

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042253**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.01.27

(21) Номер заявки
202193142

(22) Дата подачи заявки
2021.12.15

(51) Int. Cl. **C12N 9/22 (2006.01)**
A61K 39/215 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(54) **КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, ОБЛАДАЮЩЕЕ ПРОТИВОВИРУСНЫМ ЭФФЕКТОМ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ЗАРАЖЕНИЯ SARS-COV-2**

(31) **2021119487**

(32) **2021.07.02**

(33) **RU**

(43) **2023.01.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МУСАХАНОВА ОЙГУЛЬ
МИРЗАЮСУФОВНА (RU)

(56) **WO-A2-2015148768**

Янпольская Н.Д., Тонгур А.М., Деборин Г.А., Локализация активности РНКазы при включении ее в липосомы, Биохимия, 1983, Т. 48, Вып. 3, с. 428-432, реферат
US-B1-10980756

(72) Изобретатель:

Азимова Шахноз Садыковна, Саатов
Талат Саатович, Зайнутдинов
Баходир Равилович, Аширов Ойбек
Норбой, Сасмаков Собирджан
Анарматович, Лысова Елена, Махнев
Артем Александрович, Умарова
Мукадас Рустамовна, Хамидова
Умида Бахриддин кизи, Пиякина
Галина Александровна, Абдурахманов
Джалолиддин Мирджамилевич,
Хасанов Шухрат Шавкатович,
Эшбоев Фарход Бакир (UZ)

(74) Представитель:

Шерстин А.Ю. (RU)

(57) Изобретение относится к медицине, фармацевтике и биотехнологии. Представлена новая фармацевтическая композиция, обладающая противовирусным эффектом в отношении коронавируса SARS-CoV-2 и родственных вирусов, таких как SARS, MERS и др., геном которых представлен РНК, а вирионы снабжены липидной оболочкой. Комбинированное лекарственное средство для профилактики заражения (лечения) SARS-CoV-2 представляет собой: (i) липосому с эффективным количеством фермента РНКазы или (ii) липосому с эффективным количеством фермента РНКазы и эффективным количеством препарата никлозамида, вспомогательное средство - растворитель, разрешенный к применению в фармацевтике. Изобретение обеспечивает разрушение генетического материала - РНК коронавирусов, что дает возможность профилактики от РНК-содержащих вирусов, в том числе SARS-CoV-2, попадающих в организм человека через верхние дыхательные пути.

B1**042253****042253****B1**

Область техники

Изобретение относится к медицине, фармацевтике и биотехнологии. Представлено новое комбинированное лекарственное средство (фармацевтическая композиция), обладающее противовирусным эффектом в отношении коронавируса SARS-CoV-2 и родственных вирусов, таких как SARS-CoV, MERS и др., геном которых представлен РНК, а вирионы снабжены липидной оболочкой, композиция (i) за счет разрушения генома коронавируса ферментом РНКазой, композиция (ii) за счет разрушения генома коронавируса ферментом РНКазой и препаратом никлозамидом, препятствующим репликации SARS-CoV-2. Предложенные композиции могут применяться амбулаторно для подавления репликации вируса SARS-CoV-2, снижения вирусной нагрузки, снижения риска передачи инфекции воздушно-капельным путем.

Уровень техники

В мире разработан целый ряд профилактических вакцин, а также средств терапии для лечения коронавирусной инфекции. Имеется патент RU 2746362 (заявка 2021106335 от 11.03.2021) - "Комбинированное лекарственное средство, обладающее противовирусным эффектом в отношении нового коронавируса SARS-CoV-2" [1], в котором описано "блокирование передачи инфекции и уменьшение риска развития клинических осложнений" за счет применения малых интерферирующих РНК (ми РНК). Основой вышеуказанного патента является получение комбинированного лекарственного средства с созданными молекулами РНК, способными опосредовать мишень-специфическое подавление репликации вируса SARS-CoV-2.

Однако не предложено препаратов, способных уничтожать коронавирусы путем прямого разрушения их генома - одноцепочечную (+)РНК. Очевидно, что прямое разрушения генома вируса может быть осуществлено путем воздействия фермента рибонуклеазы (РНКазы) [2], способного расщеплять РНК коронавирусов или дополнительно путем подавления репликации коронавирусов под действием никлозамида - лекарственного средства, применяемого для лечения паразитарных инфекций. В настоящее время показано, что никлозамид может ингибировать репликацию вируса SARS-CoV-2 [3-6].

Раскрытие изобретения

Комбинированное лекарственное средство предназначено для ингаляционного или интраназального введения.

Внедрение в практику препаратов на основе РНКаз и никлозамида ограничивается рядом факторов, к которым относятся недостаточная эффективность и безопасность доставки РНКазы и никлозамида в вирусные частица-мишени. Применение липосом [7] для доставки вышеуказанных препаратов (РНКазы и никлозамида) решает эту проблему, так как SARS-CoV-2, а также родственные ему вирусы MERS, SARS-CoV имеют липидную оболочку, позволяющую трансфецировать (проникать) липосомам и внедрять РНКазу и никлозамид непосредственно внутрь вируса.

