баллов) и известная иммуносупрессия† (нет: 0 баллов, да: 18 баллов). *Определяется как концентрация гемоглобина $9,2$ г/дл или менее ($\leq 5,71$ ммоль/л), количество лейкоцитов 5000 лейкоцитов на мм^3 или менее, или количество тромбоцитов 110000 тромбоцитов на мм^3 или менее, или все эти критерии в совокупности. †ВИЧ-положительные или получающие длительную иммуносупрессивную терапию (например, один или несколько глюкокортикоидов, циклоспорин и/или азатиоприн).

В другом варианте осуществления субъекта, подлежащего лечению, выбирают способом согласно соответствующему дополнительному аспекту изобретения, описанному ниже.

Другое медицинское применение

В еще одном аспекте медицинского применения изобретение относится к парапоксвирусному агенту для применения в качестве лекарственного средства, стимулирующего противовирусное (предпочтительно антикоронавирусное) состояние клеток у субъекта (i), имеющего коронавирусную инфекцию, или (ii) характеризующегося одним или более факторами риска заражения коронавирусной инфекцией и/или одним или более факторами риска тяжелого течения коронавирусного заболевания.

В одном варианте осуществления один или более факторов риска заражения коронавирусной инфекцией выбраны из факторов (i) и (ii), определенных выше.

В другом варианте осуществления один или более факторов риска тяжелого течения коронавирусного заболевания включают по меньшей мере (ii) и (iii), или (ii) и (iv), как определено выше, или включают по меньшей мере сопутствующую патологию, выбранную из респираторных заболеваний (в частности, хронических) и заболеваний легких. Кроме того, возраст субъекта предпочтительно составляет не менее 60, не менее 70 или более предпочтительно не менее 80 лет.

Фраза “стимулирование противовирусного состояния клетки” относится к стимулированию транскрипции клеточных противовирусных генов, кодирующих защитные белки хозяина, например, как стимулируется посредством IFN- α и/или β . Предпочтительно это игибирует (т.е. предотвращает или по меньшей мере уменьшает)

репликацию вируса в клетке и/или индуцирует апоптоз (для предотвращения дальнейшей репликации вируса в клетке), а более предпочтительно уменьшает количество инфекционных вирионов, высвобождаемых инфицированными клетками, по сравнению с клеткой, в которой противовирусное состояние клетки не было стимулировано лекарственным средством. Таким образом, это останавливает или, по меньшей мере, замедляет распространение вируса. “Стимулирование” включает индукцию (например, для клеток, еще не находящихся в противовирусном состоянии) и усиление (т.е. потенцирование) (например, для клеток, уже находящихся в противовирусном состоянии). Хотя и не ограничиваясь этим, первое предпочтительно для субъекта, у которого нет (еще) коронавирусной инфекции, например, характеризующегося одним или более факторами риска, как указано выше, а последнее является предпочтительным для субъекта, имеющего коронавирусную инфекцию.

Способы лечения

Изобретение далее относится к следующим способам

Способ введения парапоксвирусного агента субъекту, (i) имеющему коронавирусную инфекцию или (ii) характеризующемуся одним или более факторами риска заражения коронавирусной инфекцией и/или одним или более факторами риска тяжелого течения парапоксвирусного заболевания.

Способ стимулирования противовирусного (предпочтительно антикоронавирусного) состояния клеток у субъекта, (i) имеющего коронавирусную инфекцию или (ii) характеризующемуся одним или более факторами риска заражения коронавирусной инфекцией и/или одним или более факторами риска тяжелого течения парапоксвирусного заболевания, при этом способ включает введение субъекту парапоксвирусного агента.

Способ (i) подготовки субъекта к коронавирусной инфекции или (ii) лечения коронавирусной инфекции у субъекта, при этом способ включает введение субъекту парапоксвирусного агента.

Способ лечения парапоксвирусного заболевания у субъекта, при этом способ включает введение субъекту парапоксвирусного агента.

Определения и варианты осуществления, описанные ниже, в частности, под заголовком 'Определения и дополнительные варианты осуществления изобретения' относятся к первому аспекту изобретения.

Во втором аспекте изобретение относится к композиции или набору, включающему парапоксвирусный агент и коронавирусный агент.

В предпочтительном варианте осуществления композиция или набор дополнительно включает один или несколько фармацевтически приемлемых разбавителей, носителей и/или консервантов; и/или это представляет собой фармацевтическую композицию или набор. Фармацевтически приемлемые разбавители, носители и/или консерванты описаны ниже и могут дополнительно включать среду (например, водную), подходящую для структурного поддержания парапоксвируса, в

частности инактивированного парапоксвируса, или лиофилизат этой среды. В частности, композиция или набор могут быть предназначены для любого из описанных в настоящей заявке медицинских применений изобретения.

Композицию можно сформулировать для любого способа введения, как определено выше. Кроме того, ее можно сформулировать для одновременного или раздельного введения или для одновременного или раздельного высвобождения парапоксвирусного агента и коронавирусного агента.

В предпочтительном варианте осуществления набор включает композицию в соответствии со вторым аспектом.

В другом варианте осуществления набор включает информационный листок с инструкциями по применению парапоксвирусного агента и коронавирусного агента или композиции по второму аспекту, предпочтительно в соответствии с медицинским применением, описанным в настоящей заявке.

Данные определения и варианты осуществления, описанные в отношении первого аспекта, применяются также ко второму аспекту в той части, в которой они являются применимыми. Кроме того, определения и варианты осуществления, описанные ниже, в частности, под заголовком 'Определения и дополнительные варианты осуществления изобретения' применимы к композиции или набору в соответствии со вторым аспектом.

В третьем аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции или набору для любых из медицинских применений изобретения, описанных в настоящей заявке, где фармацевтическая композиция или набор включает парапоксвирусный агент и предпочтительно дополнительное лекарственное средство. Фармацевтическая композиция обычно включает один или несколько фармацевтически приемлемых разбавителей, носителей и/или консервантов.

В предпочтительном варианте осуществления набор включает композиция в соответствии с третьим аспектом.

В другом варианте осуществления набор включает информационный листок с инструкциями по применению парапоксвирусного агента и дополнительного лекарственного средства или композиции по третьему аспекту, предпочтительно в соответствии с медицинским применением, описанным в настоящей заявке.

Данные определения и варианты осуществления, описанные в отношении первого и второго аспекта (например, композиции), применяются также к третьему аспекту в той части, в которой они являются применимыми. Кроме того, определения и варианты осуществления, описанные ниже, в частности, под заголовком 'Определения и дополнительные варианты осуществления изобретения' применимы к композиции или набору в соответствии с третьим аспектом.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу выбора субъекта для любых медицинских применений изобретения, описанных в настоящей заявке, где способ включает стадии (i) определения присутствия или отсутствия цитокинового шторма у субъекта и (ii) выбора субъекта, если цитокиновый шторм отсутствует.

В одном варианте осуществления стадия (i) включает определение оценки субъекта по шкале Hscore, а стадия (ii) включает выбор субъекта, если HScore составляет 169 или меньше.

В другом варианте осуществления стадия (i) включает обнаружение в биологическом образце субъекта одного или более признаков гипервоспаления, а стадия (ii) включает выбор субъекта, если признаки гипервоспаления не обнаружены. Гипервоспаление при этом представляет собой повышенный уровень, т.е. чрезмерный и/или неконтролируемый (по сравнению с инфицированным, но бессимптомным субъектом, предпочтительно после инкубационного периода, или со средним значением для множества таких субъектов) одного или более из IL-2, IL-7, TNF-альфа, MIP-1альфа, MCP-1, G-CSF и/или CXCL10; или одного или более из IL-6, ферритина, количества тромбоцитов и/или скорости оседания эритроцитов (СОЭ). Биологический образец предпочтительно выбирают из группы, состоящей из крови или образца, полученного из крови (например, плазмы или сыворотки), мокроты, слюны и образца, полученного из легкого (например, при помощи бронхоскопии, включая бронхиальный лаваж, бронхиально-альвеолярный лаваж, щеточную биопсию бронхов и бронхиальный смыв).

