

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390213** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.06.15

(51) Int. Cl. *A61K 31/731* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.07.09

(54) **ПРОТИВОВИРУСНАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ПО МЕНЬШЕЙ МЕРЕ ОДИН СУЛЬФАТИРОВАННЫЙ ПОЛИСАХАРИД**

(31) **20186334.7**

(32) **2020.07.16**

(33) **EP**

(86) **PST/EP2021/069238**

(87) **WO 2022/013113 2022.01.20**

(71) Заявитель:
МАРИНОМЕД БИОТЕК АГ (AT)

(72) Изобретатель:

**Пришьль-Грассауэр Ева, Грассауэр
Андреас, Морокутти-Курц Мартина,
Граф Филипп (AT)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к сульфатированным полисахаридам для применения в качестве противовирусного активного ингредиента в противовирусно эффективном количестве в фармацевтической композиции или лекарственном средстве для профилактического или терапевтического вмешательства в отношении инфекции SARS-CoV-2 у человека или животного.

A1

202390213

202390213

A1

ПРОТИВОВИРУСНАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ПО МЕНЬШЕЙ МЕРЕ ОДИН СУЛЬФАТИРОВАННЫЙ ПОЛИСАХАРИД

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5

Настоящее изобретение из области биохимии, вирусологии и медицины и относится к сульфатированным полисахаридам и, в частности, к каррагинанам для производства противовирусной фармацевтической композиции или лекарственного средства для профилактического или терапевтического лечения

10 инфекции SARS-CoV-2.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Семейство Coronaviridae включает коронавирусы и торовирусы. Известно, что

15 коронавирусы инфицируют верхние дыхательные пути и желудочно-кишечный тракт у млекопитающих и птиц. Предположительно, коронавирусы вызывают большой процент всех простудных заболеваний у взрослых людей.

В WO2009/027057 описано применение фукоиданов и каррагинанов для

20 профилактического и терапевтического лечения различных респираторных вирусных инфекций, вызванных членами семейств Paramyxoviridae, Orthomyxoviridae, Adenoviridae и/или Coronaviridae. Более конкретно, в WO2009/027057, помимо прочего, описаны результаты эксперимента ингибирования гибели клеток, вызванной коронавирусом, в клетках почек кошек

25 (СК), в котором клетки СК были инфицированы кошачьим коронавирусом FIP, в присутствии или в отсутствие йота-, каппа- или лямбда-каррагинана. В указанном документе дополнительно описано, что все три типа каррагинана (т.е. йота-, каппа- и лямбда-каррагинан) ингибируют клеточную гибель, опосредованную коронавирусом, в клетках СК в наибольшей концентрации 400

30 мкг/мл, и что йота-каррагинан демонстрировал существенное ингибирование даже в концентрации, составляющей лишь 4 мкг/мл, тогда как каппа- и лямбда-каррагинан не были эффективными в такой концентрации. На основании полученных результатов сделан вывод, что ингибирующий эффект каррагинана в отношении проникновения коронавируса в клетки-хозяева обусловлен

35 причинами, отличными от химической или структурной модификации

рецептора(ов), специфического к коронавирусу. Также было обнаружено, что предварительная обработка клеток-хозяев каррагинаном до инфицирования не приводит к существенному улучшению защиты клетки от коронавирусной инфекции. Полученные результаты позволяют предположить, что для

5 достижения существенной защиты от коронавирусной инфекции каррагинановый компонент, действующий как противовирусный агент, должен присутствовать во время инфицирования, т.е. когда должно произойти взаимодействие между вирусом и клеткой-хозяином.

Сульфатированные полисахариды, включая каррагинаны и фукоидан, известны

10 своей противовирусной эффективностью уже несколько десятилетий. В наиболее интересном обзоре, Gonzalez M.E. et al. (1987, Antimicrob. Agents Chemother. 31, 1388-1393), описана противовирусная эффективность различных сульфатированных полисахаридов, включая йота-каррагинан, против некоторых вирусов животных. Йота-каррагинан продемонстрировал противовирусную

15 активность против оболочечных вирусов HSV-1, HSV-2, вируса леса Семлики (SFV), вируса вакцины и вируса африканской лихорадки свиней (ASF), а также против «голового» вируса энцефаломиокардита (EMC). Йота-каррагинан не оказывал эффекта на оболочечные вирусы, вирус везикулярного стоматита (VSV) и вирус кори, а также на «голые» вирусы, полиовирус 1 типа и аденовирус

20 5 типа.

Ввиду различного опыта, а также иногда даже противоречивых результатов, полученных исследователями при попытках противовирусного лечения различных видов вирусов с помощью каррагинана, авторы US 5658893 резюмировали в столбце 2, последний абзац переходит в столбец 3, что

25 *«исходя из различной реакции разных вирусов на сульфатированные полисахариды, понятно, что невозможно с уверенностью предсказать реакцию конкретного вируса на каррагинан без проведения экспериментов. Механизм, посредством которого сульфатированные полисахариды, в частности, каррагинаны, ингибируют вирусную репликацию и*

30 *инфективность, может быть неодинаковым, поскольку различными исследователями представлены противоречивые результаты, полученные при работе с различными вирусами и типами клеток. Специалисту в данной области техники не очевидно, что такое вещество, как сульфатированный полисахарид, являющееся эффективным ингибитором одного вируса, будет*

35 *демонстрировать аналогичную эффективность против другого вируса».*

Эта ситуация не изменилась с годами и до сих пор актуальна.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Сложная пандемическая коронавирусная болезнь 2019 года (COVID-19), распространяющаяся по всему миру, вызвана вирусом, который получил название «коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2» (SARS-CoV-2). Перед проникновением в клетку вирус прикрепляется к поверхности клетки-хозяина. Было обнаружено, что шиповидный белок вируса распознает
10 рецептор ACE2 (рецептор ангиотензин-превращающего фермента 2), расположенный на поверхности пневмоцитов I и II типа, эндотелиальных клеток и реснитчатых клеток бронхиального эпителия, и прикрепляется к нему. Таким образом, весьма вероятно, что лекарственные средства, препятствующие взаимодействию между шиповидным белком SARS-CoV-2 и рецептором ACE2
15 могут обеспечивать защиту от инфицирования указанным видом вируса.

На основании указанного утверждения в соответствующей области техники и, кроме того, с учетом собственных глубоких знаний о характеристиках и противовирусной эффективности каррагинанов, авторы настоящего
20 изобретения предприняли попытку выяснить, можно ли так же эффективно использовать каррагинан для профилактического или терапевтического вмешательства при инфекциях CoV-2 у млекопитающих.

Для достижения поставленной цели была использована подходящая установка
25 для тестирования *in vitro* для заражения эукариотических клеток-мишеней доступным в продаже модифицированным лентивирусом, имитирующим часть внешней поверхности SARS-CoV2 и дополнительно несущим конструкт репортерного гена люциферазы для облегчения аналитического определения уровня инфицирования.

30
Задача настоящего изобретения заключается в обеспечении практически применимой противовирусной композиции или лекарственного средства, содержащего один или более специально выбранных сульфатированных полисахаридов, для профилактического вмешательства в отношении инфекции,

т.е. для снижения риска инфицирования SARS-CoV-2 у млекопитающих, включая людей и животных.

Дополнительная задача настоящего изобретения заключается в обеспечении
5 практически применимой противовирусной композиции или лекарственного средства, содержащего один или более специально выбранных сульфатированных полисахаридов, для терапевтического лечения индивидуумов, инфицированных SARS-CoV-2.

10 В частности, предполагается предоставить практически применимое лекарственное средство для индивидуумов, особенно восприимчивых или подверженных повышенному риску инфицирования SARS-CoV-2, включая пациентов с высоким риском, выбранных из группы, состоящей из пациентов с ХОБЛ, пациентов с астмой, индивидуумов, страдающих от аллергии или с
15 ослабленной иммунной системой, с ослабленной сердечной системой или с ослабленной дыхательной системой, а также пациентов после трансплантации и медицинский персонал, в том числе работников больниц, аптек и врачебных кабинетов и других лиц, которые по роду занятий вступают в прямой контакт с инфицированными или потенциально инфицированными людьми или
20 животными.

ГРАФИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ

На фиг. 1 представлены результаты анализа нейтрализации,
25 демонстрирующие ингибирующую эффективность йота-каррагинана и КМЦ в различных концентрациях в отношении инфицирования клеток ACE2-HEK293 лентивирусом, псевдотипированным шиповидным гликопротеином SARS-CoV-2, несущим репортерный ген люциферазы; ось y = % инфицированных клеток по сравнению с положительным контролем (положительный контроль = 100%; количество
30 инфицированных клеток без обработки каррагинаном или КМЦ); ось x = переменные концентрации йота-каррагинана и КМЦ в мкг/мл; черные столбцы = йота-каррагинан; заштрихованные столбцы = КМЦ.