Таким образом, в настоящее время существует необходимость в разработке нового противовирусного средства, способного разрушать РНК коронавируса.

В состав комбинированных лекарственных средств по настоящему изобретению входит композиция (i) липосомы, осуществляющие доставку эффективного количество РНКазы, и композиция (ii) - липосомы, осуществляющие доставку эффективного количество РНКазы и эффективного количество никлозамида. Эти фармацевтические композиции обеспечивают расщепление РНК SARS-CoV-2.

Комбинированные лекарственные средства можно употреблять в виде назальных капель или спрея, а также в виде ингаляций.

Технический результат заключается в создании эффективного и безопасного противовирусного средства, обеспечивающего разрушения РНК SARS-CoV-2. Указанный технический результат поясняется следующими примерами.

Для достижения вышеуказанного технического результата предложено комбинированное лекарственное средство для профилактики или лечения коронавирусной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, содержащее эффективное количество молекул РНКазы в липосомах.

Также для достижения вышеуказанного технического результата предложено комбинированное лекарственное средство для профилактики или лечения коронавирусной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, содержащее эффективное количество молекул РНКазы и никлозамида в липосомах.

Согласно настоящему изобретению вышеуказанные комбинированные лекарственные средства могут быть предназначены для интраназального или ингаляционного введения.

Также для достижения вышеуказанного технического результата предложен способ профилактики или лечения SARS-CoV-2 инфекции, в котором вышеуказанное(ые) комбинированное(ые) лекарственное(ые) средство(а) вводится одновременно, отдельно или последовательно с другими терапевтическими средствами.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 приведены результаты эксперимента по примеру 4.

На фиг. 2 приведены результаты эксперимента по примеру 5 (метод гель-электрофореза).

Осуществление изобретения

Указанный выше технический результат поясняется следующими примерами.

Пример 1. Получение липосом с РНКазой.

Для получения липосом использовали фосфолипиды как растительного (соевый лецитин), так и животного происхождения (из мозга крупного рогатого скота). В качестве рибонуклеазы использовали коммерческий препарат-фермент РНКазы А с ММ-13.7 кД, рН оптимум - 5,0-6,0; 50 U/мг фирмы Mol BIO MEDIA, полученный из поджелудочной железы крупного рогатого скота, или рибонуклеазу из поджелудочной железы крупного рогатого скота (РНКазы А) фирмы "СамсонМед" (Россия).

В качестве фосфолипидов использовали экстракт из соевого лецитина, применяемого в пищевой промышленности, или фосфолипиды животного происхождения (из мозга крупного рогатого скота).

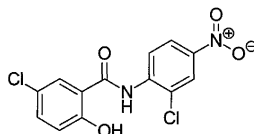
Для получения липосом - 1 г коммерческого (VEROLEC FLS, China) соевого лецитина растворяли в 20 мл хлороформ-метанольной смеси при соотношении 2:1. Смесь выдерживали в течение 10 ч при температуре 2-4°C. Затем смесь центрифугировали при 4500 об/мин в течение 5 мин. Отбирали 1 мл надосадочной жидкости и растворяли в 6 мл хлороформа. Далее растворитель отгоняли в вакууме (4±2 мм рт. ст.) при температуре +40°C. После полного удаления растворителя добавляли 50 мкл Рибонуклеазы А (1U/мкл) и 5 мл физиологического раствора. Полученную смесь замораживали при -20°C в течение 20 мин, затем смесь размораживали при перемешивании при 23°C в течение 30 мин (процесс замораживания и оттаивания повторяли четырежды). Затем полученную смесь обрабатывали ультразвуком при 22 кГц, 30 с в 4 повторах.

Аналогичным образом получали липосомы на основе фосфолипидов из мозга крупного рогатого скота, которые были выделены по методу [8].

Лекарственные формы фармацевтических композиций, приведенных в настоящем документе, могут быть получены любым известным способом и содержать другие вспомогательные вещества, способные увеличивать стабильность композиций (i) и (ii), и трансфекцию РНКазы.

Пример 2. Получение липосом с никлозамидом и РНКазой.