Способ четвертого аспекта предпочтительно представляет собой способ ex vivo.

Данные определения и варианты осуществления, описанные в отношении первого, второго и третьего аспектов, применяют также к четвертому аспекту в той части, в которой они являются применимыми. Кроме того, определения и варианты осуществления, описанные ниже, в частности, под заголовком 'Определения и дополнительные варианты осуществления изобретения' применимы к способу в соответствии с четвертым аспектом.

Оговорки об ограничении

В выбранном варианте осуществления к изобретению применяется одна или несколько из следующих оговорок об ограничении:

- парапоксвирус не является вирусом собачьей чумы (CDV),
- коронавирус не является вирусом эпидемической диареи свиней (PEDV), и/или
- субъект не включает свиней (в том числе свиноматок и поросят).

Определения и дополнительные варианты осуществления изобретения

В описании используются различные термины и фразы, которые имеют конкретные значения, определенные ниже. Предпочтительные значения следует толковать как предпочтительные варианты осуществления описанных в настоящей заявке аспектов изобретения. Таким образом, они, а также дополнительные варианты осуществления, описанные ниже, могут быть объединены с любым вариантом осуществления аспектов изобретения и, в частности, с любым предпочтительным вариантом осуществления аспектов изобретения, описанных выше.

Термин "идентичность" или "идентичный" в контексте полинуклеотидных последовательностей относится к количеству остатков в двух последовательностях, которые являются идентичными при выравнивании для максимального соответствия. В

частности, процентная идентичность двух последовательностей представляет собой количество точных совпадений между двумя выровненными последовательностями, деленное на длину более короткой последовательности и умноженное на 100. Средства выравнивания, которые можно использовать для выравнивания двух последовательностей, хорошо известны специалистам в данной области техники и могут быть получены, например, во всемирной интернет сети, например, Needle (EMBOSS) (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/), MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), MAFFT (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>) или WATER (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/). Выравнивание между двумя последовательностями можно осуществить с использованием настроек параметров по умолчанию, например, для Needle предпочтительно MATRIX: BLOSUM62, открытие гэпа: 10,0, продление гэпа: 0,5, для MAFFT предпочтительно: Matrix: Blosum62, открытие гэпа 1,53, продление гэпа 0,123, для полинуклеотидов WATER предпочтительно: MATRIX: DNAFULL, открытие гэпа: 10,0, продление гэпа 0,5, и для полипептидов WATER предпочтительно MATRIX: BLOSUM62, открытие гэпа: 10,0, продление гэпа: 0,5. Специалистам в данной области техники известно, что может быть необходимо вводить гэпы в любую последовательность для получения удовлетворительного выравнивания. "Наилучшее выравнивание последовательностей" определяется как выравнивание, которое дает наибольшее количество выровненных идентичных остатков при минимальном количестве гэпов. Предпочтительно оно представляет собой глобальное выравнивание, которое включает каждый остаток в каждой последовательности при выравнивании.

Термин “вариант” обычно относится к модифицированной версии полинуклеотида, например мутации, когда один или несколько нуклеотидов полинуклеотида могут быть мутированы. Как правило, вариант является функциональным, что означает, например в отношении вируса, что вирус способен инфицировать клетку-хозяина. Функциональность, как правило, такая же, как описана для полинуклеотида, из которого получен вариант. “Мутация” может представлять собой нуклеотидную замену, делецию и/или вставку (“и” может применяться, если имеется более одной мутации). Предпочтительно она представляет собой замену.

Термин “антиген” относится к любому веществу, например, белку или пептиду, способному связываться с антителом, В-клеточным рецептором и/или Т-клеточным рецептором. Антиген включает по меньшей мере один эпитоп, предпочтительно включающий по меньшей мере 8 аминокислот, и более предпочтительно включающий от 8 до 17 аминокислот. Эпитоп может представлять собой Т-клеточный и/или В-клеточный эпитоп. Т-клеточный эпитоп представляет собой эпитоп, который может быть представлен на поверхности антигенпрезентирующей клетки, где он связан с молекулой МНС. У человека профессиональные антигенпрезентирующие клетки специализируются на представлении пептидов МНС класса II, тогда как большинство ядерных соматических клеток представляют собой пептиды МНС класса I. Т-клеточные эпитопы,

представленные молекулами МНС класса I, обычно представляют собой пептиды длиной от 8 до 11 аминокислот, тогда как молекулы МНС класса II представляют собой более длинные пептиды, например, 13-17 аминокислот в длину. В-клеточный эпитоп представляет собой эпитоп, который распознается В-клетками как трехмерные структуры на поверхности нативных антигенов. Эпитопы можно предсказать с использованием инструментов *in silico*, т.е. онлайн инструменты прогнозирования эпитопов В- или Т-клеток из IEDB Analysis Resource.

Термин “иммуноген” относится к антигену, который способен индуцировать иммунный ответ.

“Паттерн-распознающий рецептор” или “PRR” в контексте настоящей заявки относится к кодируемому зародышевой линией сенсору хозяина, который обнаруживает патоген-ассоциированный молекулярный паттерн (PAMP), который специфичен для патогена, и/или молекулярный паттерн, связанный с повреждением (DAMP), который специфичен для компонентов клетки-хозяина, высвобождаемых при повреждении или гибели клетки. PRR может быть мембраносвязанным PRR (PRR клеточной поверхности) или цитозольным PRR.

“Адьювант” представляет собой вещество, которое ускоряет, продлевает и/или усиливает качество и/или силу иммунного ответа на антиген/иммуноген по сравнению с введением только антигена, тем самым уменьшая количество необходимого антигена/иммуногена и/или частоту инъекций, необходимых для того, чтобы вызвать адекватный иммунный ответ на представляющий интерес антиген/иммуноген. Примерами адьювантов, которые можно использовать в контексте композиции по настоящему изобретению, являются гелеобразные осадки гидроксида алюминия (квасцы); AlPO_4 ; алгидрогель; бактериальные продукты из наружной мембраны грамотрицательных бактерий, в частности монофосфорил-липид А (MPLA), липополисахариды (LPS), мурамилдипептиды и их производные; неполный адьювант Фрейнда; липосомы, в частности нейтральные липосомы, липосомы, содержащие композицию и необязательно цитокины; неионогенные блок-сополимеры; адьювант ISCOMATRIX (Drane et al., 2007); неметилованная ДНК, включающая CpG динуклеотиды (мотив CpG), в частности CpG ODN с фосфоротриацетатным (PTO) остовом (CpG PTO ODN) или фосфодиэфирным (PO) остовом (CpG PO ODN); синтетические производные липопептидов, в частности Pam_3Cys ; липоарабиноманнан; пептидогликан; зимозан; белки теплового шока (HSP), в частности HSP 70; дцРНК и ее синтетические производные, в частности Poly I:C; поликатионные пептиды, в частности поли-L-аргинин; таксол; фибронектин; флагеллин; имидазохинолин; цитокины с адьювантной активностью, в частности GM-CSF, интерлейкин-(IL-)-2, IL-6, IL-7, IL-18, интерфероны типа I и II, в частности IFN- γ , TNF- α ; 25-25-дигидроксивитамин D3 (кальцитриол); и синтетические олигопептиды, в частности МНС-II-презентируемые пептиды. В качестве адьюванта можно использовать неионогенные блок-полимеры, содержащие полиоксиэтилен (POE) и полиоксипропилен (POP), такие как блок-сополимеры POE-POP-POE (Newman et al., 1998). Этот тип адьюванта особенно полезен

для композиций, включающих нуклеиновые кислоты в качестве активного ингредиента.