На фиг. 2 представлены результаты анализа нейтрализации, демонстрирующие ингибирующую эффективность йота-каррагинана и ГПМЦ в различных концентрациях в отношении инфицирования клеток ACE2-HEK293 лентивирусом, псевдотипированным шиповидным гликопротеином SARS-CoV-2, несущим репортерный ген люциферазы; ось y = % инфицированных клеток по сравнению с положительным контролем (положительный контроль = 100%; количество инфицированных клеток без обработки каррагинаном или КМЦ) и отрицательный контроль (=0% инфицирование; псевдозараженные клетки); ось x = переменные концентрации йота-каррагинана и ГПМЦ в мкг/мл; черные столбцы = йота-каррагинан; заштрихованные столбцы = ГПМЦ при 100 мкг/мл.

На фиг. 3 представлены результаты анализа нейтрализации, демонстрирующие ингибирующую эффективность разных сульфатированных полимеров в различных концентрациях в отношении инфицирования клеток ACE2-HEK293 лентивирусом, псевдотипированным шиповидным гликопротеином SARS-CoV-2, несущим репортерный ген люциферазы; ось y = % инфицированных клеток по сравнению с положительным контролем (положительный контроль = 100%; количество инфицированных клеток без обработки каррагинаном или КМЦ); ось x = переменные концентрации полимеров, испытанных в 3 различных концентрациях, т.е. 100 мкг/мл (черные столбцы); 10 мкг/мл (серые столбцы); 1 мкг/мл (заштрихованные столбцы); КМЦ, ГПМЦ и Gal-4-SO4 при 100 мкг/мл.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Термин «противовирусный активный ингредиент» в данном контексте относится к соединению, которое прямо или косвенно эффективно препятствует по меньшей мере одному вирусному действию, выбранному из группы, состоящей из проникновения вируса в эукариотические клетки, репликации вируса в эукариотических клетках, сборки вируса, высвобождения вируса из инфицированных эукариотических клеток, или которое является эффективным в отношении неспецифического ингибирования повышения титра вируса или

неспецифического снижения уровня титра вируса в системе-хозяине эукариот или млекопитающих. Он также относится к соединению, которое предотвращает заражение индивидуума или снижает риск или вероятность заражения индивидуума вирусной инфекцией.

5

Предложенную фармацевтическую композицию можно вводить, в зависимости от обстоятельств, до или после начала вирусной инфекции, т.е. в целях профилактического или терапевтического лечения, или как для профилактического, так и для терапевтического введения.

10

Термины «профилактика», «профилактическое вмешательство» или «профилактическое лечение» в данном контексте относятся к введению предложенной фармацевтической композиции бессимптомному, обычно здоровому индивидууму для уменьшения восприимчивости указанного

15 индивидуума к вирусному инфицированию коронавирусом SARS.

Термин «терапия», «терапевтическое вмешательство» или «терапевтическое лечение» в данном контексте относится к введению предложенной фармацевтической композиции человеку или животному с целью достижения

20 уменьшения тяжести и/или частоты возникновения симптомов, исключения симптомов и/или первопричины, предотвращения возникновения симптомов и/или их первопричины, и/или улучшения или восстановления повреждения, напрямую вызванного или косвенно связанного, например, вследствие вторичного инфицирования, с вирусным инфицированием коронавирусом SARS,

25 особенно SARS-CoV-2.

Известно, что ортомиксо- и парамиксовирусы и некоторые другие вирусы прикрепляются к клетке-хозяину посредством связывания с рецепторами, присутствующими на поверхности клетки-хозяина, указанные рецепторы обычно

30 представляют собой гликопротеины или гликолипиды, содержащие остатки сахара, включая остатки сиаловой кислоты (N-ацетилнейраминовой кислоты) и гепарансульфата.

В проведенных ранее исследованиях *in vitro* авторами настоящего изобретения сделано наблюдение, что воздействие на клетки-хозяева каррагинана, в

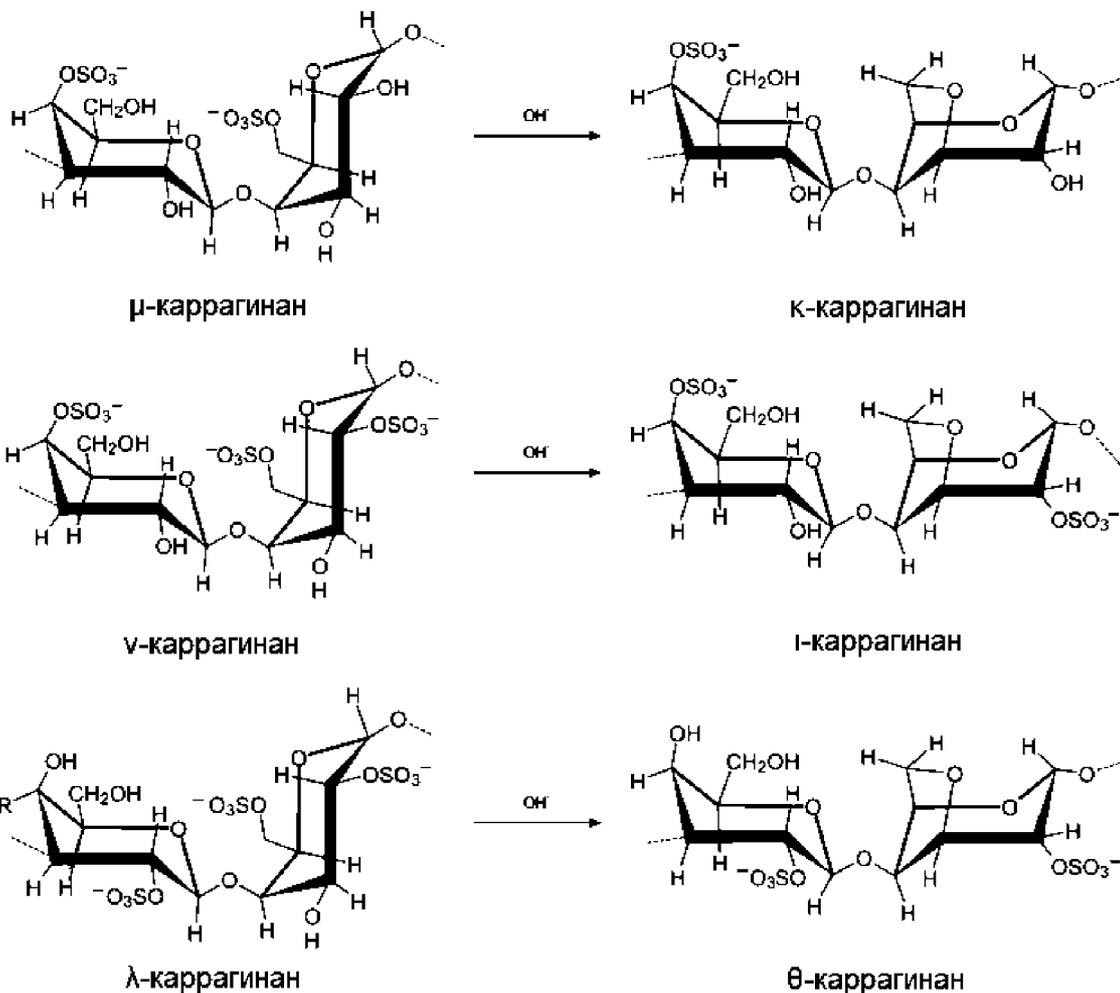
35 частности, йота- и/или каппа-каррагинана, до инфицирования может изменять

структуру клеточной поверхности указанной клетки-хозяина, предположительно вследствие инициации конформационных изменений в трехмерной структуре некоторых рецепторов клеточной поверхности или посредством маскирования и/или модифицирования указанных рецепторов. Кроме того, защитный эффект от коронавирусной инфекции, в том числе инфекции SARS-CoV-2, был достигнут только в присутствии каррагинана. Таким образом, сделан вывод, что в случае коронавируса противовирусный эффект может быть обусловлен прикреплением каррагинанового полимера к вирионам, а не химическим или физическим взаимодействием полимера с рецепторами клетки-хозяина.

10

По-видимому, как только каррагинан поступает в очаг инфекции в противовирусно эффективной концентрации, он покрывает поверхность вируса благодаря довольно беспорядочным электростатическим взаимодействиям, предотвращая связывание вируса со слизистой оболочкой и, как следствие, уменьшая его способность вызывать первичную инфекцию. В случае, если заражение уже произошло, вновь синтезированные вирусные частицы, которые выделяются из клеток, также нейтрализуются каррагинановыми полимерами, что приводит к подавлению распространения вируса. При применении в виде назального спрея или спрея для полости рта, среднее время удерживания йота- , каппа- или лямбда-каррагинана на слизистой оболочке составляет от 1 до 6 часов, обычно от примерно трех до четырех часов.