Использовали никлозамид (кристаллическое вещество, температура плавления 227-232°C). ИК-спектр тестируемого образца соответствовал ИК-спектру безводного никлозамида - стандарта, структурная формула никлозамида имеет следующий вид:



Для получения липосом, содержащих РНКазу (композиция i), и липосом, содержащих РНКазу А и никлозамид (композиция ii), 1 мл раствора лецитина (1,075 мМ) смешивали с 6 мл хлороформа. Далее растворитель отгоняли в вакууме (4±2 мм рт. ст.), при температуре +40°C. После удаления хлороформа в колбу добавляли 50 мкл Рибонуклеазы А, 30 мкл раствора никлозамида (10% раствор в ДМСО) и 5 мл физиологического раствора. Полученную смесь замораживали при -20°C в течение 20 мин, затем смесь размораживали при 23°C в течение 30 мин при перемешивании (процесс замораживания и оттаивания повторяли четырежды). Затем полученную смесь обрабатывали ультразвуком при 22 кГц, 30 с. Аналогичным образом получали липосомы на основе фосфолипидов из мозга крупного рогатого скота, которые были выделены по методу [8].

Лекарственные формы фармацевтических композиций, приведенных в настоящем документе, могут быть получены любым известным способом и содержать другие вспомогательные вещества, способные увеличивать стабильность композиций (i) и (ii), и трансфекцию РНКазы и никлозамида.

Пример 3. Синтез праймеров на N ген SARS-CoV-2.

Для определения возможности расщепления РНК SARS-CoV-2 использовали ПЦР метод. В качестве мишени для определения возможности расщепления РНКазой генома коронавируса SARS-CoV-2 был выбран N ген как наиболее стабильный для таких типов коронавирусов как SARS и MERS, кодирующий нуклеокапсид [9-11]. На N ген были синтезированы праймеры и флуоресцентный зонд, используя открытые международные данные CDC (Центр по контролю и профилактике заболеваний США) [12].

Синтез праймеров проводили на приборе ДНК-синтезаторе ASM-2000 фосфорамидитным твердофазным методом [13]. После синтеза олигонуклеотиды снимали с твердой фазы концентрированным 30% водным аммиаком в течение 2 ч при температуре 60°C. Раствор олигонуклеотидов выпаривали для удаления аммиака и осаждали в 70% этаноле в присутствии 0,3 М ацетата натрия и 50 мМ хлорида магния. Для осаждения олигонуклеотидов центрифугировали при 14000 об/мин в течение 20 мин. Осадок промывали дважды 70% этанолом и высушивали при комнатной температуре в течение 30 мин.

После синтеза олигонуклеотиды очищали от коротких не полностью синтезированных молекул. Для этого в конце синтеза не проводили последний этап снятия ДМТ группы, в результате только полностью синтезированные олигонуклеотиды на 5'-конце содержат ДМТ группу для очистки на картриджах методом обратно-фазовой хроматографии. Обратно-фазовую хроматографию проводили в следующих условиях: промывку олигонуклеотидов проводили с помощью 5% ацетонитрила с хлоридом натрия в

концентрации 100 мг/мл. Для удаления ДМТ группы с олигонуклеотидов использовали 3% раствор дихлоруксусной кислоты. После удаления ДМТ группы для элюирования очищенных олигонуклеотидов с картриджа использовали 50% ацетонитрил в 100 мМ трис-буфере pH 8,5.

Очищенные олигонуклеотиды осаждали 70% этанолом в присутствии 50 мМ хлорид магния, центрифугированием при 14000 об/мин в течение 20 мин. Полученный осадок олигонуклеотидов растворяли в ТЕ буфере pH 8,0 до концентрации 20 мкМ. Полученный раствор праймеров использовали для проведения ПЦР реакции.

Таблица 1
Последовательность праймеров и флуоресцентного зонда на N ген SARS-CoV-2

Наименование	Последовательность нуклеотидов 5' – 3'	Размер фрагмента амплификации
N1-F	GACCCCAAAATCAGCGAAAT	466 п.н
N3-R	TGTAGCACGATTGCAGCATTG	
N1-P	FAM-ACCCCGCATTCGTTTGGTGGACC-BHQ1	

С помощью данных праймеров и зонда, специфичных к участку N гена РНК SARS-CoV-2, методом ПЦР определяли содержание вируса в биологических образцах и проводили гель-электрофорез образцов, как описано в примерах 4 и 5.

Пример 4. Изучение действия липосом с РНКазой на SARS-CoV-2 методом RT-ПЦР in vitro.

Выделение РНК и выявление вируса SARS-CoV-2 проводили по стандартному методу с помощью сертифицированных наборов реагентов "ДНК-Технология" [14, 15], а также с помощью праймеров и зонда, синтезированных нами. Эффективность действия липосом определяли по смещению порогового цикла ($\Delta\Delta Ct$) в ПЦР анализе. Пороговый цикл показывает, какое количество РНК содержится в пробах, и он обратно пропорционален логарифму начального количества копий.