Термин “рекомбинантный” относится, в частности, к вирусу, который модифицирован для включения гетерологичной полинуклеотидной последовательности в его геном.

Термин “иммуномодулятор” относится к лекарственному средству, используемому для регуляции или нормализации иммунной системы путем индукции, усиления, подавления и/или ослабления иммунного ответа у субъекта (“и” означает, что некоторые части иммунной системы селективно индуцируются или усиливаются, а другие селективно подавляются или ослабляются). Примерами являются цитокины, нецитокиновые агонисты или антагонисты цитокиновых рецепторов (например, антитела или малые соединения), антитела или малые соединения, связывающие (предпочтительно нейтрализующие) цитокины, и растворимые цитокиновые рецепторы (например, для захвата цитокинов). Он не включает антиген.

Термин “вектор” в контексте настоящей заявки включает любые векторы, известные специалистам в данной области техники, включая плазмидные векторы, космидные векторы, фаговые векторы, такие как фаг лямбда, вирусные векторы, такие как аденовирусные (Ad) векторы, аденоассоциированные вирусные (AAV) векторы, альфавирусные векторы (например вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEE), вирус Синдбис (SIN), вирус леса Семлики (SFV) и химеры VEE-SIN), векторы на основе вируса герпеса, векторы на основе вируса кори, поксвирусные векторы (например, вирус осповакцины, модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), NYVAC (полученный из вируса осповакцины штамма Копенгаген) и авипокс-векторы: векторы на основе вируса оспы канареек (ALVAC) и вируса оспы кур (FPV)), и векторы на основе вируса везикулярного стоматита, или вирусоподобные частицы. В контексте настоящей заявки термин “вирусоподобная частица”, или “VLP”, относится к нереплицирующейся пустой вирусной оболочке. VLP обычно состоят из одного или более вирусных белков, таких как, но не ограничиваясь этим, те белки, которые называются капсидными белками, белками оболочки (coat proteins, shell proteins), поверхностными и/или оболочечными (envelope proteins) белками. Они содержат функциональные вирусные белки, ответственные за проникновение вируса в клетку, что обеспечивает эффективное проникновение в клетку. Способы получения конкретных VLP известны в данной области.

Термин “митоген” относится к агенту, например пептиду или белку, который побуждает клетку начать клеточное деление. Термин “клеточный активатор” относится к агенту, например, пептиду или белку, который связывает и перекрестно сшивает клеточные рецепторы, например Т-клеточные или В-клеточные рецепторы.

Термин “нуклеозидный аналог” относится к нуклеозиду, содержащему аналог нуклеиновой кислоты и сахар. Термин “нуклеотидный аналог” относится к нуклеотиду, содержащему аналог нуклеиновой кислоты, сахар и фосфатную группу с 1-3 фосфатами. Термин “аналог нуклеиновой кислоты” относится к соединению, которое структурно

сходно с РНК и ДНК в том, что оно имеет одно или более из фосфатного остова, пентозного сахара и/или нуклеинового основания, измененного таким образом, что оно обладает другими свойствами спаривания оснований и/или стэкинга оснований. Примеры включают пептид-нуклеиновую кислоту (PNA), морфолино- и закрытую нуклеиновую кислоту (LNA), а также гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA) и треозо-нуклеиновую кислоту (TNA).

Термин “молекула РНКи” относится к молекуле, способной нейтрализовать молекулы мРНК специфическим в отношении последовательности-мишени образом. Примеры включают дцРНК, микроРНК и миРНК.

Особенно предпочтительными фармацевтическими формами для введения агентов по изобретению являются формы, подходящие для инъекций, и они включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Как правило, такой раствор или дисперсия будет включать растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, водные буферные растворы, т.е. биосовместимые буферы, этанол, полиол, такой как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, их подходящие смеси, поверхностно-активные вещества или растительные масла. Растворы для инфузий или инъекций можно получить при помощи любого количества известных в данной области методов, включая, но не ограничиваясь этим, добавление консервантов, таких как антибактериальные или противогрибковые агенты, например, парабен, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота или тиомерсал. Кроме того, изотонические агенты, такие как сахара или соли, в частности хлорид натрия, могут быть включены в растворы для инфузий или инъекций.

Предпочтительными разбавителями в соответствии с настоящим изобретением являются вода, физиологически приемлемые буферы, физиологически приемлемые буферные солевые растворы или растворы солей. Эксципиенты, которые можно использовать с различными фармацевтическими формами лекарственного средства по изобретению, можно выбрать из следующего неограничивающего перечня:

а) связующие вещества, такие как лактоза, маннит, кристаллический сорбит, двухосновные фосфаты, фосфаты кальция, сахара, микрокристаллическая целлюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, гидроксиэтилцеллюлоза, поливинилпирролидон и т.п.,

б) смазывающие вещества, такие как стеарат магния, тальк, стеарат кальция, стеарат цинка, стеариновая кислота, гидрогенизированное растительное масло, лейцин, глицериды и натрий стеарилфумараты,

с) разрыхлители, такие как крахмалы, кроскарамеллоза, натрий метилцеллюлоза, агар, бентонит, альгиновая кислота, карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон и т.п.

Термин “фармацевтически приемлемый носитель” относится к любому субстрату, который служит для улучшения селективности, эффективности и/или безопасности введения лекарственного средства. Такие носители можно использовать для контроля

высвобождения лекарственного средства в системный кровоток. Это может быть достигнуто либо медленным высвобождением лекарственного средства в течение длительного периода времени (обычно диффузией), либо высвобождением лекарственного средства на целевом участке, индуцированным некоторыми стимулами, такими как изменение pH, применение тепла и активация светом. Носители также можно использовать для улучшения фармакокинетических свойств, особенно биодоступности, многих лекарственных средств с плохой растворимостью в воде и/или способностью проникать через мембрану. Разработано и изучено большое разнообразие систем для переноса лекарственных средств. Примеры включают липосомы, полимерные мицеллы, микросферы, наночастицы, нановолокна, конъюгаты белок-лекарственное средство, эритроциты, виросомы и дендримеры. Можно использовать различные способы прикрепления лекарственного средства к носителю, включая адсорбцию, интеграцию в объемную структуру, инкапсуляцию и ковалентное связывание.

Специалистам в данной области техники будут очевидны различные модификации и вариации изобретения, не выходящие за рамки объема изобретения. Хотя изобретение было описано в связи с конкретными предпочтительными вариантами осуществления, следует понимать, что заявленное изобретение не должно чрезмерно ограничиваться такими конкретными вариантами осуществления. Действительно, предполагается, что различные модификации описанных способов осуществления изобретения, очевидные для специалистов в соответствующих областях, охватываются настоящим изобретением.

Изобретение описано посредством следующих примеров, которые следует рассматривать только как иллюстративные, а не ограничивающие объем изобретения.

ПРИМЕР 1

Цель

Испытание противовирусной активности вирионов инактивированного парапоксвируса *orf* (iPPVO) против коронавируса. Вирионы PPVO стимулируют как врожденную, так и адаптивную иммунную систему.