Каррагинан представляет собой общий термин для линейных сульфатированных полисахаридов на основе галактозы, выделяемых из красных морских водорослей (*Rhodophyceae*). Существует более 10 структурно различных каррагинанов, их природа зависит от рода морских водорослей, из которых они выделены. Тримя основными типами являются йота-, каппа- и лямбда-каррагинан, которые незначительно различаются по своей структуре и степени сульфатирования. Йота-каррагинан представляет собой сульфатированный галактан, образующий мягкий гель, преимущественно экстрагируемый из красных морских водорослей *Eucheuma denticulatum* (син. *Eucheuma spinosum*). Каппа-каррагинан образует прочные, жесткие гели, и его преимущественно получают из *Carpathyphycus alvarezii* (син. *Eucheuma cottonii*). Лямбда-каррагинан, обычно получаемый из тетраспорофитов *Chondrus crispus*, часто используют для загущения молочных продуктов.



Доступные в продаже каррагинаны, используемые согласно настоящему изобретению, обычно представляют собой смеси гибридных или гетерополимерных молекул разной длины цепи и молекулярной массы. Каррагинаны, подходящие для местного нанесения на слизистую оболочку в соответствии с настоящим изобретением, имеют молекулярную массу от примерно 15000 до 5000000 Да (15 кДа - 5 МДа), причем особенно предпочтительны фракции, имеющие среднюю молекулярную массу более 10 50000 Да (50 кДа), и особенно фракции, имеющие среднюю молекулярную массу от 50000 до 3000000 Да (50 кДа - 3 МДа).

Сульфатированные полисахариды каррагинанового типа содержат линейный скелет, состоящий из повторяющихся дисахаридных субъединиц на основе галактозы, дисахаридных субъединиц преимущественно йота- или преимущественно каппа-типа. В случае доступного в продаже каррагинана

лямбда-типа, линейный полимерный скелет дополнительно содержит существенное количество субъединиц лямбда-типа вместе с дисахаридными субъединицами каппа- и/или йота-типа. Каррагинановые гомополимеры, построенные из субъединиц только одного вида йота-, или каппа-, или лямбда-
5 типа, обычно не встречаются в природе. Однако в зависимости от природы выбранного источника красных морских водорослей и способа экстракции каррагинанового содержимого, могут быть получены исходные материалы, имеющие чистоту до 95% субъединиц йота-типа или каппа-типа в полимерном скелете.

10

В контексте настоящего изобретения термин «йота-каррагинан» относится к сульфатированному полисахариду каррагинанового типа, содержащему в своем линейном скелете более 50% мол., обычно более 75% мол. и предпочтительно по меньшей мере 90% мол. повторяющихся дисахаридных субъединиц йота-
15 типа, включая любые количества его предшественника, субъединиц «ню-типа», которые могут одновременно присутствовать в исходном материале йота-каррагинана, при определении методом ¹H-ЯМР спектроскопии или любым другим подходящим аналитическим методом, известным в данной области техники. Остальные повторяющиеся дисахаридные субъединицы, в основном,
20 являются субъединицами каппа-типа. В соответствующей литературе такой тип каррагинана иногда также упоминается как йота/каппа-каррагинан, в отличие от каппа/йота-каррагинана.

Аналогично, в контексте настоящего изобретения термин «каппа-каррагинан»
25 относится к сульфатированному полисахариду каррагинанового типа, содержащему в своем линейном скелете более 50% мол., обычно более 75% мол. и предпочтительно по меньшей мере 90% мол. повторяющихся дисахаридных субъединиц каппа-типа, включая любые количества его предшественника, субъединиц «мю-типа», которые могут одновременно
30 присутствовать в исходном материале каппа-каррагинана, при определении методом ¹H-ЯМР спектроскопии или любым другим подходящим аналитическим методом, известным в данной области техники. Остальные повторяющиеся дисахаридные субъединицы, в основном, являются субъединицами йота-типа. В соответствующей литературе такой тип каррагинана иногда также упоминается
35 как каппа/йота-каррагинан, в отличие от йота/каппа-каррагинана.

Термин «лямбда-каррагинан» относится к сульфатированному полисахариду каррагинанового типа, содержащему в своем линейном скелете по меньшей мере 5% мол., обычно по меньшей мере 10% мол. и предпочтительно по 5
5 меньшей мере 20% мол. дисахаридных повторяющихся субъединиц лямбда-типа, а остальные повторяющиеся дисахаридные субъединицы обычно являются, в основном, субъединицами каппа-типа и/или йота-типа, при определении методом ¹H-ЯМР спектроскопии или любым другим подходящим аналитическим методом, известным в данной области техники.

10

Соответственно, доступный в продаже материал «йота-каррагинан», подходящий для настоящего изобретения, содержит, в основном, гибридные полимеры йота/каппа-типа, тогда как доступный в продаже материал «каппа-каррагинан», подходящий для настоящего изобретения, содержит, в основном, 15 каппа/йота-гибридные полимеры, а доступные в продаже «лямбда-каррагинаны», подходящие для настоящего изобретения, в основном, содержат гибридные полимеры каппа/йота-типа наряду с существенной долей гибридных полимеров каппа/лямбда- и/или каппа/йота/лямбда-, и/или йота/каппа/лямбда-типа. Однако может быть целесообразно очистить доступный в продаже 20 материал лямбда-каррагинана для увеличения доли повторяющихся дисахаридных субъединиц лямбда-типа относительно остальных субъединиц каппа-, йота-, мю- и ню-типа, присутствующих в исходном материале лямбда-каррагинана, и тем самым повысить его противовирусный потенциал и эффективность.

25

Таким образом, «смесь» каррагинанов в контексте настоящего изобретения относится к композиции материалов, содержащей смесь по меньшей мере двух каррагинанов йота-, каппа- и лямбда-типа, определение которых приведено выше, т.е. к смеси по меньшей мере двух из гибридных каррагинанов 30 йота/каппа-, каппа/йота-, каппа/лямбда-, каппа/йота/лямбда- и йота/каппа/лямбда-типа.

Обычно противовирусные фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению по существу не содержат каррагинаны, отличные от каррагинана 35 йота-, каппа-, лямбда-, мю- и ню-типа.

Фукоидан представляет собой другой сульфатированный полисахарид, выделяемый, главным образом, из различных видов бурых морских водорослей, обычно из *Undaria pinnatifida*. Существует два типа фукоиданов

5 фармакологической марки, доступных на рынке, фракция высокомолекулярного фукоидана (ВММФ), имеющая среднюю молекулярную массу от примерно 1000000 до 2000000 Да (например, Kraeber, Германия), и фракция низкомолекулярного фукоидана (НММФ), имеющая среднюю молекулярную массу 8200 Да. F-фукоидан состоит, в основном, из сульфатированных сложных

10 эфиров фукозы, а U-фукоидан содержит примерно 20% глюкуроновой кислоты. Фармацевтическая композиция или лекарственное средство согласно настоящему изобретению, адаптированное для парентерального местного применения, может быть представлено в виде жидкого препарата, выбранного из группы, состоящей из лосьона, водного раствора, включая раствор для

15 ингаляции, спрея или раствора для распыления, жидких капель и раствора для полоскания, или в виде пены или полутвердого препарата, выбранного из группы, состоящей из крема, мази и геля.

Однако фармацевтическая композиция или лекарственное средство согласно

20 настоящему изобретению также может быть адаптировано для перорального введения, например, получено в виде полутвердых или твердых лекарственных форм, таких как таблетки, капсулы, драже, леденцы, жевательные резинки или любые другие пригодные для проглатывания пероральные галеновые формы, причем противовирусный эффект препарата предположительно должен

25 возникать преимущественно в полости рта, в частности, в слюне и слизистых тканях рта.