Для выделения РНК использовали как набор реагентов "ДНК-Технология", так и разработанный нами сертифицированный набор "ЭНКОР". Детекцию РНК в образцах проводили с синтезированными праймерами и зондом, описанных в примере 3. Для проведения ПЦР анализа использовали как набор реагентов "ДНК-Технология" SARS-CoV-2/SARS-CoV, так и разработанный нами ПЦР набор в следующих условиях: объем смеси 25 мкл, 1× ПЦР буфер (20 мМ трис-HCl pH 8,5, 20 мМ сульфат аммония, 20 мМ хлорид калия, 0,1 мкг/мл БСА), 3 мМ хлорид магния, 0,8 мМ дНТФ, 400 нм каждого праймера, 200 нм зонда, 1 ед. полимеразы, 25 ед. ревертазы. Программа ПЦР: 50°C - 15 мин; 95°C - 15 мин; 40 циклов (95°C - 10 с; 60°C - 40 с, считывание сигнала по каналу FAM). Для ПЦР анализа использовали по 5 мкл РНК образца.

Образцы биологического материала человека (по 80 мкл мазка из носоглотки), содержащие корона-вирус SARS-CoV-2, инкубировали с 20 мкл композиций (i) и (ii) (полученных, как описано в примерах 1 и 2) в течение 1 ч при 36°C. Параллельно проводили инкубирование тех же образцов с 20 мкл свободной РНКазы (1 ед./мкл), а также с "пустыми" липосомами, не содержащими РНКазу. Результаты экспериментов представлены в табл. 2.

Таблица 2
Изучение действия in vitro липосом с РНКазой на N ген SARS-CoV-2
ПЦР методом с помощью гибридизационно-флуоресцентной детекции

	Исходные образцы (+)	Липосомы	РНКазы	Липосомы с РНКазой	Липосомы с РНКазой и никлозамидом
Пороговый цикл (Ct)	19	19	21	28	29
	19	19	22	31	31
	17	17	21	26	27
	18	18	23	30	33
	20	20	21	27	27
	20	20	22	30	31
	18	19	23	25	24
Среднее значение Ct	19	19	22	28	29

Как видно из приведенных данных (табл. 2), под действием "пустых" липосом пороговый цикл (Ct) реакции RT-ПЦР практически не меняется, что свидетельствует о том, что липосомы сами по себе не могут разрушать РНК SARS-CoV-2. В то же время наибольшее воздействие и сдвиг Ct происходит под действием липосом, содержащих РНКазу на 9 циклов, и липосом, содержащих РНКазу и никлозамид на 10 циклов, что свидетельствует о том, что липосомы, содержащие РНКазу, расщепляют РНК коронавируса и снижают концентрацию РНК примерно в 10^3 раз. При этом сама РНКазы в наших экспериментах сдвигает Ct на 3 цикла, по-видимому, за счет расщепления "свободных" РНК COVID-19. Следует отметить, что липосомы, содержащие РНКазу с никлозамидом, проявляли практически такое же действие, что и липосомы, содержащие только РНКазу, что и следовало ожидать из биологической активности никлозамида.

Действие композиции (i) и (ii) исследовалось также методом гель-электрофореза [16], используя синтезированные нами праймеры на N ген (466 п.н.).

Результаты эксперимента приведены на фиг. 1.

Фиг. 1. Гель-электрофорез в 3% агарозном геле [16].

Образцы амплификатов N гена:

A - исходный образец, положительный по COVID-19;

B - образец после инкубации с "пустыми" липосомами;

C - образец после инкубации с РНКазой;

D - образец после инкубации с липосомами, содержащими РНКазу (композиция i);

F - образец после инкубации с липосомами, содержащими РНКазу и никлозамид (композиция ii);

K - отрицательный контроль – образец, не содержащий вирус SARS-CoV-2.

Гель-электрофорез (фиг. 1) ПЦР анализа выявил, что после инкубации позитивных SARS-CoV-2 образцов с композициями (i) и (ii) приводит к разложению N гена, так как продукт амплификации на гель-электрофорезе отсутствует, что свидетельствует о том, что произошло расщепление N гена SARS-CoV-2.

Пример 5. Изучение действия липосом с РНКазой на SARS-CoV-2 in vivo.

Исследования проводили на 5 группах кроликов породы "Великан", весом 1,6-1,8 кг, возраст 3-4 месяца, по 5 животных в каждой группе:

группа 1 - отрицательный контроль (физиологический раствор);

группа 2 - положительный контроль, образец мазка, содержащий SARS-CoV-2;

группа 3 - композиция (i);

группа 4 - композиция (ii);

группа 5 - РНКазы (1 ед./мкл).

В носовую полость животным в группе 1 закапывали 20 мкл физиологического раствора, животным группы 3 и 4 вводили по 20 мкл композиций (i) и (ii) соответственно, животным группы 5 вводили по 20 мкл РНКазы (1 ед./мкл). Через 1 ч всем животным (кроме группы 1) вводили по 20 мкл биологического материала, позитивного по SARS-CoV-2 с вирусной нагрузкой - Ct 20. Далее через 1 ч у всех животных был сделан забор образцов из носовой полости, как описано в [14]. Все полученные образцы анализировали методом ПЦР с набором реагентов "ДНК-Технология" SARS-CoV-2/SARS-CoV [15]. Результаты экспериментов представлены в табл. 3.

