

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202292144** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2022.12.05**

(51) Int. Cl. *A61K 38/40* (2006.01)  
*A61P 31/12* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2020.10.15**

---

(54) **ЛАКТОФЕРРИН ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ С АНТИВИРУСНЫМ  
ДЕЙСТВИЕМ**

---

(31) **10202000005011**

(32) **2020.03.09**

(33) **IT**

(86) **PCT/IB2020/059695**

(87) **WO 2020/250209 2020.12.17**

(88) **2021.02.18**

(71) Заявитель:  
**СОФАР С.П.А. (IT)**

(72) Изобретатель:

**Биффи Андреа, Фьоре Вальтер (IT)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев  
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,  
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к композиции, содержащей лактоферрин, для перорального применения в качестве противовирусного средства, предпочтительно для применения в лечении вирусных инфекций дыхательной системы и вызванных или обусловленных указанными вирусными инфекциями симптомов или расстройств, предпочтительно SARS-коронавирусных инфекций (например, COVID-19).

---

**A1**

**202292144**

**202292144**

**A1**

## **ЛАКТОФЕРРИН ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ С АНТИВИРУСНЫМ ДЕЙСТВИЕМ**

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей лактоферрин, для перорального применения в качестве противовирусного средства, предпочтительно для применения в лечении вирусных инфекций дыхательной системы и вызванных или обусловленных указанными вирусными инфекциями симптомов или расстройств, предпочтительно SARS-коронавирусных вирусных инфекций (например, COVID-19).

Вирусные инфекции дыхательных путей, как говорит само название, представляют собой инфекционные заболевания, вызванные вирусами, которые поражают органы верхних и/или нижних отделов дыхательной системы (нос, глотку, гортань, трахею, бронхи и легкие).

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

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

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

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

Лактоферрин, также известный как лактотрансферрин, представляет собой многофункциональный глобулярный белок. Лактоферрин относится к семейству трансферринов и имеет молекулярную массу около 80 кДа и два сайта связывания иона железа ( $Fe^{3+}$ ), аналогично самому трансферрину. Лактоферрин никогда не насыщается железом, и содержание железа в нем варьируется. Лактоферрин обладает антимикробной, бактерицидной, фунгицидной и направленной против различных вирусов активностью. Существует гипотеза, что антимикробная активность лактоферрина обусловлена его аффинностью к  $Fe^{3+}$ , и вследствие этой высокой аффинности он конкурирует с железозависимыми микроорганизмами, а также оказывает прямое действие на внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий. Объединение лактоферрина с ионом железа в секретах слизистой оболочки модулирует активность и способность бактерий и вирусов к агрегации в направлении клеточных мембран. Это связано с тем фактом, что некоторым бактериям и вирусам для осуществления репликации в клетке требуется железо, а лактоферрин, напротив, извлекает его из окружающей среды, тем самым предотвращая пролиферацию указанных бактерий и вирусов.

Лактоферрин проявляет антивирусную активность против ДНК и РНК вирусов, в том числе ротавируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса герпеса и ВИЧ. Антивирусный эффект лактоферрина осуществляется на раннем этапе инфекции. Лактоферрин предотвращает проникновение вируса в клетку-хозяина посредством блокирования рецепторов или прямого связывания с вирусными частицами. В частности, антивирусный эффект лактоферрина в основном заключается в его способности к связыванию гликозаминогликанов плазматической мембраны. Кроме

того, из литературы известно, что лактоферрин участвует в иммунном ответе организма-хозяина против острой инвазии коронавируса, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV), посредством повышения активности естественных клеток-киллеров (NK) и посредством стимуляции агрегации и адгезии нейтрофилов. Кроме того, выдвинута гипотеза, что лактоферрин может играть протективную роль в защите организма-хозяина от инфекции SARS-CoV посредством связывания с ГСПГ (широко распространенными ГСПГ, гепаринсульфат-протеогликанами) и посредством блокирования предварительного взаимодействия между SARS-CoV и клетками-хозяевами, с учетом того, что ГСПГ являются незаменимыми молекулами клеточной поверхности, вовлеченными в проникновение SARS-CoV в клетки.

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

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

Лекарственные формы композиций по изобретению на основе лактоферрина или его производного можно готовить путем добавления определенных эксципиентов и добавок в виде растворов, или эмульсий, или дисперсий, подходящих для распыления и введения с помощью распылительного устройства в нос и горло для применения для ингаляции, перорального или назального применения. Указанные распыляемые композиции эффективны в качестве противовирусных средств, в частности в лечении вирусных инфекций дыхательных путей и обусловленных ими симптомов или

расстройств, в частности инфекций, вызванных по меньшей мере одним вирусом вида коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (такой как штамм SARS-CoV, SARS-CoV-2 или 2019-nCoV, являющийся возбудителем заболевания, известного как COVID-19, или SARS-CoV-подобный).

Композиции по изобретению на основе лактоферрина или его производного не имеют значимых побочных эффектов, и их можно вводить всем категориям нуждающимся в этом субъектов, включая пожилых людей, беременных или кормящих женщин, субъектов педиатрической категории (0–12 лет), субъектов с респираторными или сердечно-сосудистыми осложнениями, или с сахарным диабетом, или другими осложнениями, которые могут представлять риск или опасность в случае вирусной инфекции.

Кроме того, композиции по изобретению на основе лактоферрина просты в приготовлении и экономически эффективны.