Если композиция предназначена для местного применения и представляет собой жидкость, пену или полутвердый препарат, то в своей готовой для

30 применения форме она обычно содержит сульфатированный полисахаридный противовирусный активный ингредиент в количестве от 0,01 до 5%, т.е. от 0,1 мг/мл до 50 мг/мл, наиболее предпочтительно от 0,01 до 1% (0,1-10 мг/мл) по массе и обычно от 0,01 до 0,5% (0,1-5 мг/мл) относительно общего объема композиции. Несмотря на то, что в случае использования каррагинанов в

35 качестве противовирусного активного ингредиента верхнее пороговое значение

концентрации каррагинана в основном определяется увеличением вязкости препарата, обусловленным каррагинановым компонентом, решающим фактором для противовирусной эффективности препарата является концентрация сульфатированных полисахаридов в месте действия, т.е. на коже
5 или на ткани слизистой оболочки, или в слюне, которая при местном применении составляет по меньшей мере 10 мкг/мл, или по меньшей мере 100 мкг/мл, или по меньшей мере 400 мкг/мл. Таким образом, принимая во внимание возможность разбавления влагой кожи, слизистых оболочек или слюны, готовые для применения препараты должны содержать активный
10 противовирусный ингредиент в концентрации, немного или существенно превышающей соответствующую терапевтически активную концентрацию IC₉₀, определенную в анализах *in vitro*.

Если композиция получена в виде твердой лекарственной формы, то в своей
15 готовой для применения форме она обычно содержит каррагинан в количестве от 0,01 до 10%, предпочтительно от 0,01 до 5%, наиболее предпочтительно от 0,1 до 2% по массе относительно общей массы композиции. Поскольку масса единичной лекарственной формы твердого препарата (например, таблетки, капсулы, драже, леденцы, жевательной резинки) может варьироваться в
20 широком диапазоне, т.е. обычно от 0,1 до 5 г на единичную лекарственную форму, то особенно предпочтительно обеспечить активный противовирусный ингредиент в количестве от 1 мг до 100 мг на единичную лекарственную форму, или от 2 до 50 мг, или от 5 до 20 мг на единичную лекарственную форму. Такие препараты гарантированно обеспечат достижение эффективной концентрации
25 активного противовирусного ингредиента в месте действия, например, в слюне и тканях слизистой оболочки рта, и обычно существенное превышение значений IC₉₀, т.е. значений концентрации, необходимых для 90% ингибирования вирусного заражения экспериментальных эукариотических клеток в анализе *in vitro*, а также экспериментально определенных минимально эффективных
30 противовирусных концентраций 10 мкг/мл, 100 мкг/мл или 400 мкг/мл.

Несмотря на то, что фармацевтическая композиция или лекарственное средство, полученное в соответствии с настоящим изобретением, содержит сульфатированный полисахаридный компонент в противовирусно эффективном
35 количестве, предпочтительно, что сульфатированный полисахаридный

компонент является единственным противовирусным активным ингредиентом указанной композиции или лекарственного средства.

Для некоторых применений предложенная композиция по существу состоит
5 только из йота-каррагинана, или только из каппа-каррагинана, или только из
лямбда-каррагинана, а для других применений предложенная композиция
может содержать их смеси. В частности, в одном варианте реализации
предложенная композиция может содержать более 50%, предпочтительно
более 70% и, в частности, до 95% (мас./мас.) в пересчете на сухую массу йота-
10 каррагинана относительно общей сухой массы всех каррагинанов,
присутствующих в композиции, а остальные каррагинаны относятся к каппа-
и/или лямбда-типу. В другом варианте реализации предложенная композиция
может содержать более 50%, предпочтительно более 70% и, в частности, до
95% (мас./мас.) в пересчете на сухую массу каппа-каррагинана относительно
15 общей сухой массы всех каррагинанов, присутствующих в композиции, а
остальные каррагинаны относятся к йота- и/или лямбда-типу. В другом
варианте реализации предложенная композиция может содержать более 50%,
предпочтительно более 70% и, в частности, до 95% (мас./мас.) в пересчете на
20 сухую массу лямбда-каррагинана относительно общей сухой массы всех
каррагинанов, присутствующих в композиции, а остальные каррагинаны
относятся к каппа- и/или йота-типу.

Противовирусные композиции каррагинана согласно настоящему изобретению
могут дополнительно содержать по меньшей мере один фармацевтически
25 приемлемый носитель и/или добавку, подходящую и разрешенную для
медицинского применения.

Носителем может быть разбавитель, например, вода, солевой раствор,
необязательно фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), вспомогательное
вещество или другая несущая среда, которая облегчает введение композиции.
30 Если композиция является твердой, полутвердой или жидкой, то группы
носителей и добавок, соответственно, могут включать, но не ограничиваясь
ими, SiO₂, TiO₂, связующее вещество, такое как микрокристаллическая
целлюлоза, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь, желатин, крахмал,
лактоза, моногидрат лактозы, альгиновая кислота или маисовый крахмал;
35 смазывающее вещество или поверхностно-активное вещество, такое как

стеарат магния или лаурилсульфат натрия; скользящее вещество, такое как, например, коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин.

- 5 Дополнительные добавки могут быть выбраны из группы, состоящей из физиологически приемлемых консервантов, фармацевтически приемлемых солей щелочных металлов, таких как хлориды натрия, калия, лития или аммония, буферов или агентов для регулирования pH, таких как лимонная кислота, уксусная кислота, фумаровая кислота, хлористоводородная кислота, 10 яблочная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота, пропионовая кислота, серная кислота и винная кислота, и комбинаций указанных кислот.

Обычно, если в композиции присутствуют фармацевтически приемлемые соли, они представлены в концентрации не более 1,5%, предпочтительно не более 15 1% и обычно не более 0,6% (мас./об.). Концентрации солей более 1,5% ухудшают по меньшей мере противовирусную эффективность каррагинана.

В композициях согласно настоящему изобретению сам каррагинан также может присутствовать в виде соли, предпочтительно натриевой соли. 20

Предпочтительно, предложенные композиции для профилактического или терапевтического медицинского применения представлены в форме стерильных, не содержащих микробов, не содержащих патогенов, апиrogenных и безаллергенных препаратов.

25 Установлено, что каррагинаны нетоксичны при пероральном или дермальном введении или при ингаляции, даже при применении в чрезвычайно высоких дозах. *Íÿüîî Óíðàâéâíèâ ïî ñàíèòòàðííî íàâçíðò çà èà-âñòâîè òèùââüð ïðîâòèèâ è* лекарственных средств (FDA) классифицирует их *èâé «â öâèî ïðèçîâîíâ»* 30 *ââçíîâñîí»* (GRAS).

В объем настоящего изобретения также входит применение сульфатированного полисахаридного компонента, содержащего йота-, каппа- или лямбда-каррагинан, или сульфат целлюлозы, или сульфат декстрана, или любой смеси 35 указанных сульфатированных полисахаридов в качестве противовирусного

агента для производства фармацевтических композиций или лекарственных средств, в которых сульфатированный полисахаридный компонент присутствует в противовирусно эффективном количестве в комбинации с по меньшей мере одним специальным препаратом, обычно используемым для профилактики или
5 терапии инфекционных и/или воспалительных заболеваний, аллергий и/или патологических состояний ослабленной или подавленной иммунной системы.

Однако предпочтительно, что сульфатированный полисахаридный компонент, в частности, каррагинановый, содержащий йота-, каппа- или лямбда-каррагинан,
10 или любую смесь вышеуказанных каррагинанов, является единственным или преобладающим противовирусным активным ингредиентом в композициях для профилактического или терапевтического вмешательства при коронавирусных инфекциях, включая инфекции SARS-CoV-2, согласно настоящему изобретению.

15 Предпочтительным является парентеральное введение фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, в частности, введение в форме назального спрея, спрея для полости рта, жидкого раствора для ингаляций, пены, жидких капель или растворов для полоскания. Назальные спреи и спреи
20 для полости рта, а также пены и растворы для полоскания являются особенно подходящими для профилактики коронавирусной инфекции, а препараты для ингаляции, а также растворы для полоскания, таблетки, капсулы, драже, леденцы и жевательные резинки подходят также для терапевтического лечения инфицированных индивидуумов.

25 Ингаляция препаратов, полученных в соответствии с настоящим изобретением, может существенно облегчать тяжесть респираторных синдромов, вызванных SARS-CoV-2, наблюдаемых у многих пациентов с COVID-19, и особенно у пациентов с высоким риском, т.е. у пациентов, выбранных из группы пациентов
30 с ХОБЛ, пациентов с астмой, индивидуумов, страдающих от аллергии или с ослабленной иммунной системой, с ослабленной сердечной системой или с ослабленной дыхательной системой, а также у пациентов после трансплантации.

Кроме того, предложенные фармацевтические композиции можно наносить, например, распылять, подобно санитайзеру или дезинфицирующему средству, на твердые поверхности, включая руки, пальцы, перчатки, гигиенические платки или салфетки, включая платки или салфетки для носа, для создания по
5 меньшей мере некоторого вирулицидного эффекта, что способствует уменьшению повторного самозаражения индивидуума через зараженные кончики пальцев, а также уменьшению распространения вируса среди различных индивидуумов, находящихся в непосредственной близости, например, бок о бок, друг от друга.