Подход

В цельной крови APC (антигенпрезентирующие клетки) поглощают вирион iPPVO, что приводит к их активации и высвобождению цитокинов. Это, в свою очередь, активирует Т-клетки, а также НК-клетки, которые также начинают пролиферировать и высвобождать цитокины. После 3 дней инкубации клетки центрифугируют и собирают супернатант, содержащий растворимые факторы, такие как цитокины. Эти супернатанты анализируют на их активность в отношении коронавируса.

Исследуемые вещества

- iPPVO штамма D1701 (доступен от Pfizer); 230 IFN единиц, разведенных в 2 мл воды

- носитель iPPVO (только буфер PPVO, т.е. без вируса), отрицательный контроль

- PBS, отрицательный контроль

- Конкавалин (Con) А, костимул, исходный раствор 1 мг/мл PBS=10X

(использовали в лунке при 5 мкг/мл)

Другие вещества

- Цельная кровь здорового донора: 9 мл цельной крови, свежесобранной в Sarstedt Monovette, Li-Гепарин

- Среда для инкубации цельной крови: RPMI (500 мл) с добавлением 1% GlutaMAXTM и 0,25 мл гепарина-натрия (5000 ед.)

- Анализ клеток на коронавирус: VeroE6-EGFP размножали в питательной среде, приготовленной путем добавления к DMEM 10% об./об. термоинактивированной FCS и 5 мл бикарбоната натрия 7,5%, и культивировали во флаконе T150 и расщепляли 1/4 два раза в неделю. Пенициллин-стрептомицин добавляли непосредственно во флакон T150 при разведении 1/100.

- Среда для анализа на коронавирус: получена путем добавления в DMEM 2% об./об. термоинактивированной FCS и 5 мл бикарбоната натрия 7,5%.

Подготовка образцов

На лунку в 96-луночном круглодонном планшете: 120 мкл клеточной среды для инкубации цельной крови+20 мкл ConA или PBS+20 мкл iPPVO, носитель iPPVO или PBS+40 мкл цельной крови.

Планшет инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 72 часов, а затем центрифугировали в течение 5 минут при 230 g. Разделенный на аликвоты супернатант добавляли в новые 96-луночные планшеты (схема планшета сохранялась). Планшеты с образцами замораживали при -80°C до дальнейшего использования.

Анализ на коронавирус

Разбавление образцов (исследуемое вещество, полученное выше): 100 мкл среды для анализа добавляли в лунки планшета Greiner Bio One 655090 и 15 мкл снова удаляли из лунок (за исключением лунок для контролей в этом анализе: вирусный контроль (VC), для контроля репликации вируса и эффекта на клетки, а также клеточный контроль (КК) для контроля жизнеспособности клеток без вируса). 15 мкл из лунок планшета для образцов добавляли в лунки, из которых было удалено 15 мкл среды.

Приготовление клеточной суспензии. Конфлюэнтную культуру (монослой) VeroE6-EGFP во флаконе T150 промывали DPBS и добавляли 10 мл трипсина, 0,25% трипсин/EDTA. Флакон инкубировали в течение 1 минуты при комнатной температуре и удаляли трипсин/EDTA, за исключением 2 мл. Затем флакон инкубировали в течение 15 минут при 37°C. После инкубации клетки ресуспендировали в 10 мл среды для анализа, пропускали через клеточное сито (FALCON № по кат. 352350) и подсчитывали с использованием счетчика Коултера (были подсчитаны 3 образца по 10 мкл в 10 мл). Затем 3000 клеток ресуспендировали в 50 мкл среды для анализа и по 50 мкл клеточной суспензии высевали в каждую лунку планшета Greiner.

Анализ: планшеты с клеточной суспензией, приготовленной выше, инкубировали в течение ночи (37°C/5% CO₂), после чего SARS-CoV-2 (штамм БетаCoV/Бельгийский/GHB-03021/2020, исходный титр $4,8 \times 10^7$ TCID₅₀/мл) добавляли во

все лунки (кроме лунок с контрольными клетками) в конечном разведении 1/2000000 в 200 мкл/лунка (3000 клеток/лунка, приводя к MOI 0,016 TCID₅₀/клетка). Планшеты инкубировали при 37°C/5% CO₂ в течение 5 дней, после чего измеряли сигнал GFP с использованием флуоресценции во всех лунках, HCI (High Content Imaging) и программного обеспечения ImageJ. Снижение экспрессии EGFP являлось маркером вирус-индуцированной цитопатической активности. См. также Ivens et al. (Journal of Virological Methods 129, 2005, 56-63).

Результаты

Результаты показаны на Фиг. 1. Клетки, не инфицированные коронавирусом (среднее значение CC), были жизнеспособны и экспрессировали eGFP. Клетки, инфицированные коронавирусом (среднее значение VC), погибли, и экспрессия eGFP не была обнаружена. Результаты для PBS и носителя iPPVO в отдельности были аналогичны среднему значению VC, т.е. PBS и носитель iPPVO в отдельности не имели никакого эффекта на жизнеспособность клеток, т.е. против коронавируса, как ожидалось. Также 5 мкг/мл ConA в отдельности (в PBS) не сохраняли экспрессию eGFP, а также не влияли на экспрессию eGFP при введении вместе с носителем iPPVO, как показано в сравнении с только ConA в PBS. iPPVO D1701 в отдельности (в PBS) также имел явный положительный эффект на жизнеспособность клеток, а экспрессия eGFP еще больше увеличилась, когда iPPVO D1701 использовали вместе с 5 мкг/мл ConA (который сам по себе не показал никакого эффекта на экспрессию eGFP в этой концентрации). Соответственно, iPPVO и ConA действуют синергетически.

Эти результаты показывают эффективность парапоксвируса в стимулировании противовирусного состояния клетки, которое является защитным и ингибирует репликацию и размножение коронавируса и, таким образом, заражение других клеток. Этот эффект можно улучшить, добавив иммуностимулирующий агент, такой как ConA, который действует синергетически, т.е. эффективность iPPVO повышается при комбинаторном подходе.

ПРИМЕР 2

Цель

Определение того, применимо ли доказательство принципа, показанное в Примере 1, к парапоксвирусу в целом, путем испытания на противовирусную активность другого штамма парапоксвируса против коронавируса.

Подход

См. Пример 1.

Исследуемые вещества

- iPPVO штамма NZ2 (химически инактивированный бинарным этиленимином, BEI), внутреннее обозначение AIC649, 1×10^9 лиофилизированных вирионов, разведенных в 1 мл воды

- iPPVO штамма D1701, см. Пример 1

- носитель iPPVO, отрицательный контроль, см. Пример 1

Другие вещества, подготовка образцов, анализ на коронавирус

См. Пример 1. iPPVO и носитель iPPVO использовали по отдельности. iPPVO D1701, повышающий жизнеспособность клеток, как показано в Примере 1, использовали в качестве положительного контроля в Примере 2.

Результаты

Результаты показаны на Фиг. 2. iPPVO D1701, эффективность которого была показана в Примере 1, использовали в качестве положительного контроля и как 100% для сравнительной оценки. Оба PPVO штамма D1701 и NZ2 активны против коронавируса, как показано в сравнении с отрицательным контролем. Соответственно, стимулирование противовирусного состояния клеток, эффективного против коронавируса, является отличительной чертой парапоксвируса в целом, а не только штамма, испытанного в Примере 1.

ПРИМЕР 3

Цель

Исследование времени добавления парапоксвируса, в частности определение того, как противовирусная активность парапоксвируса, показанная в Примерах 1 и 2, модулируется путем добавления супернатантов в разные моменты времени к клеткам для анализа на коронавирус.