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

#### ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1A–D представлено действие лактоферрина (L) на панель цитокинов/хемокинов и молекул с противовирусным действием или вовлеченных в противовирусные ответы, продуцируемых клетками кишечного эпителия Caco-2.

На Фиг. 2A и 2B схематически представлены чертежи исследования *in vitro* по оценке противовирусных ответов в клетках кишечного эпителия Caco-2 после предварительной обработки или одновременной обработки лактоферрином (L) относительно обработки вирусом SARS-CoV-2.

На Фиг. 3A–E изображено действие лактоферрина на панель цитокинов/хемокинов и молекул, обладающих противовирусным действием или вовлеченных в противовирусные ответы, продуцируемых клетками кишечного эпителия Caco-2, после предварительной обработки лактоферрином (L) относительно обработки вирусом SARS-CoV-2.

На Фиг. 4A–D изображено действие лактоферрина на панель цитокинов/хемокинов и молекул, обладающих противовирусным действием или вовлеченных в противовирусные ответы, продуцируемых клетками кишечного эпителия

Саго-2, после предварительной обработки лактоферрином (L) относительно обработки вирусом SARS-CoV-2.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Объект настоящего изобретения образует композиция для перорального применения и (сокращенно композиция по изобретению) и для применения в качестве противовирусного агента, предпочтительно для применения в способе лечения вирусных инфекций дыхательной системы (верхних дыхательных путей и/или нижних дыхательных путей) и вызванных или обусловленных указанной вирусной инфекцией симптомов или расстройств у нуждающихся в этом субъектов, где указанная композиция содержит:

(1) смесь М (сокращенно смесь М по изобретению), содержащую или альтернативно включающую в свой состав лактоферрин (сокращенно LF) или его приемлемое производное фармацевтического класса; и возможно

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

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

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

Симптомы или расстройства, вызванные или обусловленные указанной инфекцией дыхательных путей (верхних дыхательных путей и/или нижних дыхательных путей), предпочтительно коронавирусной инфекцией, как определено выше (например, SARS-CoV, SARS-CoV-2 или 2019-nCoV, SARS-CoV-подобный),

могут представлять собой: тяжелый острый респираторный синдром (SARS), респираторные осложнения, астму, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), бронхит, эмфизему, муковисцидоз, кашель, коклюш, пневмонию, плеврит, бронхиолит, простудное заболевание, синусит, ринит, трахеит, фарингит, ларингит, острый ларинготрахеобронхит, эпиглоттит, бронхоэктаз, затрудненное дыхание, диспноэ (дыхательную недостаточность, нехватку дыхания), лихорадку, утомляемость, мышечную боль, мышечную болезненность, заложенность носа, насморк, першение в горле, желудочно-кишечные симптомы, такие как, например, тошнота и диарея, почечную недостаточность, потерю аппетита и/или общее плохое самочувствие.

Лактоферрин может присутствовать в композициях по изобретению или в смесях М по изобретению в % по массе от 10% до 90% относительно суммарной массы смеси М композиции (например, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% или 85%), предпочтительно от 20% до 80%, более предпочтительно от 30% до 70% или от 30% до 50%.

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

Лекарственную форму композиции по настоящему изобретению для перорального применения можно готовить в твердой форме, выбранной из: таблеток, жевательных таблеток, таблеток, растворимых в полости рта, гранул, порошка, хлопьев, растворимого порошка или гранул, порошка или гранул, растворимых в полости рта, капсул; или альтернативно в жидкой форме, выбранной из: растворов, суспензий, дисперсий, эмульсий, жидкости, которую можно дозировать в форме спрея,

сиропов; или альтернативно в полужидкой форме, выбранной из: мягкого геля, геля; предпочтительно композиция по изобретению находится в твердой форме.

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

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

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

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

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



Композиции по изобретению в соответствии с любым из описанных воплощений могут быть предназначены для применения в качестве вспомогательной терапии или дополнительных подходов к антивирусной терапии.

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

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

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

В контексте настоящего изобретения термин «субъект/ь» используется для указания субъектов-людей или животных, предпочтительно млекопитающих (например, домашних животных, таких как собаки, кошки, лошади, овцы или крупный рогатый скот). Предпочтительно композиции по изобретению предназначены для применения в способах лечения субъектов-людей.

Ниже представлены воплощения настоящего изобретения FR (№№).

FR1. Композиция для применения в способе лечения вирусной инфекции,

где указанная композиция содержит

(1) лактоферрин и возможно

(2) по меньшей мере одну приемлемую добавку и/или один приемлемый

эксципиент фармацевтического класса; и

где указанная композиция предназначена для применения пероральным путем.

FR2. Композиция для применения в соответствии с FR1, где указанная композиция предназначена для применения в способе лечения вирусной инфекции дыхательной системы и симптомов или расстройств, вызванных или обусловленных

указанной вирусной инфекцией; предпочтительно вирусных инфекций верхних дыхательных путей и/или нижних дыхательных путей.

FR3. Композиция для применения в соответствии с FR1 или FR2, где указанная вирусная инфекция вызвана вирусом семейства *Coronaviridae*, подсемейство: *Coronavirinae*, род: *Betacoronavirus*, вид: коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV), коронавирус-2, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2 или 2019-nCoV) и являющийся возбудителем заболевания COVID-19, и коронавирус-подобный вирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-подобный или SL-CoV); предпочтительно SARS-CoV-2.