10

Дополнительные изделия, покрываемые, насыщенные или пропитанные фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению, включают ватные палочки, пылезащитные маски или гигиенические или медицинские маски для лица. Даже губные помады могут быть составлены так, чтобы они
15 содержали противовирусно эффективное количество предложенной фармацевтической композиции, содержащей одно или более сульфатированных полисахаридных соединений согласно настоящему изобретению. Такие гигиенические или санитарные изделия могут быть использованы профилактически или для терапевтического лечения
20 коронавирусной инфекции и могут способствовать предотвращению или снижению риска заражения.

В данной области техники известно, что прикрепление и проникновение SARS-CoV-2 опосредовано шиповидным гликопротеином (SGP). Помимо его
25 взаимодействия со своим рецептором, т.е. человеческим ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2), установлено, что шиповидный гликопротеин также связывается с гликозаминогликанами, такими как гепарансульфат, который находится на поверхности почти всех клеток млекопитающих.

30

Для дополнительного пояснения настоящего изобретения далее представлены следующие примеры. Они подтверждают, среди прочего, мощный ингибирующий эффект каррагинановых полимеров в отношении инфицирования
35 клеток млекопитающих, несущих рецептор ACE2, в анализе с использованием лентивируса, псевдотипированного шиповидным белком SARS-CoV-2.

На основании мощного ингибирующего действия сульфатированных полисахаридных полимеров на инфекцию можно сделать вывод, что вмешательство полимеров в SGP-управляемое проникновение псевдотипированного лентивируса в клетки-мишени млекопитающих опосредовано как отрицательными зарядами полимеров на основе сульфатированной галактозы, так и определенными структурными взаимосвязями между полимерами, с одной стороны, и рецептором ACE2 клетки-мишени и/или шиповидным гликопротеином вируса, с другой стороны.

10

ПРИМЕР 1: Ингибирующий эффект йота-каррагинана в отношении инфицирования SARS-CoV2

Ингибирующий эффект йота-каррагинана в отношении инфицирования SARS-CoV2 определяли в *in vitro* анализе нейтрализации на основе доступного в продаже набора для анализа с использованием лентивируса, псевдотипированного шиповидным белком SARS-CoV-2 (BPS Bioscience, Inc., кат. № 79942; URL: <https://bpsbioscience.com/spike-sars-cov-2-pseudotyped-lentivirus-luc-reporter-79942>). Использование модифицированной лентивирусной системы обеспечивает возможность измерения активности противовирусных агентов в отношении ингибирования трансдукции SARS-CoV-2 в условиях биобезопасности 2 уровня.

В соответствии со спецификацией производителя, лентивирус, псевдотипированный шиповидным белком SARS-CoV-2, содержит шиповидный белок SARS-CoV-2 (Genbank, номер доступа QHD43416.1) в качестве оболочечных гликопротеинов. Кроме того, указанные псевдовирсоны также содержат ген люциферазы светлячков, управляемый промотором CMV. Таким образом, проникновение в клетку, опосредованное шиповидным белком (= трансдукция, эквивалентная инфицированию), может быть измерено через активность репортера люциферазы.

Дизайн эксперимента:

Использовали инкубационную среду по рекомендациям производителя набора для анализа, т.е. питательную среду MEM для HEK293 с 10%FBS, 0,1 мМ

заменяемых аминокислот, 1 мМ пирувата натрия. В качестве источника йота-каррагинана использовали доступный в продаже Gelcarin® PH379. Его состав определяли методом ¹H-ЯМР спектроскопии, и содержание субъединиц йота+ню-типа составило 96,9% мол., а содержание субъединиц каппа-типа

5 составило 3,1% мол.

В 96-луночном планшете осуществляли инфицирование приблизительно 7500 клеток ACE2-HEK293 на лунку, используя 5 мкл на лунку смеси лентивируса, псевдотипированного шиповидным белком SARS-CoV-2 (репортера люциферазы), и йота-каррагинанового полимера или

10 карбоксиметилцеллюлозного (КМЦ) полимера в различных концентрациях полимеров. Вирус инкубировали либо только с буфером (контрольные образцы), либо с буфером, содержащим различные концентрации йота-каррагинана или карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), в течение 40 минут до

15 инфицирования, т.е. используя 400, 133, 40, 13, 4 и 1,3 мкг/мл йота-каррагинана и 400, 40 и 4 мкг/мл КМЦ. Через 24 часа после инфицирования меняли среду на свежую питательную среду для HEK. Через 48 часов после инфицирования лизировали клетки в циклах замораживания/размораживания, затем добавляли в лунки люциферазный реагент для измерения активности люциферазы. Степень инфицирования или эффективность инфицирования, определенная

20 посредством измерения активности люциферазы, показывает процент инфицированных клеток в присутствии противовирусного защитного каррагинанового компонента и, следовательно, защитную эффективность каррагинанового компонента против инфицирования SARS-CoV-2.

25 Результаты представлены на фиг. 1, где максимальная активность люциферазы, определенная на клетках, инфицированных вирусом в отсутствие защитного каррагинанового компонента (псевдозаражение), принята за 100% (=положительный контроль), а активность люциферазы, определенная на незараженных клетках, принята за 0% (=отрицательный контроль).

30 Ингибирование инфицирования йота-каррагинаном (черные столбцы) сравнивали с соответствующей активностью карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ, заштрихованные столбцы). Данные для люциферазы были скорректированы с учетом метаболической активности, определенной с помощью аламарового синего с использованием параллельного планшета с идентичным составом.

35 Различные концентрации полимеров указаны по оси x, а скорректированные

значения активности люциферазы, указывающие процент инфицированных клеток ACE2-HEK293, представлены по оси у. Данные отражают средние значения для двух параллельных анализов.

- 5 На основании фиг. 1 можно сделать вывод, что КМЦ не оказывает ингибирующего действия против инфицирования в концентрациях 400 и 40 мкг/мл и имеет слабый ингибирующий эффект лишь при 4 мкг/мл. В то же время йота-каррагинан был весьма эффективен в наибольшей концентрации 400 мкг/мл, обеспечивая уменьшение инфицирования более чем на 90% по сравнению с незащищенным положительным контролем, при этом в концентрациях 133, 40 и 13 мкг/мл йота-каррагинан все еще обеспечивал выраженный ингибирующий эффект, составляющий приблизительно 80% относительно незащищенного положительного контроля. Лишь в наименьших концентрациях 4 и 1,3 мкг/мл ингибирующая эффективность йота-каррагинана против инфицирования, по-видимому, до некоторой степени ослабевала, даже несмотря на то, что при указанных концентрациях йота-каррагинан все еще был способен поддерживать количество инфицированных клеток примерно на 30% ниже уровня незащищенного положительного контроля.
- 20 Таким образом, по всей видимости, йота-каррагинан можно использовать в качестве подходящего агента для производства фармацевтической композиции или лекарственного средства для профилактического или терапевтического лечения млекопитающих, в частности, людей, подверженных риску или страдающих от коронавирусной инфекции и, в частности, от инфекции SARS CoV2.

ПРИМЕР 2: Защитная эффективность йота-каррагинана против SARS-CoV-2 в различных концентрациях

- 30 Повторяли экспериментальную модель из примера 1 со следующими модификациями:
7000 клеток HEK293, экспрессирующих рецептор ACE-2, инфицировали с помощью 750 инфекционных частиц SARS-CoV-2-псевдотипированного лентивируса, экспрессирующего люциферазу. Вирус инкубировали либо только с буфером (контрольные образцы), либо с буфером, содержащим различные

количества йота-каррагинана или гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ), в течение 30 минут до инфицирования, т.е. используя 100, 33, 10, 3,3, 1 и 0,33 мкг/мл йота-каррагинана и 100 мкг/мл ГПМЦ (фиг. 2, ось x). Через 24 часа после инфицирования меняли среду на свежую питательную среду. Через 48 часов

5 после инфицирования лизировали клетки в циклах замораживания/размораживания, добавляли люциферазный реагент и определяли активность фермента люциферазы, и оценивали относительно положительного и отрицательного контрольных образцов.

10 На фиг. 2 полученные значения степени инфицирования (ось y) скорректированы с учетом метаболической активности, определенной с помощью аламарового синего на таком же планшете. Псевдозараженные клетки принимали за 0%, а псевдообработанные инфицированные клетки принимали за 100%. Столбцы диаграмм представляют средние значения для трех

15 параллельных анализов с указанием стандартного отклонения.