Подход

См. Примеры 1 и 2, но с разными моментами времени для добавления супернатантов из планшета для образцов к клеткам для анализа на коронавирус (до или после инфицирования клеток VeroE6-EGFP вирусом SARS-CoV-2).

Исследуемые вещества

- iPPVO штамма NZ2, см. Пример 2
- iPPVO штамма D1701, см. Пример 1
- носитель iPPVO, отрицательный контроль, см. Пример 1
- ConA, см. Пример 1

Другие вещества, подготовка образцов, анализ на коронавирус

См. Примеры 1 и 2. Цельную кровь инкубировали с iPPVO или носителем iPPVO iPPVO (в отдельности или в комбинации с ConA). Супернатанты получали и добавляли в разные моменты времени до или после инфицирования клеток VeroE6-EGFP коронавирусом (SARS-CoV-2).

ПРИМЕР 4

Цель

Испытание дополнительных комбинаторных подходов, в частности подтверждающих, что сила противовирусной активности парапоксвируса, показанная в Примерах 1, 2 и 3, может быть повышена в комбинаторных подходах с использованием дополнительных компонентов комбинации, например, иммуностимулирующего средства или противовирусного средства, как описано в настоящей заявке. Это испытание включает исследование времени добавления парапоксвируса и компонента комбинации

(парапоксвируса к образцам крови, а компонента комбинации к образцу крови или непосредственно к клеткам для анализа на коронавирус), т.е. относительно друг друга, а также времени добавления коронавируса относительно парапоксвируса и компонента комбинации. Оно также включает испытание влияния концентраций парапоксвируса и компонента комбинации.

Подход

См. Примеры 1, 2 и 3, но с разными моментами времени для добавления супернатантов (крови, обработанной парапоксвирусом и/или компонентом комбинации, в одинаковые или разные моменты времени) из планшета для образцов к клеткам для анализа на коронавирус (до или после инфицирования клеток VeroE6-EGFP вирусом SARS-CoV-2), и с разными моментами времени для добавления компонента комбинации (если он еще не добавлен в образец крови) к клеткам для анализа на коронавирус (до или после добавления супернатанта и/или добавления SARS-CoV-2).

Исследуемые вещества

- iPPVO штамма NZ2, см. Пример 2
- iPPVO штамма D1701, см. Пример 1
- носитель iPPVO, отрицательный контроль, см. Пример 1
- ConA, см. Пример 1 (контроль компонента комбинации)
- Талидомид (компонент комбинации)
- Ремдесивир (компонент комбинации)

Другие вещества, подготовка образцов, анализ на коронавирус

См. Примеры 1 и 2. Цельную кровь инкубировали с iPPVO или носителем iPPVO (отдельно или в комбинации с одним или более компонентами комбинации). Супернатанты добавляли в разные моменты времени до или после инфицирования клеток VeroE6-EGFP коронавирусом (SARS-CoV-2). Один или несколько компонентов комбинации, не использовавшихся для инкубации образцов крови, добавляли в разные моменты времени к клеткам VeroE6-EGFP (как перед супернатантом, так и перед коронавирусом, после того и другого или между ними). Использовали различные концентрации компонентов комбинации.

ПРИМЕР 5

Цель

Исследование эффекта парапоксвируса на инфекционную вирусную нагрузку коронавируса в легких на модели хомяка.

Подход

Использовали модель заражения хомяков SARS-CoV-2, описанную Boudewijns et al. (STAT2 signaling as double-edged sword restricting viral dissemination but driving severe pneumonia in SARS-CoV-2 infected hamsters. bioRxiv 2020, 2020.04.23.056838). Шесть хомяков обрабатывают интраперитонеально (и/п) $1,6 \times 10^9$ VP iPPVO за день до инфицирования вирусом SARS-CoV-2. Вторую группу из шести хомяков вместо этого обрабатывали носителем iPPVO (плацебо-контроль). Для инфицирования хомяков

анестезировали кетамин/ксилазином/атропином и интраназально инокулировали SARS-CoV-2 ($1,89 \times 10^6$ TCID₅₀ в 50 мкл). На 4-й день после инфицирования (pi) хомяков подвергали эвтаназии путем и/п инъекции 500 мкл Dolethal (200 мг/мл пентобарбитала натрия, Vétoquinol SA). Легкие собирали и патогенный вирус определяли количественно при помощи конечной точки титрования вируса. Эффективность определяли по вирусной нагрузке в гомогенизированных тканях легких на 4-й день после инфицирования.

Животные

Сирийский золотистый хомяк, самки, возраст 6-10 недель

SARS-Cov-2

Штамм SARS-Cov-2 БетаCov/Бельгийский/GHB-03021/2020 (EPI ISL 109 407976|2020-02-03) был выделен из мазка из носоглотки, взятого у подтвержденного РТ-кПЦР бессимптомного пациента, который вернулся из Уханя, Китай, в начале февраля 2020 г. Тесная связь с прототипом штамма Ухань-Ху-1 2019-nCoV (GenBank номер доступа 112 MN908947.3) была подтверждена филогенетическим анализом. Патогенный вирус выделяли серийным пассированием клеток HuH7 и Vero E6 (Boudewijns et al., см. выше); вирус пассажа 6 использовали для исследования, описанного в данной заявке. Титр вируса в вирусодержащем материале определяли разведением до конечной точки на клетках Vero E6 по методу Рида и Менча (см. выше).

Исследуемые вещества

- iPPVO штамма NZ2, см. Пример 2
- носитель iPPVO (только буфер PPVO, т.е. без вируса)

Конечная точка титрования вируса

Ткани легких гомогенизировали с использованием разрушения шариками (Precellys) в 350 мкл минимально необходимой среды и центрифугировали (10000 об/мин, 5 мин, 4°C) для осаждения клеточного дебриса. Для количественного определения инфекционных частиц SARS-CoV-2 осуществляли титрование до конечных точек на конфлюэнтных клетках Vero E6 в 96-луночных планшетах. Вирусные титры рассчитывали с использованием метода Рида и Менча (Reed and Muench, The American Journal of Hygiene, 1938. 27(3): p. 493-497) и калькулятора Линденбаха и выражали как дозу, инфицирующую 50% клеток культуры ткани (TCID₅₀), на мг ткани.

Результаты

Профилактическое лечение при помощи iPPVO уменьшало количество инфекционных частиц SARS-CoV-2 в легких: среднее значение TCID₅₀/мг легочной ткани у хомячков, получавших плацебо, составило $6,3 \times 10^5$ по сравнению с хомяками, получавшими iPPVO, у которых значение TCID₅₀/мг легочной ткани было определено как $2,1 \times 10^5$. См. Фиг. 3.

ПРИМЕР 6

Цель

Исследование эффектов парапоксвируса на коронавирусную инфекцию на мышинной модели.

Подход

10 мышей внутривенно инокулировали 100 мкл iPPVO (1 флакон, растворенный в 500 мкл поставляемого буфера, что соответствовало дозе 1×10^9 вирусных частиц (VP)/животное) перед инфицированием коронавирусом. Вторая группа из 10 мышей служила инфицированной контрольной группой (внутривенная инокуляция 100 мкл буфера iPPVO). Через сутки после лечения мышей обеих групп инфицировали интраназально под изофлурановой анестезией (ингаляция 3% изофлюрана) 900 фокусобразующими единицами (FFU) SARS-CoV-2 (немецкий изолят) в общем объеме 50 мкл. Мышей оценивали ежедневно. Эвтаназию осуществляли на 10 день после заражения. Более раннюю эвтаназию осуществляли для мышей, достигающих гуманных конечных точек, определяемых по клинической оценке. Ответ на лечение оценивали путем определения клинической оценки (клинические симптомы инфекции) и потери массы тела. Также определяли нагрузку SARS-CoV-2 в легких и головном мозге.