FR4. Композиция для применения в соответствии с FR2 или FR3, где указанные вызванные или обусловленные указанной вирусной инфекцией симптомы и/или расстройства выбраны из: тяжелого острого респираторного синдрома (SARS), респираторных осложнений, астмы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), бронхита, эмфиземы, муковисцидоза, кашля, коклюша, пневмонии, плеврита, бронхолита, простудного заболевания, синусита, ринита, трахеита, фарингита, ларингита, острого ларинготрахеобронхита, эпиглоттита, бронхоэктаза, затрудненного дыхания, диспноэ (дыхательную недостаточность, нехватку дыхания, лихорадки, утомляемости, мышечной боли, мышечной болезненности, заложенности носа, насморка, першения в горле, тошноты, диареи, почечной недостаточности, потери аппетита, общего плохого самочувствия).

FR5. Композиция для применения по любому из предшествующих FR1-4, где композиция находится в твердой форме, выбранной из: таблеток, жевательных таблеток, таблеток, растворимых в полости рта, гранул, порошка, хлопьев, растворимого порошка или гранул, капсул; или альтернативно в форме жидкости, выбранной из: растворов, суспензий, дисперсий, эмульсий, жидкости, которую можно дозировать в форме спрея, сиропов; или альтернативно в полужидкой форме, выбранной из: мягкого геля, геля; предпочтительно в твердой форме.

FR6. Композиция для применения по любому из FR1-5, где лактоферрин находится в форме липосом; предпочтительно в форме липосом на основе фосфолипидов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Автор изобретения провел исследования *in vitro* в целях оценки способности лактоферрина к стимуляции врожденного противовирусного иммунного ответа у субъекта для борьбы с вирусной инфекцией SARS-CoV-2 (COVID-19). В частности, проводили следующие оценки:

(1) способность лактоферрина к усилению антивирусных ответов в клетках кишечного эпителия; и

(2) способность лактоферрина оказывать влияние на инфекцию SARS-CoV-2 в клетках кишечного эпителия человека.

### МАТЕРИАЛЫ (1) и (2)

- Конфлюэнтные монослои клеток Caco-2 (*иммortalизованные эпителиальные клетки из карциномы ободочной кишки*): Клетки Caco-2 были получены из *Европейской коллекции аутентифицированных клеточных культур* (ECACC); их выращивают во флаконах T25 в полной среде DMEM (*модифицированная Дульбекко среда Игла* с добавлением 10% (об/об) фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 1% (об/об) пирувата натрия и 1% (об/об) пенициллина и стрептомицина) при 37°C в увлажненном инкубаторе, содержащем 5% CO<sub>2</sub>, отделяли от флакона после достижения около 75% конфлюэнтности и высевали до концентрации 5x10<sup>5</sup> клеток/лунка в 12-луночные планшеты. Питательную среду заменяли каждые 48 часов до формирования клетками конфлюэнтного монослоя. Затем питательную среду удаляли и заменяли свежей средой без антибиотиков.

- Лактоферрин (код «L») (100 мкг/мл).

- Вирус SARS-CoV-2 (код «SARS»): был выделен у пациента в г. Падуя и полностью охарактеризован; вирусы размножали на клетках VERO C1008 с получением исходной рабочей культуры, которую хранили при -80°C.

## 1. ВЛИЯНИЕ ЛАКТОФЕРРИНА НА АНТИВИРУСНЫЕ ОТВЕТЫ В КЛЕТКАХ КИШЕЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ.

### 1.1. Способ

1) Конфлюэнтные монослои клеток Caco-2 инкубировали в течение 2 часов только с питательной средой (контроль, код «nt»: без обработки) или с лактоферрином (код «L»).

2) Через 4 часа питательную среду удаляли, заменяли полной средой, содержащей антибиотиками, и монослои инкубировали еще в течение 16 часов при 37°C.

3) В конце инкубации среду удаляли, монослои промывали замороженной средой DMEM, клетки собирали и сразу подвергали лизису. Суммарную РНК экстрагировали из клеток, транскрибировали с получением кДНК (набор реактивов iScript™ Select cDNA Synthesis Kit (BioRad)) и использовали для проведения количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) на следующих мРНК транскриптах:

- IFN- $\beta$  и IFN- $\alpha$ , специфичных для антивирусного действия;
- фактора транскрипции, индуцирующего интерфероновый ответ (IRF)-3 и IRF-7, сигнальных молекул, сцепленных с интерферонами (антивирусные молекулы);
- толл-подобных рецепторов (TLR)3 и TLR7, специфичных рецепторов для врожденного иммунитета, которые «видят» вирусную РНК и инициируют антивирусный ответ;
- IL-10 и TGF- $\beta$ , противовоспалительных маркеров;
- IL6, провоспалительного маркера

4) Все тесты проводили три раза. Ген «домашнего хозяйства» Rn18S использовали в качестве гена сравнения. Данные анализировали, используя метод  $\Delta\Delta C_t$  (кратность изменения).

## 1.2. РЕЗУЛЬТАТЫ

Лактоферрин способен стимулировать врожденную иммунную защиту (TLR3 и TLR7; Фиг. 1A), проявляя сильный противовоспалительный ответ (значимые данные для IL-10, TGF- $\beta$ ; Фиг. 1B) и склонность к снижению уровня провоспалительных маркеров (IL6; Фиг. 1C). Кроме того, лактоферрин показал значимую активность в отношении нескольких сигнальных путей, вовлеченных в антивирусный ответ (IFN- $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IRF-3 и IRF-7; Фиг. 1D).