На основании фиг. 2 можно сделать вывод, что йота-каррагинан обладает высоким защитным действием в диапазоне концентраций *in situ* от 10 мкг/мл до 100 мкг/мл, а при очень низких концентрациях, составляющих 1 мкг/мл или

20 менее, ингибирующая/защитная эффективность против инфекции SARS-CoV-2, по-видимому, ослабевает. Таким образом, существует выраженная дозозависимая эффективность йота-каррагинана.

ГПМЦ, использованная в одной концентрации 100 мкг/мл, оказывает лишь

25 слабый эффект ингибирования инфицирования.

ПРИМЕР 3: Сравнение защитной эффективности различных отрицательно заряженных полимеров против инфицирования SARS-CoV-2

30

Повторяли экспериментальную модель из примера 2 со следующими модификациями:

Помимо йота-каррагинана, в экспериментальную модуль включали также каппа-каррагинан, очищенный лямбда-каррагинан, высокомолекулярный фукоидан

35 (ВММ), сульфат целлюлозы, гепарансульфат и сульфат декстрана, каждый в 3

различных концентрациях, т.е. 100 мкг/мл, 10 мкг/мл и 1 мкг/мл. Каппа-каррагинан получали из доступного в продаже Gelcarin® PH911 (определение субъединиц методом 1H-ЯМР: 83,6% мол. каппа-типа, 16,4% мол. ню-йота-типа); лямбда-каррагинан получали из доступного в продаже Viscarin® PH109 (определение субъединиц методом 1H-ЯМР: 41,8% мол. каппа-типа + 0,7% мол. ню-типа, 27,3% мол. йота-типа + 10,6% мол. ню-типа, 19,6% мол. лямбда-типа). В целях представленного экспериментального применения лямбда-каррагинановый материал (Viscarin® PH109) дополнительно очищали так, чтобы он содержал по меньшей мере примерно 30%, обычно примерно 45-55% мол. субъединиц лямбда-типа относительно субъединиц каррагинана всех типов в экспериментальном лямбда-каррагинановом материале.

Результаты представлены на фиг. 3.

15 Кроме того, для лучшего понимания вышеописанного защитного действия полимеров, в таких же экспериментальных условиях проводили испытание дополнительных полимерных агентов, т.е. карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), гидроксипропилметилцеллюлозы (ГМПЦ) и галактоза-4-сульфата (Gal-4-SO₄), каждый из указанных полимеров в концентрации 100 мкг/мл.

20

Неожиданно было обнаружено, что в то время как каррагинаны, а также сульфат целлюлозы и сульфат декстрана проявляют высокую защитную эффективность по меньшей мере в наибольших концентрациях, особенно в диапазоне от 10 мкг/мл до 100 мкг/мл, фукоидан, по-видимому, обладает лишь слабой защитной активностью, а гепарансульфат вообще не оказывает никакого защитного действия.

Таким же образом, сравнительные полимеры КМЦ, ГМПЦ и Gal-4-SO₄ лишь слабо эффективны для защиты клеток-мишеней млекопитающих от инфицирования модифицированным лентивирусом, имитирующим SARS-CoV-2.

Наилучшие результаты достигнуты при использовании йота- и очищенного лямбда-каррагинана, а также сульфата целлюлозы и сульфата декстрана. В связи с этим следует отметить, что в предыдущих исследованиях противовирусной эффективности лямбда-каррагинана было обнаружено, что

этот полимер имеет лишь слабую противовирусную эффективность, если вообще имеет. Самые последние данные, полученные авторами настоящего изобретения, показывают, что такое отсутствие противовирусной активности лямбда-каррагинана могло быть связано с качеством имеющегося в продаже лямбда-каррагинана, который действительно содержит очень небольшое количество, т.е. лишь до примерно 5-10% по массе лямбда-каррагинана. Большая часть материала, продаваемого как «лямбда-каррагинан», представляет собой другие полимеры. Поэтому лямбда-каррагинановый материал, использованный в примерах, был специально очищен так, чтобы он содержал по меньшей мере 30% мол., предпочтительно примерно 45-55% мол. субъединиц лямбда-типа относительно общего количества повторяющихся субъединиц дисахарида каррагинанового типа, присутствующих в экспериментальном исходном лямбда-каррагинановом материале.

В качестве примечания можно упомянуть, что ферментативная обработка лямбда-каррагинанового материала Viscarin® PH109 каппа-каррагиназой и последующее 1H-ЯМР-спектроскопическое определение распределения дисахаридных субъединиц каррагинанового типа, по-видимому, подтверждает, что большинство субъединиц лямбда-типа связано с субъединицами каппа-типа с образованием лямбда/каппа или каппа/лямбда-полимерных цепей, и лишь в незначительной степени с субъединицами йота-типа с образованием полимерных цепей лямбда/йота или йота/лямбда, или каппа/йота/лямбда, или лямбда/каппа/йота-типа.

ПРИМЕР 4: Противовирусная эффективность леденцов, содержащих йота-каррагинан

В одноцентровое открытое проспективное клиническое исследование был включен 31 здоровый субъект для рассасывания леденцов, содержащих йота-каррагинан. Для анализа эффективности *ex vivo* использовали образцы слюны, полученные от 27 субъектов. Основная цель состояла в том, чтобы оценить, превышала ли средняя концентрация йота-каррагинана в образцах слюны 5 мкг/мл, которая, как известно, снижает репликацию риновируса человека (hRV) подтипов 1a и 8 на 90% (IC90). Концентрацию йота-каррагинана в образцах слюны анализировали с помощью УФ-видимой спектроскопии.

Противовирусную эффективность отдельных образцов слюны определяли *in vitro* против панели респираторных вирусов, включая hRV1a, hRV8, коронавирус человека OC43, вирус гриппа А H1N109pdm, вирус Коксаки А10, вирус парагриппа 3 и SARS-CoV-2, с использованием стандартных вирусологических 5 анализов.

В исследование были включены 27 мужчин и небеременных женщин, удовлетворяющих критериям включения, без признаков острой респираторной инфекции. Женщины составляли 2/3 обследуемых, мужчины – 1/3. Медианный 10 возраст составил 52,5 (\pm 13,7) года, а средний индекс массы тела составил 27,06 (\pm 5,9) кг/м².

Испытуемые должны были собирать нативную слюну перед рассасыванием одного леденца с содержанием йота-каррагинана 10 мг. Во время рассасывания 15 леденца испытуемые сдавали слюну, а не глотали ее. Когда объем собранной слюны достигал примерно 5 мл, рассасывание прекращали и хранили образцы при -20 °С.

Образцы нативной слюны участников объединяли, а образцы слюны, 20 обработанной каррагинаном, анализировали по отдельности. Все образцы разбавляли 1:2 дистиллированной водой, стерилизовали нагреванием и делили на аликвоты. Одну аликвоту использовали для определения концентрации каррагинана, а остальные аликвоты использовали для анализов противовирусной активности.

25 Концентрацию йота-каррагинана в образцах, инактивированных нагреванием, определяли методом УФ/видимого обнаружения после образования комплекса с метиленовым синим (МВ). Вкратце, метиленовый синий взаимодействует с йота-каррагинаном при низких концентрациях с образованием 30 водорастворимого метахромового комплекса. В результате комплексообразования краситель меняет цвет с синего (максимумы поглощения при 610 и 666 нм) на фиолетовый с максимальной длиной волны поглощения 559 нм. Значения поглощения при указанных длинах волн пропорциональны концентрации йота-каррагинана. Кроме того, соответствующим образом 35 тестировали объединенные нативные образцы. Измеренные концентрации

йота-каррагинана в образцах с исследуемым препаратом корректировали с учетом сигнала нативных образцов (с поправкой на исходный уровень).

Противовирусная активность / анализ ингибирования репликации SARS-CoV-2:

- 5 Для определения противовирусной активности клетки Vero B4 выдерживали в среде Игла в модификации Дульбекко, содержащей 10% (об./об.) инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.
В 24-луночном планшете повторно суспендировали $4,8 \times 10^6$ клеток Vero B4 в 3,6
- 10 мл среды и инфицировали в среде DMEM без FCS с MOI 0,02 полевого изолята SARS-CoV-2PR-1 в течение 1 часа при 37 °C при умеренной скорости вращения. Затем удаляли инокулум. После промывания PBS повторно суспендировали клетки в таком количестве среды, которое необходимо для посева 2×10^5 клеток на лунку. Инфицированные клетки высевали в 24-луночные планшеты и
- 15 инкубировали со слюной, обработанной каррагинаном, при 15, 10, 5 и 2,5 мкг/мл йота-каррагинана. Через 72 часа после инфицирования собирали надосадочные растворы, инкубировали в течение 10 минут при 95 °C и анализировали методом кПЦР с обратной транскрипцией.
- 20 Йота-каррагинан приобретали у компании Dupont (ранее FMC Biopolymers, Филадельфия, штат Пенсильвания). Сухие порошки полимера растворяли в воде для клеточной культуры до конечной концентрации йота-каррагинана 2,4 мг/мл с содержанием 0,5% NaCl. Полученный маточный раствор стерильно отфильтровывали через 0,22 мм фильтр и хранили при 4 °C до использования.
- 25 Йота-каррагинан использовали во всех анализах в качестве эталона. Качество йота-каррагинана анализировали методом 1H-ЯМР, который подтвердил содержание дисахаридных повторяющихся субъединиц йота-типа 92,5% мол. и незначительное количество субъединиц каппа- и ню-типа.
- 30 Средняя концентрация йота-каррагинана в клинических образцах слюны составляла 667,8 мкг/мл, что превышает концентрации IC₉₀/MIC для всех испытанных вирусов примерно в 60-30000 раз. Это указывает на то, что при рассасывании леденца, содержащего йота-каррагинан, в слюну высвобождается гораздо больше йота-каррагинана, чем необходимо для

нейтрализации или инактивации наиболее распространенных респираторных вирусов и даже SARS-CoV-2.