Животные

Трансгенная мышь K18-hACE2

Исследуемые вещества

- iPPVO штамм D1701, см. Пример 1
- носитель iPPVO (только буфер PPVO, т.е. без вируса)

Определение клинической оценки

Клиническую оценку определяли путем сложения оценок каждого клинического параметра в соответствии с Таблицей 1 ниже. Животных подвергали эвтаназии при достижении клинической оценки >20 или при оценке 20 баллов для одного клинического параметра (гуманные конечные точки).

Таблица 1

Клиническая оценка

Клинический параметр	Критерии оценки	Оценка	Меры по обеспечению благосостояния
Снижение массы тела/состояние тела	До макс. 7% снижения или увеличения/сбалансированное скелетно-мышечное соотношение.	0	
	8-10% снижение/видимые скелетные прикрепления в области позвоночника (запавшие)	5	Предложение смоченного корма
	11-19% снижение/выраженная скелетная структура позвоночника и начало в области таза (истощение)	10	Предложение смоченного корма, показ ветеринару и ведущему экспериментатору, введение метамизола в питьевую воду
	20% снижение/очень выраженная скелетная структура позвоночника и костей таза (истощение)	20	Эвтаназия

Общее состояние (шерсть, глаза, дыхание)	Открытые, ясные глаза; шерсть: гладкая, блестящая и плотно прилегающая; чистые и сухие отверстия; ровное, едва заметное дыхание.	0	
	Шерсть несколько тусклая, частично торчащая (пилоэрекция).	2	
	Шерсть в целом слегка лохматая и возможно торчащая; физиологические отверстия неопрятные; прозрачное отделяемое (вязкая пленка) на одном или обоих глазах.	5	Очистка отверстий тела, глазная мазь
	Очень лохматая/клочковатая шерсть, физиологические отверстия слегка слиплись, глаз (глаза) больше не открывается полностью.	10	Осмотр 2 раза в день, предложение смоченного корма, очистка отверстий тела, глазная мазь, показ ветеринару и ведущему экспериментатору, введение метамизола в питьевую воду
	Шерсть очень взлохмаченная и очень пухлая, с сильно слипшимися, покрасневшими или опухшими глазами или полностью закрытыми глазами, заметно учащенное дыхание с возможно облегчающей позой	20	Эвтаназия
Поведение (спонтанное и спровоцированное)	регулярное потребление пищи/воды, активность и внимательность/любопытность (исследовательское поведение), социальные контакты, инстинкт строительства гнезда, личная гигиена	0	
	Незначительное снижение активности или небольшая гиперкинезия	5	Предложение смоченного корма
	Явно сниженная активность, возможно изоляция от группы с защитой от товарищей по клетке, провоцирующее поведение: Агрессивность при прикосновении/хватании или сниженная реакция на прикосновение.	10	Осмотр 2 раза в день, предложение смоченного корма, очистка отверстий тела, глазная мазь, показ ветеринару и ведущему экспериментатору, введение метамизола в питьевую воду

	Резко сниженная активность, отсутствие исследовательского поведения и/или инстинкта гнездования, резко сниженное социальное поведение вплоть до самоизоляции, апатия; Провоцируемое поведение: звуки боли при хватании и/или отсутствие реакции на прикосновение.	20	Эвтаназия
Поза/двигательная функция (включает редкие неврологические расстройства, характерные для SARS-CoV-2).	Походка нормальная, включая подъем на задние лапы; нормальное разведение задних конечностей при поднятии за хвост	0	
	Нарушения походки с замедленным движением по полу клетки; задние лапы не полностью расставлены при подъеме за хвост	5	Предложение смоченного корма
	Снижение двигательной активности с напряженной походкой, проблемы с координацией; при подъеме за хвост задние лапы не расставлены, и паралич одной конечности	10	Осмотр 2 раза в день, предложение смоченного корма, очистка отверстий тела, глазная мазь, показ ветеринару и ведущему экспериментатору, введение метамизола в питьевую воду
	Искривленная поза (втянутый живот, болезненный горб); постукивающая походка; Тремор/паралич (волочение одной конечности); при поднятии за хвост задние лапы не расставлены, и паралич двух конечностей	20	Эвтаназия

Определение вирусной нагрузки на орган

Органы гомогенизировали в 2 мл PBS. Вирусную РНК выделяли из 140 мкл гомогенатов с использованием мини-набора QIAamp Viral RNA (Qiagen). Реакции ОТ-кПЦР осуществляли с использованием TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher) и 5 мкл выделенной РНК в качестве матрицы. Синтетическую РНК SARS-CoV2 использовали в качестве количественного стандарта для определения числа копий вируса.

Результаты

Выживаемость мышей, получавших iPPVO и мышей, инфицированных SARS-CoV-2, была значительно выше по сравнению с не получавшими лечение мышами через 10 дней: 40% в группе, получавшей iPPVO, по сравнению с 20% в контрольной группе. Кроме того, смертность была отсрочена. См. Фиг. 4.

В соответствии с этим, снижение массы тела и появление клинических

признаков/симптомов были отсрочены в группе лечения iPPVO. В дни с 4 по 6 после инфицирования вирусом SARS-CoV-2 масса тела была выше, а клиническая оценка была ниже у мышей, получавших iPPVO, по сравнению с контрольной группой. На 7-й день это было отменено из-за эвтаназии мышей в контрольной группе, которые достигли гуманных конечных точек, то есть мышей, наиболее пострадавших от инфекции SARS-CoV-2. Эти мыши не были включены в точки сбора данных после эвтаназии, поэтому средние значения контрольной группы включают только самых здоровых мышей, начиная с 7-го дня. На 7-й и 8-й дни мыши из группы лечения iPPVO достигли гуманных конечных точек и должны были быть подвергнуты эвтаназии. Масса тела и клиническая оценка были одинаковыми у выживших мышей как в группе лечения, так и в контрольной группе (день 9 и 10). См. Фиг. 5 и 6.

Вирусная нагрузка SARS-CoV-2 резко снизилась как в легких (16x по сравнению с контрольной группой), так и в головном мозге (664x по сравнению с плацебо) инфицированных мышей. См. Фиг. 7.