Экспрессию генов, кодирующих  $\alpha$ - и  $\beta$ -интерфероны (IFN- $\alpha$  и IFN- $\beta$ ), количественно определяли как количество сигнальных белков, высвобождаемых из клеток-хозяев в ответ на присутствие вирусов. Эти молекулы продуцирует слизистая оболочка кишечника человека для борьбы с вирусной инфекцией.

Другие цитокины определяли количественно на основании экспрессии гена: IL-10 и TGF- $\beta$ , которые являются противовоспалительными маркерами; стимуляция экспрессии противовоспалительных цитокинов является ценным инструментом для противодействия разрушительным действиям вирусной инфекции.

Кроме того, рецепторы TLR3 и TLR7 вовлечены в реакцию на вирус посредством распознавания однонитевой и двунитевой РНК; как правило, активация TLR предрасполагает к высвобождению интерферонов.

## 2. ВЛИЯНИЕ ЛАКТОФЕРРИНА НА ИНФЕКЦИЮ SARS-COV-2 В КЛЕТКАХ КИШЕЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА

### 2.1. СПОСОБ

Конфлюэнтные монослои клеток Caco-2 предварительно или одновременно обрабатывали лактоферрином (код «L») относительно обработки вирусом SARS-CoV-2 в соответствии со схемой, представленной на Фиг. 2А и 2В; полученные результаты сравнивают с клетками Caco-2, обработанными только питательной средой (контроль, код «nt»), и клетками Caco-2, обработанными только вирусом SARS-CoV-2 (код «SARS-CoV-2»).

В конце инкубации для каждого типа обработки среду удаляли, суммарную РНК экстрагировали из клеток, транскрибировали в кДНК и использовали для проведения ОТ-ПЦР на следующих мРНК транскриптах:

- IFN- $\beta$  и IFN- $\alpha$ , специфичных для противовирусного действия;
- TLR3 и TLR7, специфичных рецепторов для врожденного иммунитета, которые «видят» вирусную РНК и инициируют противовирусный ответ;
- MDA5 и MAVS, вирусных рецепторов генов, вовлеченных в противовирусный ответ в клетке;
- TGF- $\beta$ , противовоспалительного маркера;
- IL-1 $\beta$  и IL-8, провоспалительных маркеров;
- TSLP1, цитокина, высвобождаемого из клеток кишечного эпителия, который обладает важным действием на регуляцию противовоспалительного фенотипа дендритных клеток и макрофагов.

Все тесты проводили и получали результаты три раза. Ген «домашнего хозяйства» Rn18S использовали в качестве гена сравнения. Данные анализировали, используя метод  $\Delta\Delta C_t$  (кратность изменения).

Протокол предварительной обработки (Фиг. 2А): каждую лунку инкубировали с одной питательной средой (контроль, код «nt») или обрабатывали лактоферрином в концентрации 100 мкг/мл. Через 3 часа питательную среду удаляли, заменяли свежей средой, содержащей антибиотики, и монослои инфицировали SARS-CoV-2.

Протокол одновременной обработки: каждую лунку инкубировали с одной питательной средой (контроль, код «nt») или обрабатывали лактоферрином в концентрации 100 мкг/мл. Одновременно с этим клетки инфицировали SARS-CoV-2. В этих экспериментах среду удаляли из всех лунок через 2 часа и заменяли свежей средой, содержащей антибиотики.

## 2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследовании показано, что лактоферрин способен осуществлять как антивирусное, так и противовоспалительное действие в клетках, инфицированных SARS-CoV-2, что определяет пригодность лактоферрина как для профилактического, так и для радикального лечения COVID-19.

Результаты, представленные на Фиг. 3, показывают, что лактоферрин осуществляет:

- индукцию IFN- $\alpha$  и IFN- $\beta$  при предварительной обработке (Фиг. 3A),
- индукцию TRL3 при предварительной обработке (Фиг. 3B),
- индукцию TRL3 при одновременной обработке (Фиг. 4A), и
- индукцию MAVS и Mda5 при одновременной обработке (Фиг. 4B), вовлеченных в распознавание вируса.

Кроме того, наблюдался противовоспалительный эффект лактоферрина, который:

- снижает экспрессию IL-8 при предварительной обработке (Фиг. 3C) и IL-1 $\beta$  при одновременной обработке (Фиг. 4C),
- снижает экспрессию TSLP1 при предварительной обработке (Фиг. 3D) и при одновременной обработке (Фиг. 4C), и
- повышает экспрессию противовоспалительного маркера TGF- $\beta$  при предварительной обработке (Фиг. 3E) и при одновременной обработке (Фиг. 4D).

Экспрессия TGF- $\beta$  была значимо активирована под действием лактоферрина.

Рецепторы TLR на основании каскада реакций, связанных с индукцией интерферона, были активированы под действием лактоферрина и были особенно активными на TLR3 и умеренно активными на TLR7.

Фаза инициации антивирусного иммунного ответа опосредована MAVS и MDA5; было обнаружено, что лактоферрин способен быть триггером MAVS, хотя это было статистически незначимым.

Экспрессия TSLP1 была значимо снижена под действием лактоферрина в модели предварительной обработки, демонстрирующей, что лактоферрин вносит вклад в уменьшение индуцированного вирусом воспалительного состояния.