Таблица 3

Изучение действия in vivo композиции (i) и (ii) на ингибирование РНК SARS-CoV-2 количественным ПЦР методом с помощью гибридационно-флуоресцентной детекции

		Группа 1 отрицательный контроль	Группа 2 положительный контроль	Группа 3 композиция (i)	Группа 4 композиция (ii)	Группа 5 РНКазы
Пороговый цикл (Ct)	Кролик 1	—	25	—	—	26
	Кролик 2	—	27	—	—	26
	Кролик 3	—	24	—	—	24
	Кролик 4	—	28	—	—	28
	Кролик 5	—	27	—	—	30
Среднее значение Ct.		—	26	—	—	27

Как видно из табл. 3, при введении животным композиций (i) - группа 3 и композиций (ii) - группа 4, РНК SARS-CoV-2 не обнаруживается. В то же время в группе 2 и группе 5 среднее значение Ct 26-27 практически не меняется.

Результаты свидетельствуют о том, что под действием композиций (i) и (ii) происходит расщепление РНК вируса SARS-CoV-2, тогда как свободная РНКазы практически не действует в условиях in vivo.

Действие композиций (i) и (ii) in vivo исследовалось также методом гель-электрофореза (фиг. 2) [16].

Фиг. 2. Гель-электрофорез в 3% агарозном геле [16].

Группа 1 - отрицательный контроль (физиологический раствор).

Группа 2 - положительный контроль, образец мазка, содержащий SARS-CoV-2.

Группа 3 - композиция (i).

Группа 4 - композиция (ii).

Группа 5 - РНКазы (1 ед./мкл).

Как видно из фиг. 2, в контрольных образцах (исходный K+ - группа 2) имеется фрагмент N гена COVID-19, тогда как под действием композиций (i) и (ii) (гр. 3 и 4) происходит разрушение N гена вируса SARS-CoV-2.

Свободная РНКазы (гр. 5) не расщепляет РНК коронавируса in vivo (табл. 3 и гр. 5).

Пример 6. Стабильность липосом с РНКазой (композиция ii).

Для определения стабильности композицию (i) инкубировали при 36°C в течение различных интервалов времени от 1 до 6 ч (табл. 4). Затем к каждому образцу композиции (i) добавляли биологический

материал с коронавирусной инфекцией SARS-CoV-2 и вновь инкубировали при 36°C 1 ч. Эксперимент проводили, как описано в примере 4. Выделение РНК и выявление вируса SARS-CoV-2 проводили по стандартному методу с помощью сертифицированных наборов реагентов "ДНК-Технология" [15]. Эксперимент проводили в 5 повторях.

В табл. 4 приведены данные по изучению стабильности липосом с РНКазой- композиция (i) методом RT-ПЦР.

Таблица 4

Исследование стабильности липосом с
РНКазой- композиция (i) методом RT-ПЦР

	Положительный контроль (+) COVID-19	Композиция (i)			
		1 ч	2 ч	3 ч	6 ч
Пороговый цикл (Ct)	20	30	25	27	25
	20	30	28	27	28
	18	23	31	28	26
	19	24	22	27	27
Среднее значение Ct.	19	27	26.5	27	26.5

Из приведенной таблицы видно, что под действием композиции (i) пороговый цикл (Ct) смещается на 8 циклов, что свидетельствует о том, что вирусная нагрузка уменьшается примерно в 10^3 раз. При этом установлено, что среднее значение порогового цикла (Ct) при ПЦР с липосомами, содержащими РНКазу (композиция (i)), практически не меняется в интервале времени от 1 до 6 ч, что свидетельствует о стабильности липосом, содержащих РНКазу (композиция (i)) в течение 6 ч.

Пример 7. Стабильность липосом с РНКазой и никлозамидом (композиция (ii)).

Для определения стабильности композицию (ii) инкубировали при 36°C в течение различных интервалов времени от 1 до 6 ч (табл. 5). Затем к каждому образцу композиции (ii) добавляли биологический материал с коронавирусной инфекцией SARS-CoV-2 и вновь инкубировали при 36°C 1 ч. Эксперимент проводили, как описано в примере 4. Выделение РНК и выявление вируса SARS-CoV-2 проводили по стандартному методу с помощью сертифицированных наборов реагентов "ДНК-Технология" [15].

Таблица 5

Исследование стабильности липосом с РНКазой и
никлозамидом (композиция (ii)) методом RT-ПЦР

	Положительный контроль (+)	Композиция (ii)			
		1 ч	2 ч	3 ч	6 ч
Пороговый цикл (Ct)	21	26	25	27	25
	18	27	26	25	30
	18	30	30	26	27
	19	25	24	27	27
Средний Ct.	19	27	26	26	26.5

Как видно из табл. 5, под действием композиции (ii) пороговый цикл (Ct) смещается на 8 циклов, что свидетельствует о том, что вирусная нагрузка уменьшается примерно в 10^3 раз. При этом установлено, что среднее значение порогового цикла (Ct) при ПЦР практически не меняется в интервале времени от 1 до 6 ч, что свидетельствует о стабильности липосом, содержащих РНКазу и никлозамид (композиция (ii)) в течение 6 ч.