В целом, эти данные ясно демонстрируют положительный эффект PPVO лечения на клинические исходы у мышей, инфицированных SARS-CoV-2, что предполагает улучшение клинической ситуации у пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, включая задержку появления симптомов и более легкое течение заболевания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Парапоксвирусный агент для применения в (i) подготовке субъекта к коронавирусной инфекции или (ii) лечении коронавирусной инфекции у субъекта.
2. Парапоксвирусный агент для применения по п.1, где парапоксвирус представляет собой Pararoxvirus ovis (PPVO).
3. Парапоксвирусный агент для применения по п.1 или 2, где парапоксвирусный агент представляет собой:
 - (a) парапоксвирус как таковой или его фрагмент, или
 - (b) агент, который включает генетическую информацию, кодирующую (a), предпочтительно где парапоксвирусный агент представляет собой инактивированный вирион PPVO.
4. Парапоксвирусный агент для применения по любому из пп. 1-3, где коронавирус представляет собой коронавирус SARS.
5. Парапоксвирусный агент для применения по любому из пп. 1-4, где коронавирус представляет собой SARS-CoV-2 или его вариант с идентичностью последовательности по меньшей мере 80% с SEQ ID NO: 1 или 2.
6. Парапоксвирусный агент для применения по любому из пп. 1-5, где субъект, подлежащий подготовительному лечению, характеризуется одним или более факторами риска заражения коронавирусной инфекцией и/или одним или более факторами риска тяжелого течения коронавирусного заболевания.
7. Парапоксвирусный агент для применения по любому из пп. 1-5, где субъект, подлежащий лечению, не имеет симптомов.
8. Парапоксвирусный агент для применения по любому из пп. 1-5, где субъект, подлежащий лечению, имеет коронавирусное заболевание, предпочтительно Covid-19.
9. Парапоксвирусный агент для применения по п.8, где у субъекта либо нет тяжелых симптомов, либо у него имеется тяжелое течение коронавирусного заболевания.
10. Парапоксвирусный агент для применения по любому из пп. 1-9, где применение включает введение дополнительной схемы лечения для (i) или (ii).
11. Парапоксвирусный агент для применения по п.10, где дополнительная схема лечения для (i) включает введение коронавирусного агента и/или иммуностимулирующего средства, и дополнительная схема лечения для (ii) включает введение коронавирусного агента, одного или более дополнительных лекарственных средств и/или одного или более дополнительных немедикаментозных средств лечения.
12. Парапоксвирусный агент для применения по п.11, где
- коронавирусный агент выбран из группы, состоящей из:
 - (a) коронавируса как такового или его фрагмента,
 - (b) агента, который содержит генетическую информацию, кодирующую (a), и
 - (c) агента, который способен при введении его эффективного количества субъекту, инфицированному коронавирусом, препятствовать инфицированию клетки коронавирусом или репликации коронавируса в клетке;

- дополнительное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из иммуностимулирующего средства, противовирусного средства, антибиотика, адъюванта, глюкокортикоида, антигипертензивного лекарственного средства, гипогликемического лекарственного средства, противошокового лекарственного средства и лекарственного средства, подходящего для лечения одного или более симптомов коронавирусного заболевания; и/или

- одну или более дополнительных терапий предпочтительно выбирают из группы, состоящей из оксигенотерапии и экстракорпоральной поддержки органов (ECOS).

13. Парапоксвирусный агент для применения по любому из пп. 1-12, где парапоксвирус способен при введении его эффективного количества субъекту, инфицированному коронавирусом

(i) увеличивать количество одного или более коронавирус-антиген-специфических иммунных факторов,

(ii) ингибировать репликацию коронавируса,

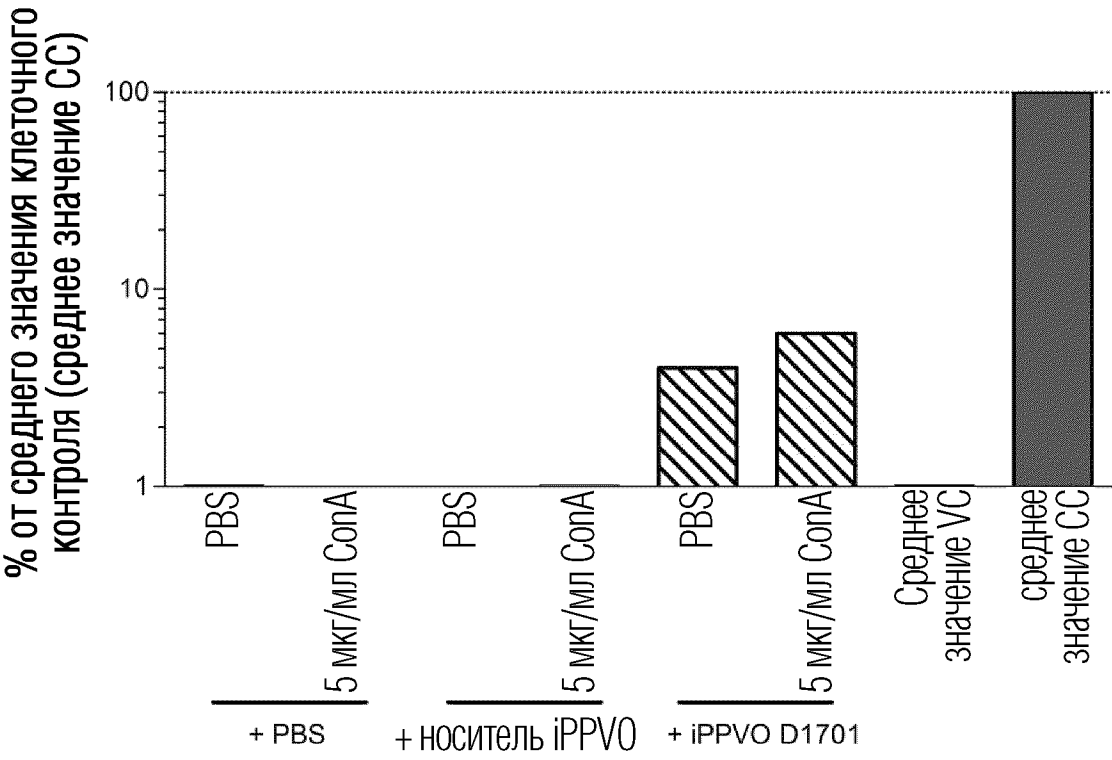
(iii) снижать коронавирусную нагрузку и/или

(iv) предотвращать или улучшать коронавирус-специфический цитокиновый профиль или цитокиновый шторм.

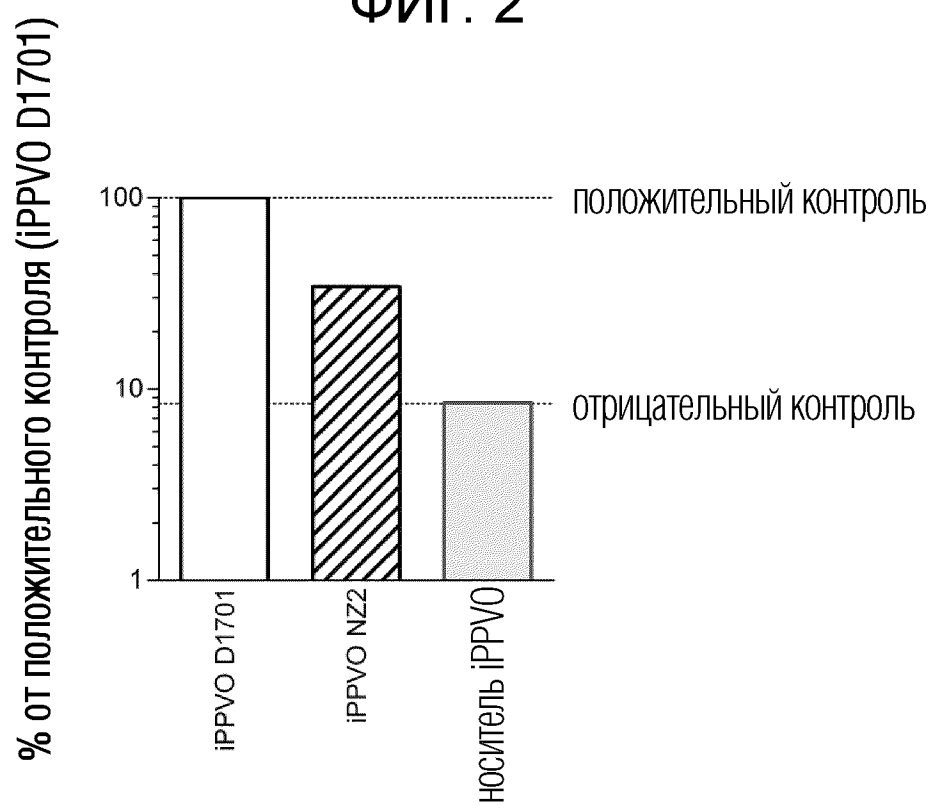
14. Композиция или набор, включающие парапоксвирусный агент, предпочтительно такой, как определен в п.3, и коронавирусный агент, предпочтительно такой, как определен в п.12.