TSLP1 представляет собой цитокин, высвобождаемый из клеток кишечного эпителия, который оказывает важное влияние на регуляцию противовоспалительного фенотипа дендритных клеток и макрофагов.

#### ВЫВОД (1) и (2)

Полученные результаты показали, что лактоферрин способен к положительному модулированию антивирусного и противовоспалительного ответов в случае обоих экспериментальных протоколов, благодаря чему он является полезным средством вспомогательной антивирусной терапии.

Действительно, из литературы известно, что у пациентов с COVID-19 наблюдается повышение экспрессии провоспалительных цитокинов и что сывороточные уровни лактатдегидрогеназы (LDH), С-реактивного белка (CRP), тромбокрит (PCT) и ферритин значимо повышены у пациентов с очень тяжелой формой COVID-19 относительно менее тяжелой. Высокие уровни ферритина и IL-6 считают предикторами фатальности, что позволяет предположить связь смертности с вызванным вирусами гипервоспалением.

Благодаря своим противовоспалительным и антивирусным свойствам лактоферрин (или лактотрансферрин) способен уменьшать воспалительное состояние. Показано, что лактоферрин, представляющий собой гликопротеин антимикробного действия и носителем железа, способен проявлять противовоспалительное действие против IL-6 в инфицированных/воспаленных клетках, что способствует понижающей регуляции ферритина — ключевого фактора в гомеостазе железа и воспалительных свойствах.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для применения в способе лечения вирусной инфекции,

где указанная композиция содержит

(1) лактоферрин и возможно

(2) по меньшей мере одну приемлемую добавку и/или по меньшей мере

один приемлемый эксципиент фармацевтического класса; и

где указанная композиция предназначена для применения пероральным путем.

2. Композиция для применения по п. 1, где указанная композиция предназначена для применения в способе лечения вирусной инфекции дыхательной системы и симптомов или расстройств, вызванных или обусловленных указанной вирусной инфекцией; предпочтительно вирусных инфекций верхних дыхательных путей и/или нижних дыхательных путей.

3. Композиция для применения по п. 1 или 2, где указанная вирусная инфекция вызвана вирусом семейства Coronaviridae, подсемейство: Coronavirinae, род: Betacoronavirus, вид: коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV), коронавирус-2, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2 или 2019-nCoV) и являющийся возбудителем заболевания COVID-19, и коронавирус-подобный вирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-подобный или SL-CoV); предпочтительно SARS-CoV-2.

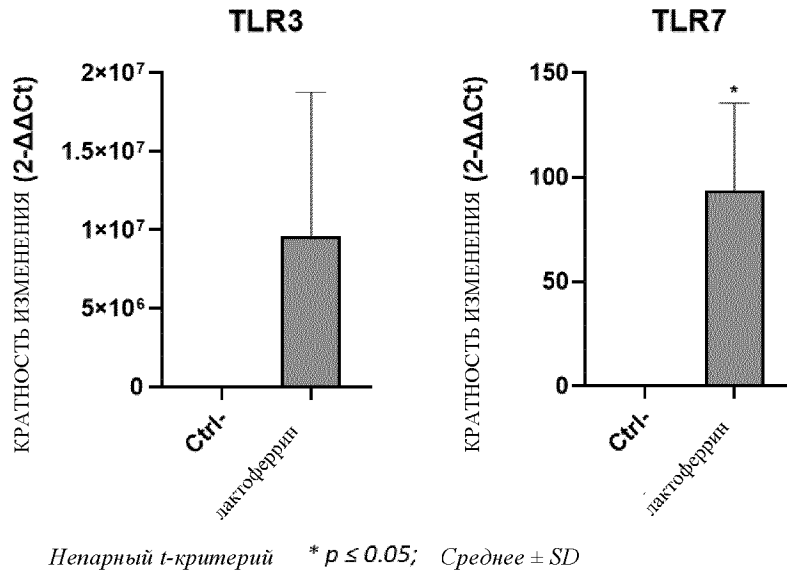
4. Композиция для применения по п. 2 или 3, где указанные вызванные или обусловленные указанной вирусной инфекцией симптомы и/или расстройства выбраны из: тяжелого острого респираторного синдрома (SARS), респираторных осложнений, астмы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), бронхита, эмфиземы, муковисцидоза, кашля, коклюша, пневмонии, плеврита, бронхоолита, простудного заболевания, синусита, ринита, трахеита, фарингита, ларингита, острого ларинготрахеобронхита, эпиглоттита, бронхоэктаза, затрудненного дыхания, диспноэ (дыхательную недостаточность, нехватку дыхания, лихорадки, утомляемости, мышечной боли, мышечной болезненности, заложенности носа, насморка, першения в горле, тошноты, диареи, почечной недостаточности, потери аппетита, общего плохого самочувствия).