Более конкретно, средняя концентрация йота-типа, присутствующего в 5 образцах слюны, превышала концентрацию, необходимую для ингибирования 90% вирусных репликаций SARS-CoV-2, в 120,5 раза ($p < 0,001$). Репликационно-компетентный SARS-CoV-2 был эффективно нейтрализован при инкубации со слюной, обработанной йота-каррагинаном.

10 Полученные данные подкрепляют и подтверждают результаты, описанные в примерах 1–3 для лентивируса, псевдотипированного шиповидным белком SARS-CoV-2, которые подтвердили, что йота-каррагинан ингибирует проникновение в клетки лентивируса, псевдотипированного шиповидным белком SARS-CoV-2, и репликацию SARS-CoV-2 с $IC_{50} < 2,6$ мкг/мл йота-
15 каррагинана.

Кроме того, было обнаружено, что среднее время удерживания каррагинанов в слизистой оболочке носа или полости рта составляет от 1 до 6 часов и обычно от 3 до 4 часов, тогда как полная нейтрализация вирусов сульфатированными
20 полисахаридами согласно настоящему изобретению обычно происходила в течение 20 минут.

Таблица 1: Противовирусная эффективность образцов слюны против различных вирусов. IC_{90} и MIC в (мкг/мл).

	HRV1a (IC_{90})	HRV8 (IC_{90})	hCoV OC43 (MIC)	IV A H1N1n (MIC)	Вирус Коксаки A10 (IC_{90})	PIV3 (MIC)	SARS- CoV-2 (IC_{90})
Средняя IC_{90}/MIC	9,5	2,38	0,025	0,66	14,79	0,07	7,46
Ст. откл.	3,71	3,00	0,012	0,25	11,02	0,01	4,72
Минимальная	4,76	0,69	0,007	0,24	5,97	0,02	1,47
Нижняя квартиль	6,79	1,17	0,024	0,52	8,13	0,07	4,75

Медианна	8,98	1,36	0,024	0,80	8,74	0,07	5,49
Верхняя	11,22	2,44	0,024	0,80	21,32	0,07	9,89
Максимальная	18,9	16,57	0,081	0,80	49,19	0,07	22,56

Примечание: Соответствующие вирусы инкубировали с серией разведений обработанных образцов слюны до инфицирования чувствительной клеточной линии. (N=27).

Сокращения: IV, вирус гриппа; MIC, минимальная ингибирующая концентрация; IC90, 90% от максимальной ингибирующей концентрации; ст. откл., стандартное отклонение; N, размер популяции.

Таблица 2: Среднее различие/показатели избытка концентрации йота-каррагинана в обработанной слюне относительно IC90/MIC (CI 95%)

Испытанный вирус	Среднее различие (мкг/мл)	Средний x-кратный избыток	p-значение
HRV1A	658,20 (571,7; 744,7)	81,8 (64,9; 98,6)	<0,001
HRV8	665,42 (578,68; 752,16)	463,2 (353,8; 572,6)	<0,001
hCoV OC43	667,77 (581,49; 754,06)	30350,9 (22909,8; 37792,0)	<0,001
IV A H1N1n	667,14 (580,87; 753,42)	1323,6 (964,5; 1682,7)	<0,001
Коксаки A10	653,01 (568,07; 737,95)	60,0 (47,4; 72,6)	<0,001
PIV3	667,7 (581,4; 754,0)	10154,0 (8563,0; 11746,0)	<0,001
SARS-CoV-2	660,3 (573,9; 746,8)	120,5 (93,2; 147,8)	<0,001

10 Примечание: Концентрации каррагинана в образцах слюны сравнивали с концентрациями, необходимыми для ингибирования по меньшей мере 90% связывания/репликации вируса (IC90, MIC). p-Значения парных t-критериев указывают на статистическую значимость различий.

Сокращения: CI, доверительный интервал; CIL, нижний доверительный интервал; CIU, верхний доверительный интервал; IV, вирус гриппа.

Выводы:

При рассасывании леденца, содержащего йота-каррагинан, высвобождается достаточное количество йота-каррагинана для нейтрализации и инактивации наиболее распространенных респираторных вирусов, а также пандемического

SARS-CoV-2. Таким образом, леденцы являются подходящей мерой для снижения вирусной нагрузки в очаге инфекции.

Формула изобретения

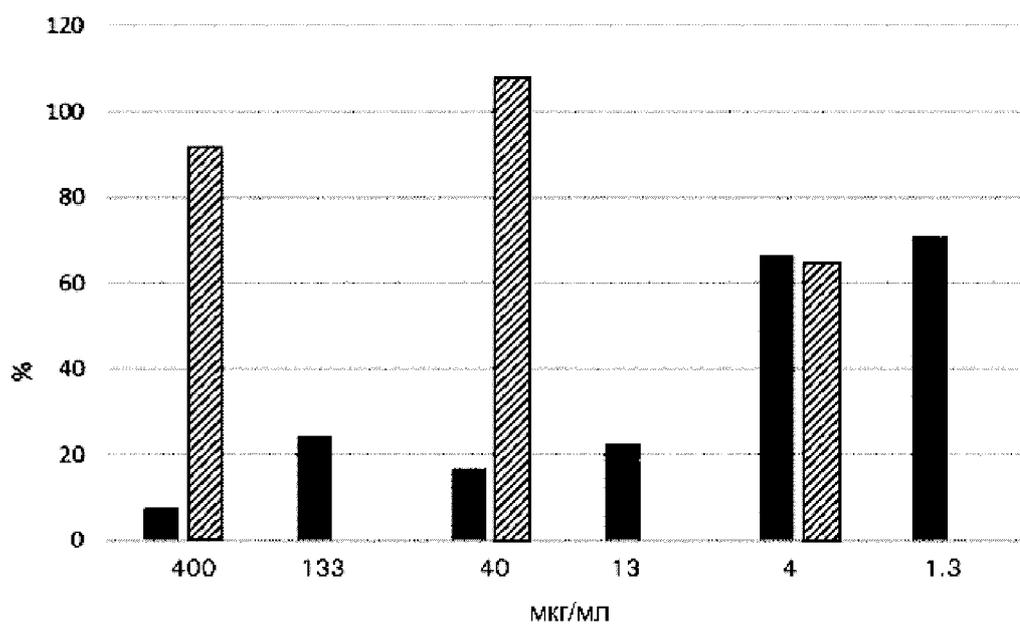
1. Сульфатированный полисахарид, выбранный из группы, состоящей из йота-каррагинана, каппа-каррагинана, лямбда-каррагинана, сульфата целлюлозы и сульфата декстрана, для применения в качестве противовирусного активного ингредиента в фармацевтической композиции или лекарственном средстве для профилактического или терапевтического применения против инфекции SARS-CoV-2 у млекопитающего, в частности, у человека, при этом
- 5
- 10 а) указанная композиция представлена в форме жидкости, пены или полутвердого препарата, и противовирусный активный ингредиент присутствует в нем в концентрации по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 100 мкг/мл или по меньшей мере 400 мкг/мл; или иначе
- 15 б) указанная композиция представлена в виде твердой лекарственной формы, и противовирусный активный агент присутствует в ней в количестве по меньшей мере 0,5 мг, по меньшей мере 2 мг, по меньшей мере 5 мг, по меньшей мере 10 мг или по меньшей мере 20 мг на единичную дозу.
- 20 2. Сульфатированный полисахарид по п. 1, отличающийся тем, что противовирусный активный ингредиент содержит по меньшей мере один, необязательно смесь по меньшей мере двух указанных сульфатированных полисахаридов.
- 25 3. Сульфатированный полисахарид по п. 1 или 2, отличающийся тем, что
- указанная жидкая или полутвердая композиция выбрана из группы, состоящей из лосьона для кожи, водного раствора для дезинфекции, водного раствора для ингаляции, спрея или раствора для распыления, жидких капель и раствора для полоскания;
- 30 - указанная полутвердая композиция выбрана из группы, состоящей из геля, крема и мази; и
- указанная твердая лекарственная форма выбрана из группы, состоящей из таблетки, леденца, драже, капсулы и жевательной резинки.