15. Фармацевтическая композиция или набор для применения в (i) подготовке субъекта к коронавирусной инфекции или (ii) лечении коронавирусной инфекции у субъекта, где фармацевтическая композиция или набор включает парапоксвирусный агент, предпочтительно такой, как определен в п.3, и предпочтительно дополнительное лекарственное средство, более предпочтительно такое, как определено в п.12.

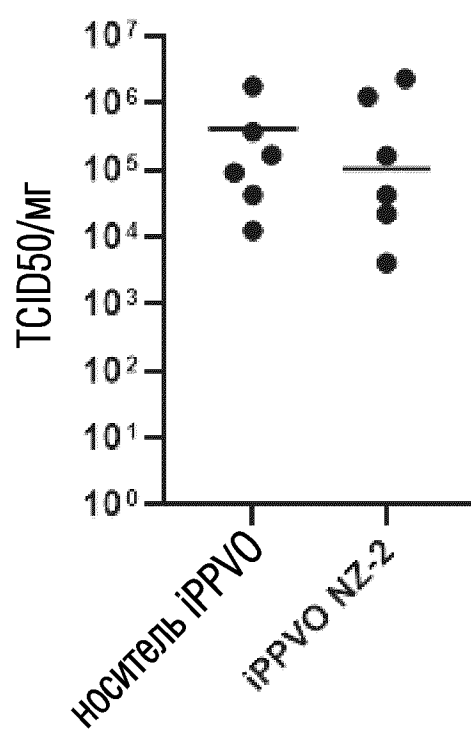
ФИГ. 1



ФИГ. 2

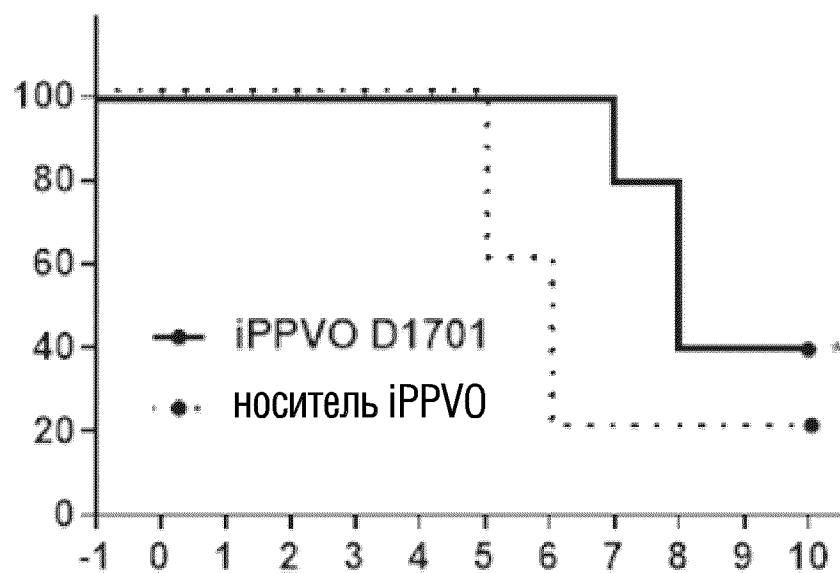


ФИГ. 3



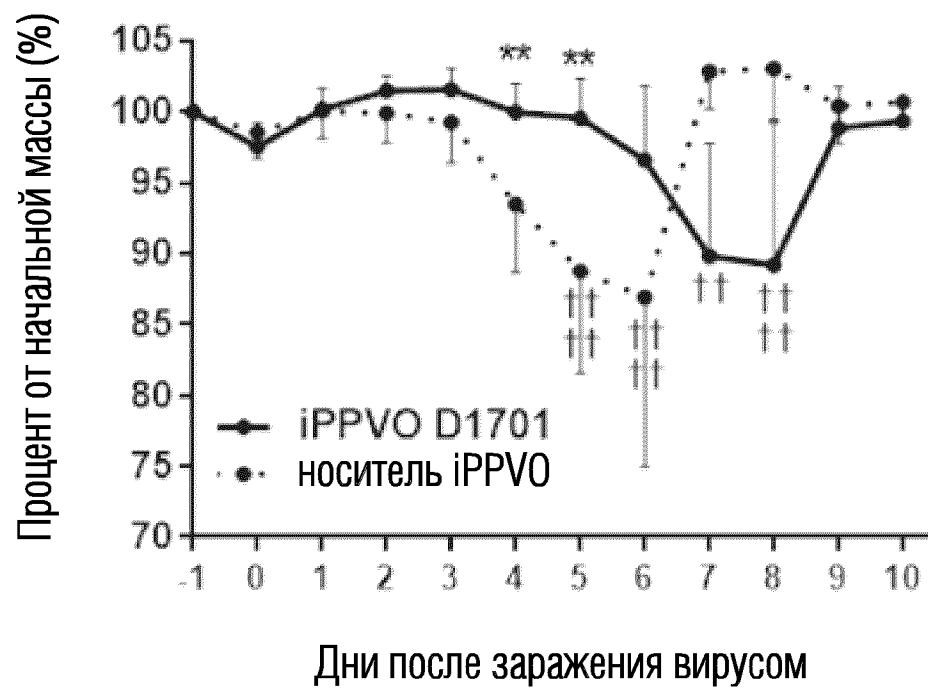
ФИГ. 4

Процент выживаемости в соответствии с
гуманными конечными точками

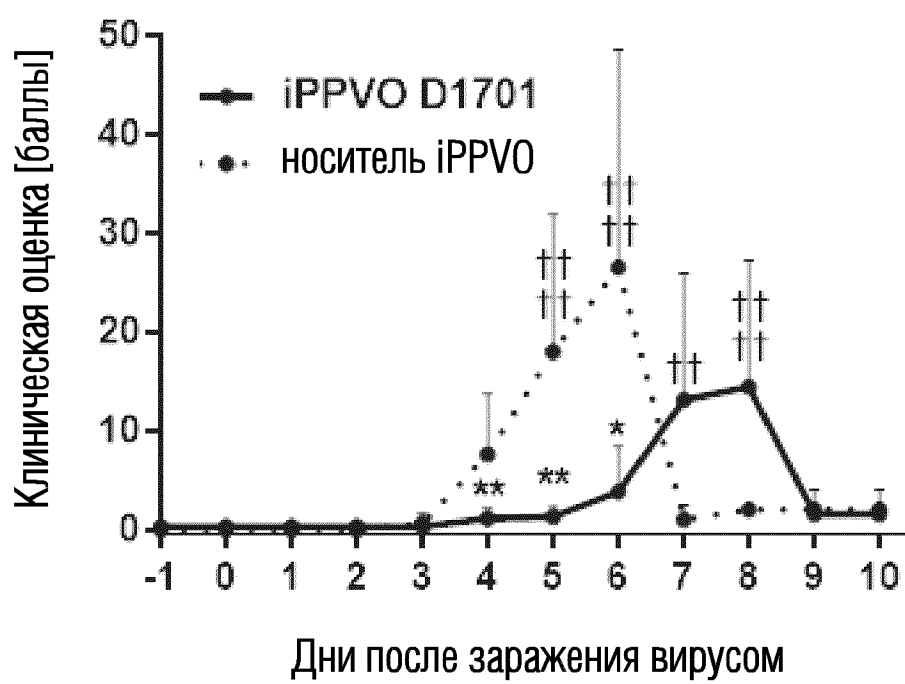


Дни после заражения вирусом

ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7