5. Композиция для применения по любому из п. п. 1–4, где композиция находится в твердой форме, выбранной из: таблеток, жевательных таблеток, таблеток,

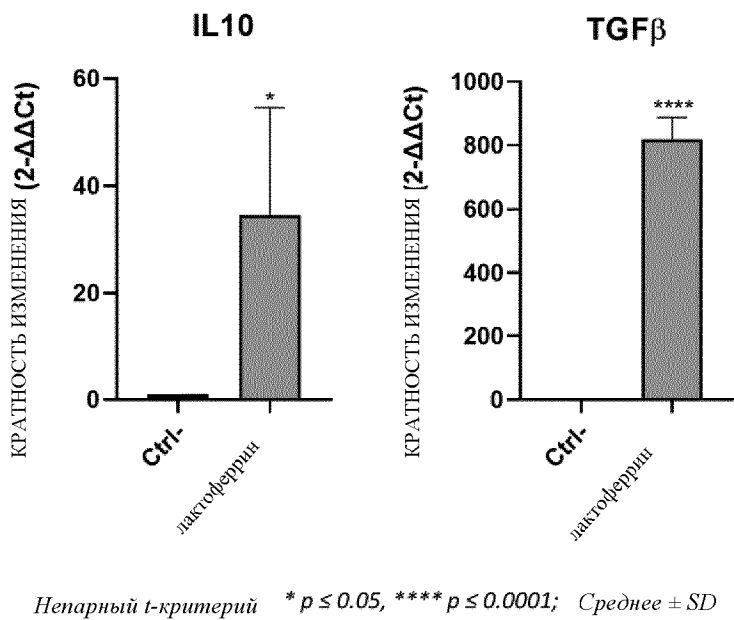


растворимых в полости рта, гранул, порошка, хлопьев, растворимого порошка или гранул, капсул; или альтернативно в форме жидкости, выбранной из: растворов, суспензий, дисперсий, эмульсий, жидкости, которую можно дозировать в форме спрея, сиропов; или альтернативно в полужидкой форме, выбранной из: мягкого геля, геля; предпочтительно в твердой форме.

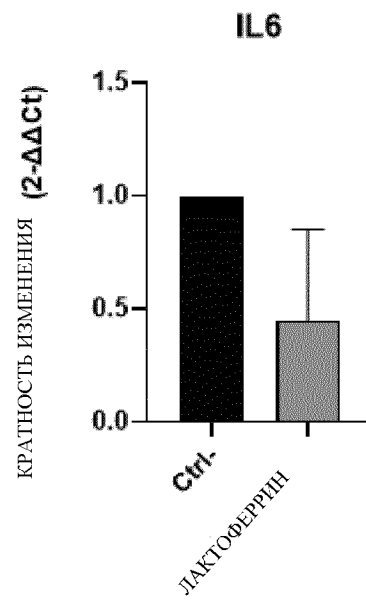
6. Композиция для применения по любому из п. п. 1–8, где лактоферрин находится в форме липосом; предпочтительно в форме липосом на основе фосфолипидов.