Пример 8. Исследование безопасности и токсичности композиций (i) и (ii) на животных *in vivo* (кролики и мыши), а также на культурах клеток (фибробласты и гепатоциты) *in vitro*.

Клетки фибробластов были получены нами по методу [17]. Гепатоциты печени крысы получены по методу [18].

Цитотоксические свойства композиций (i) и (ii) определяли методом MTT *in vitro* [19]. Данные представлены в виде среднего значения (из 3 экспериментов). Цитотоксический эффект каждого из исследуемых образцов композиций сравнивали с контролем цитостатиком "Цисплатин" (Teva Pharmaceutical Industries, Ltd., Израиль).

Таблица 6
Цитотоксичность композиций на клеточной культуре фибробластов

Образцы	Концентрация, Подавление роста клеток (%)			
	10 мкг/мл	100 мкг/мл	1 мг/мл	10 мг/мл
Липосомы с РНКазой (композиция (i))	0,0±0,0	0,0±0,0	2,3±0,4	5,4±0,6
Липосомы с РНКазой с никлозамидом (композиция (ii))	0,0±0,0	0,0±0,0	3,2±0,5	8,6±0,3
РНКазы в физиологическом растворе	0,0±0,0	0,0±0,0	0,5±0,1	1,2±0,1
Цисплатин	10±2,1	51,2±1,5	100,0±0,0	100,0±0,0

Таблица 7
Цитотоксичность композиций на гепатоцитах

Образцы	Концентрация, Подавление роста клеток (%)			
	10 мкг/мл	100 мкг/мл	1 мг/мл	10 мг/мл
Липосомы с РНКазой (композиция i)	0,0±0,0	0,0±0,0	1,3±0,3	3,4±0,6
Липосомы с РНКазой с никлозамидом (композиция ii)	0,0±0,0	0,0±0,0	1,7±0,4	4,2±0,3
РНКазы в физиологическом растворе	0,0±0,0	0,0±0,0	0,3±0,1	0,8±0,2
Цисплатин	14,1±0,7	18,3±1,6	33,3±0,6	37,8±0,3

Как видно из полученных данных (табл. 6 и 7), в диапазоне концентраций 10-100 мкг/мл образцы не подавляли рост нормальных клеток по сравнению с препаратом сравнения (цисплатин). Таким образом, композиции (i) и (ii) не обладают цитотоксическим эффектом для нормальных клеток.

Пример 9. Изучение общей токсичности композиций на кроликах и мышах *in vivo*.

Исследования проводили *in vivo* на 4 группах животных по 5 кроликов (породы "Великан", массой 1,6-1,8 кг) и беспородных мышей (массой 18-20 г) по 10 мышей в группе. Исследуемые композиции закапывали в глаза животных 2 раза в день (утром и вечером) по 50 мкл физиологического раствора в правый глаз - контроль, а в левый глаз 50 мкл - композиция - (i) и (ii) в течение 5 дней.

Первая группа - контроль (физиологический раствор).

Вторая группа - липосомы из соевого лецитина.

Третья группа - липосомы из соевого лецитина с РНКазой (композиция (i)).

Четвертая группа - липосомы из соевого лецитина с РНКазой и с никлозамидом (композиция (ii)).

Параллельно в каждой группе кроликов вводили интраназально по 20 мкл испытуемых образцов в каждую ноздрю.

Через 5 дней введения вышеперечисленных растворов определяли визуальные изменения, происходящие в глазах кроликов, и общее состояние животных, а также снимали биохимические показатели крови животных (мышей и кроликов) по методу [20]. Визуальное наблюдение показало, что самочувствие экспериментальных и контрольной групп животных было одинаковым.

В табл. 8 и 9 приведены биохимические показатели исследованных животных.

Таблица 8
Биохимические показатели крови экспериментальных животных (кролики)