4. Фармацевтическая композиция или лекарственное средство, содержащее по меньшей мере один сульфатированный полисахарид, выбранный из группы, состоящей из йота-каррагинана, каппа-каррагинана, лямбда-каррагинана, сульфата целлюлозы и сульфата декстрана, в качестве противовирусного
- 5 активного ингредиента, для применения для профилактического или терапевтического использования против инфекции SARS-CoV-2 у человека или животного, при этом
- а) указанная композиция или лекарственное средство представлено в форме жидкости, пены или полутвердого препарата, и противовирусный активный
- 10 ингредиент присутствует в нем в концентрации по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 100 мкг/мл или по меньшей мере 400 мкг/мл; или иначе
- б) указанная композиция или лекарственное средство представлено в виде твердой лекарственной формы, и сульфатированный полимер присутствует
- 15 в ней в противовирусно эффективном количестве, составляющем по меньшей мере 0,5 мг, по меньшей мере 2 мг, по меньшей мере 5 мг, по меньшей мере 10 мг или по меньшей мере 20 мг на единичную дозу.
5. Фармацевтическая композиция или лекарственное средство по п. 4,
- 20 отличающиеся тем, что
- указанная жидкая или полутвердая композиция выбрана из группы, состоящей из лосьона для кожи, водного раствора для дезинфекции, водного раствора для ингаляции, спрея или раствора для распыления, жидких капель и раствора для полоскания;
- 25 при этом указанная полутвердая композиция выбрана из группы, состоящей из геля, крема и мази; и
- причем указанная твердая лекарственная форма выбрана из группы, состоящей из таблетки, леденца, драже, капсулы и жевательной резинки.
- 30 6. Фармацевтическая композиция или лекарственное средство по п. 4 или 5, содержащее каррагинановый компонент в противовирусно эффективном количестве, причем указанный каррагинановый компонент представляет собой либо йота-, каппа- или лямбда-каррагинан, либо смесь по меньшей мере двух из йота-, каппа- и лямбда-каррагинанов.

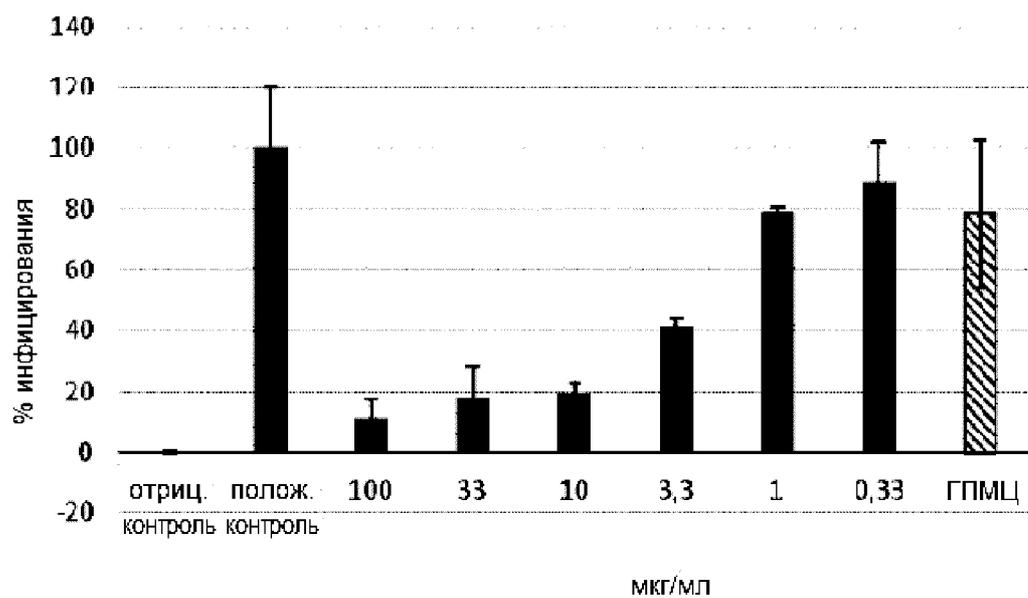
35

7. Фармацевтическая композиция или лекарственное средство по любому из пп. 4-6, отличающиеся тем, что лямбда-каррагинан очищен так, что содержит по меньшей мере 30% мол., предпочтительно от 45 до 55% мол. повторяющихся дисахаридных субъединиц лямбда-типа относительно общего количества повторяющихся дисахаридных субъединиц йота-, каппа-, лямбда-, мю- и ню-типа, присутствующих в лямбда-каррагинановом материале.
8. Фармацевтическая композиция или лекарственное средство по любому из пп. 4-7, отличающиеся тем, что указанная композиция или лекарственное средство содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель и/или добавку, указанная добавка предпочтительно выбрана из хлорида натрия и калия и присутствует в композиции в количестве 1,5% мас. или менее, или 1,0% мас. или менее, или 0,6% или менее.
9. Фармацевтическая композиция или лекарственное средство по любому из пп. 4-8, отличающиеся тем, что указанная композиция в жидкой форме соединена с твердой поверхностью гигиенического или санитарного изделия посредством нанесения в качестве покрытия или пропитки.
10. Фармацевтическая композиция или лекарственное средство по п. 9, отличающиеся тем, что указанное гигиеническое или санитарное изделие выбрано из группы, состоящей из гигиенических или санитарных перчаток, гигиенического платка или салфетки, ватной палочки, пылезащитной маски, гигиенической маски для лица и медицинской маски для лица.
11. Фармацевтическая композиция или лекарственное средство по п. 4, отличающиеся тем, что указанный человек представляет собой пациента, подверженного высокому риску, выбранного из группы, состоящей из пациента с ХОБЛ, пациента с астмой, человека с аллергией, человека с ослабленной иммунной, сердечной или дыхательной системой, пациента после трансплантации, или указанный человек является членом медицинского персонала в больницах, аптеках и врачебных кабинета, или человеком, который по роду занятий вступает в прямой контакт с инфицированными или потенциально инфицированными людьми или животными.

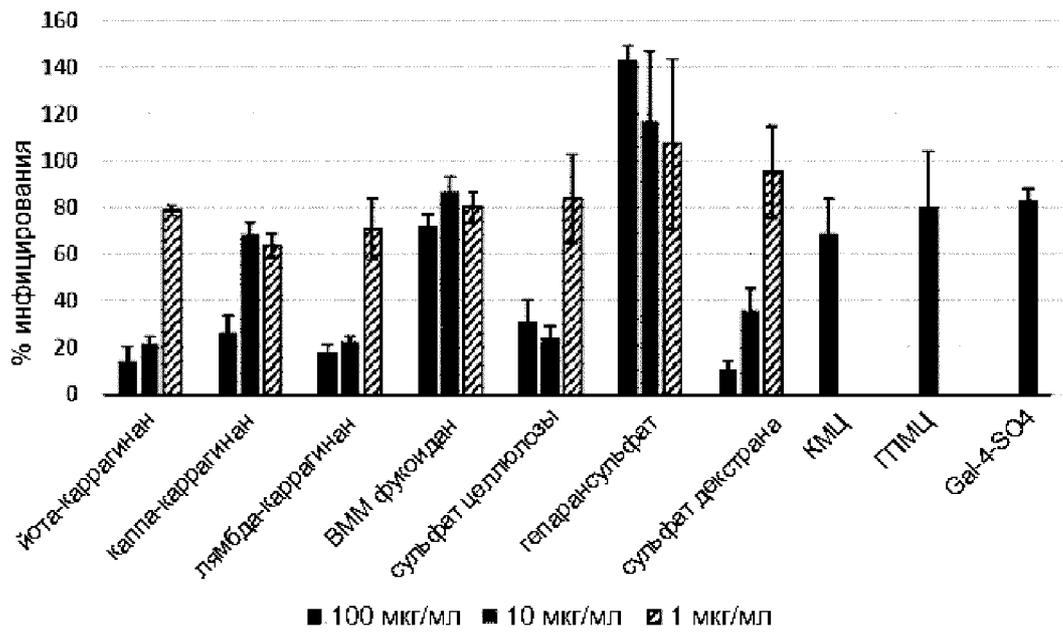
35



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3