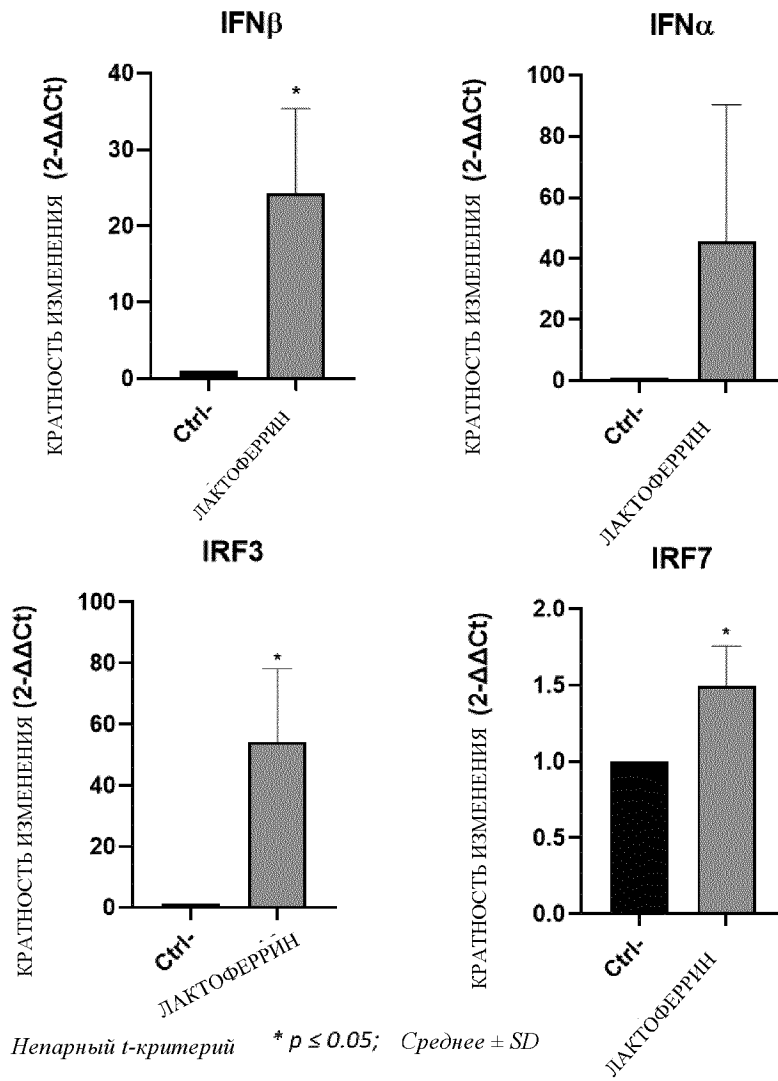
Фиг. 1А



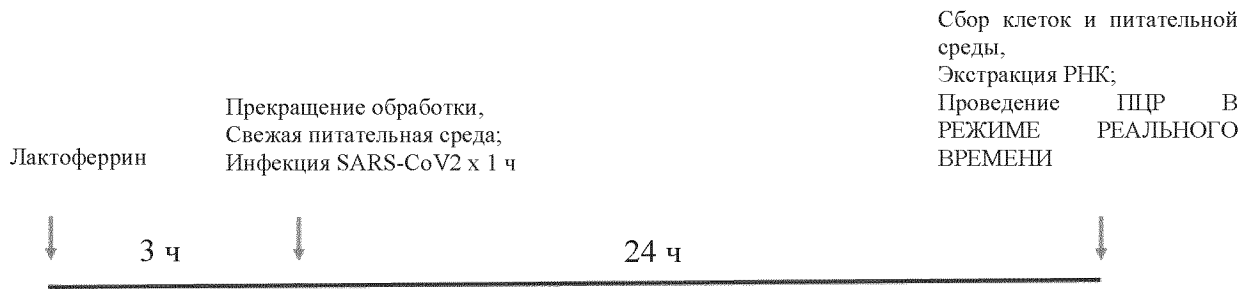
Фиг. 1В



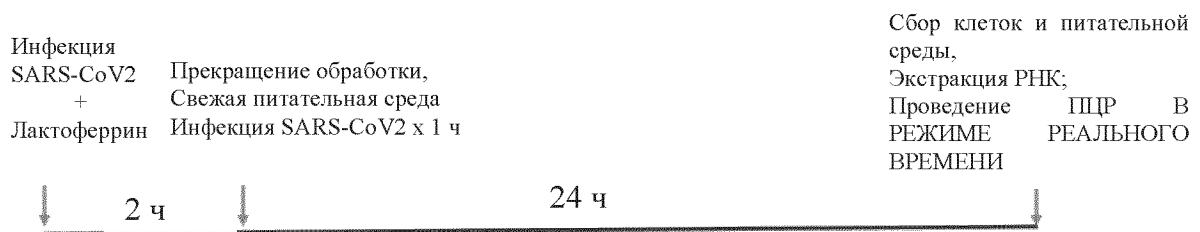
**Фиг. 1С**



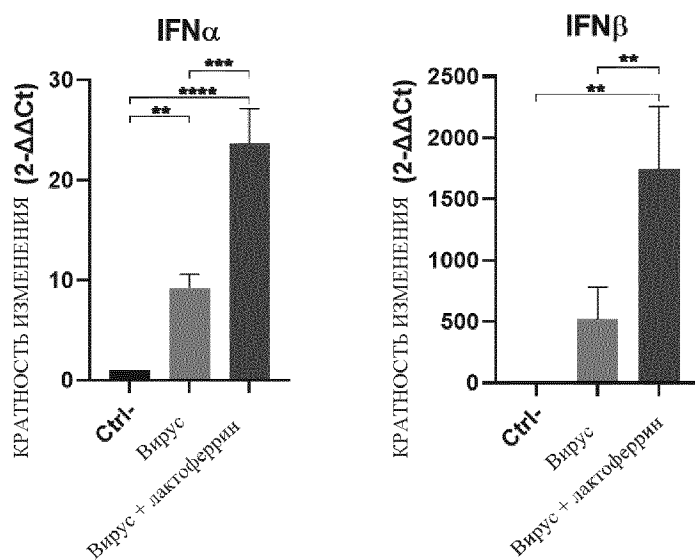
Фиг. 1D



**Фиг. 2А**

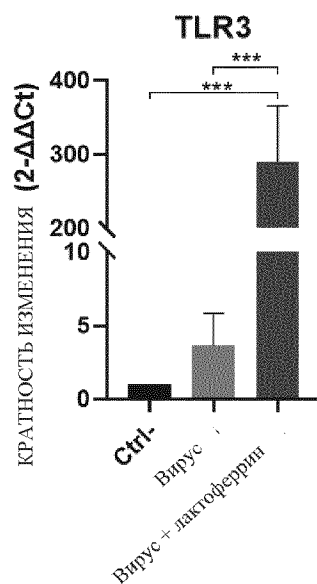


**Фиг. 2В**



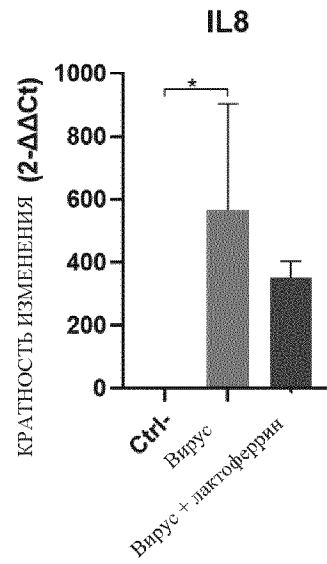
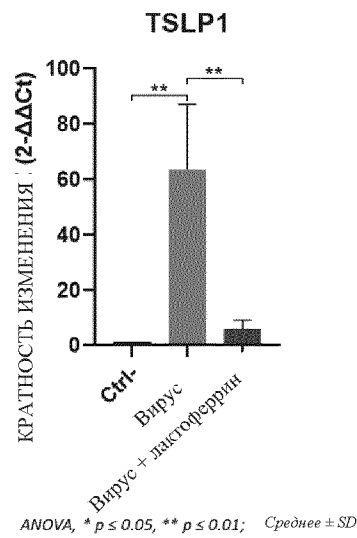
ANOVA, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.0005$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ; Среднее  $\pm$  SD