Образцы	Bil	LDG	ALT	T-Prot	AST	Chol	TG	Glu	CK
	мг/дл	МЕ/л	МЕ/л	г/л	МЕ/л	мг/дл	мг/дл	мг/дл	МЕ/л
Липосома из соевого лецитина	0,42 ± 0,09	156,8 ± 1,2	28,2 ± 2,4	58,0 ± 3,1	15,0 ± 0,4	37,5 ± 0,2	125,7 ± 1,6	115,7 ± 6,6	152,5 ± 5,3
Липосомы с РНКазой (композиция (i))	0,34 ± 0,05	143,7 ± 4,0	40,3 ± 3,0	58,6 ± 1,9	16,7 ± 0,9	36,2 ± 0,8	132,6 ± 2,9	127,9 ± 8,1	165,3 ± 1,7
Липосомы с РНКазой с никлозамидом (композиция (ii))	0,41 ± 0,03	148,9 ± 2,5	37,8 ± 3,6	60,5 ± 1,8	15,7 ± 0,6	41,7 ± 0,6	128,2 ± 5,4	202,2 ± 0,4	180,7 ± 3,4
РНКазы в физиологическом растворе	0,37 ± 0,02	154,1 ± 1,5	39,9 ± 7,2	62,0 ± 0,9	18,2 ± 1,1	41,6 ± 1,4	124,4 ± 7,8	118,3 ± 0,8	186,5 ± 4,1
Контроль	0,40 ± 0,00	155,7 ± 3,6	30,5 ± 1,4	60,3 ± 4,1	20,1 ± 1,7	37,2 ± 0,6	128,8 ± 7,9	160 ± 3,3	151,6 ± 1,5

Таблица 9

Биохимические показатели крови экспериментальных животных (мыши)

Образцы	Tbil	Dbil	ALT	ALP	AST	Chol	TP	Glu	Urea
	мкМ/л		ед/л			мг/дл	г/дл	мм/л	
Липосома из соевого лецитина	28,6±0,5	14,6±0,2	58,2±0,4	440,0±0,1	295,0±0,4	62,5±0,2	117,7±0,6	4,1±0,6	38,5±0,3
Липосомы с РНКазой (композиция (i))	30,0±0,4	13,0±0,4	61,7±0,6	438,7±0,4	298,0±0,1	60,5±0,1	106,7±0,4	4,5±0,3	38,5±0,2
Липосомы с РНКазой с никлозамидом (композиция (ii))	31,2±0,1	14,1±0,1	59,3±0,1	427,6±0,3	300,7±0,2	66,2±0,0	109,6±0,2	4,3±0,4	39,8±0,3
РНКазы в физиологическом растворе	29,9±0,2	14,1±0,5	62,9±0,2	442,0±0,2	299,2±0,3	63,6±0,4	114,8±0,1	3,9±0,3	36,5±0,1
Контроль	31,8±0,1	15,7±0,3	62,5±0,4	443,3±0,1	301,7±0,1	65,3±0,1	118,8±0,2	4,5±0,3	39,6±0,1

Как видно из полученных данных (табл. 8 и 9), значения основных показателей крови практически не отличаются от контрольных, что свидетельствует о не токсичности композиций (i) и (ii) на животных.

Пример 10. Биомикроскопическое исследование слизистых глаз экспериментальных животных (кролики).

Действие липосом, содержащих композиции (i) и (ii) на слизистые, было изучено путем исследования динамического контроля глаз кроликов.

В ходе эксперимента проводился динамический контроль состояния глаз (офтальмологический статус) кроликов методом биомикроскопии. Биомикроскопическое исследование осуществляли при помощи офтальмологического биомикроскопа - щелевой лампы "SL 115" фирмы Carl Zeiss (Германия) при увеличении в 10 и 16 раз ежедневно в течение всего срока наблюдения. Оценивали состояние конъюнктивы, склеры, роговицы, передней камеры, радужки и рефлекс с глазного дна. Различные степени увеличения ($\times 10$, $\times 16$) при биомикроскопии позволяли более детально изучить состояние структур переднего сегмента глаза.

Перед проведением биомикроскопических исследований всех кроликов туго пеленали, голову плотно фиксировали за щелевой лампой.

В ходе проведения биомикроскопических исследований парные глаза кроликов были приняты за норму и использовались в качестве контроля в ходе экспериментов.

Первая проверка проводилась через сутки после закапывания композиций (i) и (ii) и липосом из соевого лецитина.

При осмотре методом биомикроскопии отмечалось, что глаза были спокойны без отделяемого, роговица прозрачная и гладкая, конъюнктива век бледно-розовая и блестящая, склера белая без инъекции сосудов. Влага передней камеры также была прозрачной без примеси каких-либо элементов. Радужка рельефна, зрачок круглый, реакция на свет живая. Оптические среды на всех глазах оставались прозрачными, рефлекс с глазного дна был розовый. Признаков воспаления и токсико-аллергической реакции выявлено не было.

За весь период наблюдения у всех кроликов офтальмологический статус обоих глаз был идентичным без клинических признаков воспалительных и аллергических реакций.

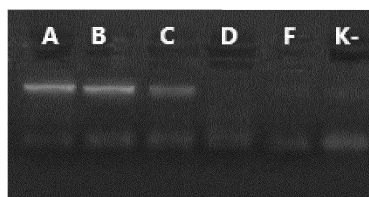
Эти данные свидетельствуют о том, что композиции (i) и (ii) не токсичны для глаз кроликов.

Литература

1. Патент RU 2746362 (заявка 2021106335 от 11.03.2021) – «Комбинированное лекарственное средство, обладающее противовирусным эффектом в отношении нового коронавируса SARS-CoV-2».
2. О. Н. Ильинская, Р. Шах Махмуд. РИБОНУКЛЕАЗЫ КАК ПРОТИВОВИРУСНЫЕ АГЕНТЫ // МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2014, том 48, № 5, с. 707–717.
3. Wu C, Jan J, et int., and Hsu JTA. Inhibition of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Replication by Niclosamide. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004. doi.org/10.1128/aac.48.7.2693-2696.2004.
4. Ashlee D. Brunaugh, Hyojong Seo, Zachary Warnken, Li Ding, Sang Heui Seo, Hugh D. C. Smyth. Development and evaluation of inhalable composite niclosamide-lysozyme particles: A broad-spectrum, patient-adaptable treatment for coronavirus infections and sequelae. Published: February 11, 2021 doi.org/10.1371/journal.pone.0246803.
5. <http://www.prnewswire.com/news-releases/hyundai-bioscience-announced-that-its-covid-19-oral-drug-solved-niclosamides-inhibitory-concentration-problem-301188126.html>.
6. ANA Therapeutics Begins Phase 2/3 Clinical Trial of Proprietary Oral Niclosamide Formulation to Treat COVID-19. Study is first in U.S. to test safety and efficacy of niclosamide as an antiviral for COVID-19. October 26, 2020 08:44 AM Eastern Daylight Time.
7. Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. Archives of Biochemistry and Biophysics, 212(1), 186–194. doi:10.1016/0003-9861(81)90358-1 ([https://doi.org/10.1016/0003-9861\(81\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(81)90358-1))
8. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований (Липидный и энергетический обмен). Учебное пособие. Ленинград 1982.
9. Sergio C. Oliveira, Mariana T.Q. de Magalhães and E. Jane Homan. Immunoinformatic Analysis of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Identification of COVID-19 Vaccine Targets. 2020. Front. Immunol. 11: 587615. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.587615>.
10. Kim TW, Lee JH, Hung CF, Peng S, Roden R, Wang MC, Viscidi R, Tsai YC, He L, Chen PJ, Boyd DA, Wu TC. Generation and Characterization of DNA Vaccines Targeting the Nucleocapsid Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. 2004. J Virol. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.9.4638-4645.2004>.
11. Ya Peng, Ning Du, Yuqing Lei, Sonam Dorje, Jianxun Qi, Tingrong Luo, George F Gao, Hao Song. Structures of the SARS-CoV-2 nucleocapsid and their perspectives for drug design. The EMBO Journal (2020) 39: e105938.
12. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES Public Health Service Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Atlanta, GA 3033324, Jan 2020.
13. Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach. Твёрдофазный амидофосфитный метод или фосфорамидитный метод. Beaucage S. L., Iyer R. P. (англ.) // Tetrahedron. 1992. Vol. 48, no.12, P. 2223-2311. doi: 10.1016/S0040-4020(01)88752-4.
14. Лабораторное тестирование случаев, подозреваемых на коронавирусную инфекцию (COVID-19). 19 марта 2020 г, ВОЗ.
15. ООО «НПО ДНК-Технология». Инструкция по применению набора реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени SARS-CoV-2/SARS-CoV.
16. Green M.R., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. Fourth edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
17. Khan M., Gasser S. Generating primary fibroblast cultures from mouse Ear and Tissues / Journal of Visualized Experiment. 1/10/2016.
18. Cabral, F., Miller, C.M., Kudrna, K.M., Hass, B.E., Daubendiek, J.G., Kellar, B.M., Harris, E.N. Purification of Hepatocytes and Sinusoidal Endothelial Cells from Mouse Liver Perfusion. Journal of Visualized Experiments. 2/12/2018.
19. Niks M., Otto M. Towards an optimized MTT assay// Journal of Immunological Methods, 1990, 130, p.149-151
20. Дерюгина А.В., Корягин А. С., Копылова С. В., Таламанова М. Н. // Методы изучения стрессовых и адаптационных реакций организма по показателям системы крови. Нижний Новгород – 2010. – стр. 11.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение лекарственного средства, содержащего в липосоме эффективное количество молекул РНКазы А с никлозамидом, для профилактики или лечения коронавирусной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2.
2. Применение по п.1, в котором липосома получена на основе фосфолипидов из соевого лецитина или фосфолипидов животного происхождения.
3. Применение по пп.1 и 2 для интраназального или ингаляционного введения.
4. Способ профилактики или лечения SARS-CoV-2 инфекции, в котором вводятся молекулы РНКазы А с никлозамидом, содержащиеся в эффективном количестве в липосомах.
5. Способ по п.4, в котором липосомы лекарственного средства получают на основе фосфолипидов из соевого лецитина или фосфолипидов животного происхождения.



Фиг. 1



Фиг. 2