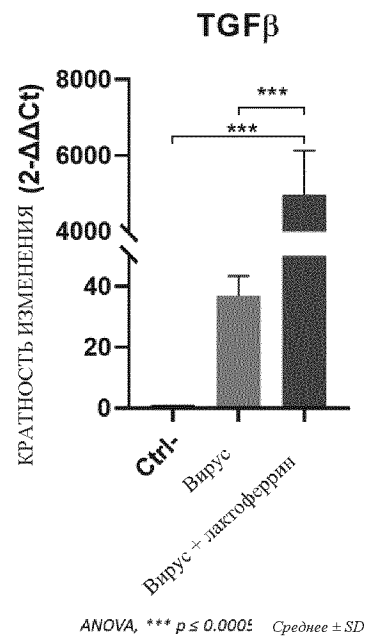
Фиг. 3А



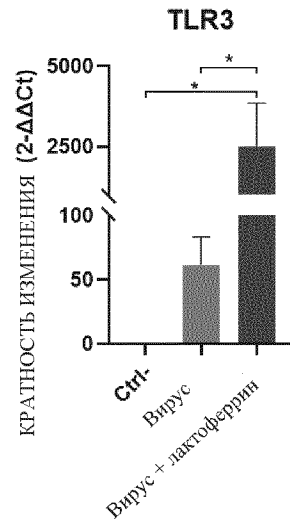
ANOVA, \*\*\*  $p \leq 0.0005$ ; Среднее  $\pm$  SD

Фиг. 3В

**Фиг. 3С****Фиг. 3D**

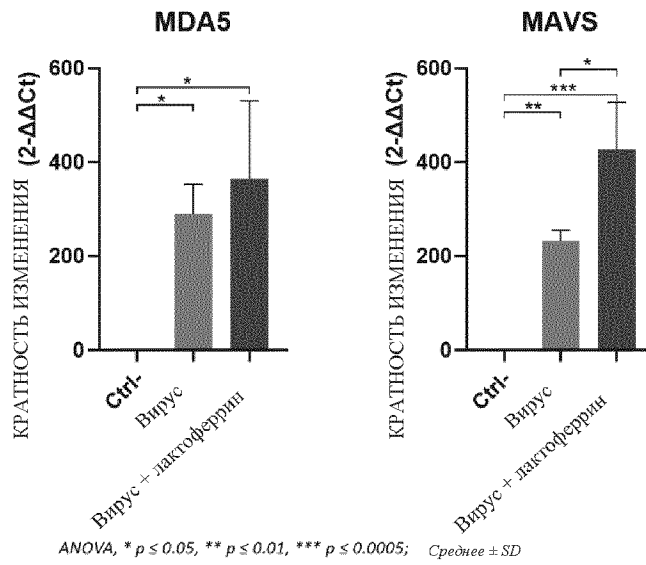
**Фиг. 3Е**



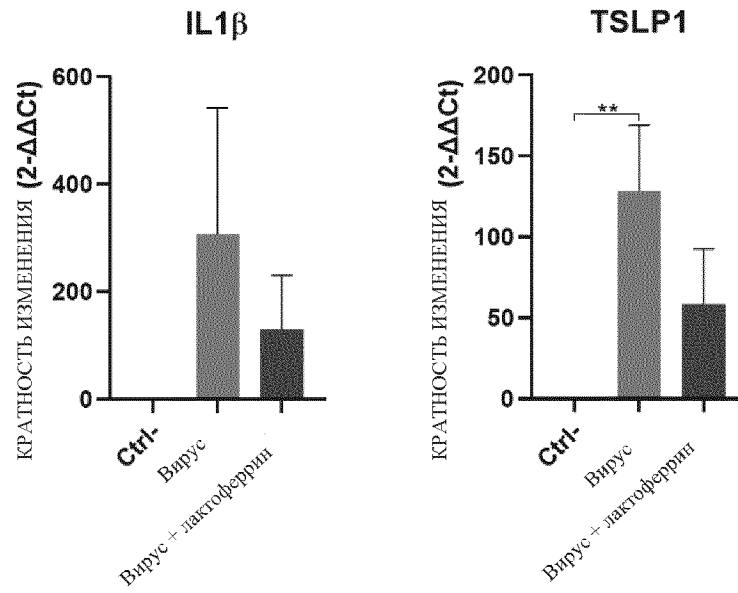


ANOVA, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ ; Среднее  $\pm$  SD

**Фиг. 4А**

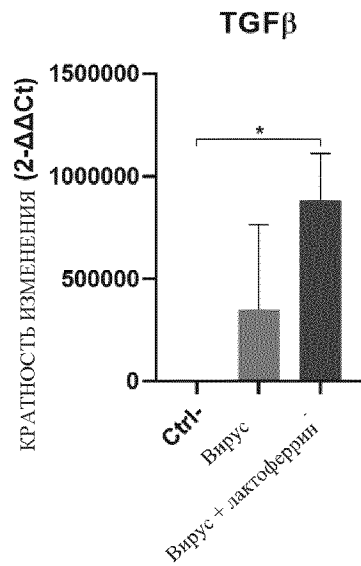


**Фиг. 4В**



ANOVA, \*\*  $p \leq 0.01$ ; Среднее  $\pm$  SD

Фиг. 4С



ANOVA, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ ; Среднее  $\pm$  SD

Фиг. 4D