

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391551** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.08.15**

(51) Int. Cl. *A61K 31/728* (2006.01)  
*A61K 31/737* (2006.01)  
*A61P 31/14* (2006.01)  
*A61K 9/12* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2021.12.22**

---

(54) **ПРОТИВОВИРУСНЫЕ АГЕНТЫ ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ ПАТОЛОГИЙ, ВЫЗВАННЫХ АЛЬФА- И/ИЛИ БЕТА-КОРОНАВИРУСАМИ**

---

(31) **10202000032243**

(32) **2020.12.23**

(33) **IT**

(86) **PCT/IB2021/062161**

(87) **WO 2022/137147 2022.06.30**

(71) Заявитель:  
**ФИДИА ФАРМАЧЕУТИЧИ С.П.А.**  
**(IT)**

(72) Изобретатель:

**Пиццокарро Карло (IT)**

(74) Представитель:

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

---

(57) Описаны сложноэфирные и сульфатированные производные гиалуроновой кислоты для применения в предупреждении и лечении начальной стадии заболевания SARS-CoV-2.

**A1**

**202391551**

**202391551**

**A1**

## **ПРОТИВОВИРУСНЫЕ АГЕНТЫ ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ ПАТОЛОГИЙ, ВЫЗВАННЫХ АЛЬФА- И/ИЛИ БЕТА-КОРОНАВИРУСАМИ**

### ЦЕЛИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к новым противовирусным агентам.

В начале января 2020 г. мировые органы здравоохранения идентифицировали вирус, ответственный за вспыхнувшую в Ухане (Китай) эпидемию, которая далее (в марте 2020 г.) переросла в пандемию: этот вирус представлял собой бета-коронавирус, названный SARS-CoV-2 и являющийся частью семейства *Coronaviridae* (содержащий одноцепочечную РНК вирус). Этот вирус имеет характерную для коронавирусов типичную внешнюю «корону», состоящую из спайковых гликопротеинов, гликопротеиновую систему, которая представляет ключевой элемент, обеспечивающий проникновение вируса в клетку-хозяина: для этой цели вирус использует два мембранных рецептора хозяина, первый из которых представляет собой гепарансульфатный протеогликан, низкоаффинный рецептор, необходимый для адгезии вируса к мембране клетки-хозяина, поскольку он накапливает вирус и сближает его со вторым рецептором, функциональным рецептором ACE2, который обеспечивает эффективное проникновение вируса в клетку (Hao Wei et al., doi.org/10.1101/2020.05.17.100537; Zhou Peng et al., Nature, 2020, 579, 270–273). Рецептор ACE2 является частью ренин-ангиотензиновой системы контроля артериального давления, он присутствует в эпителиальных клетках носа, глотки, гортани, трахеи, бронхов, но особенно распространен в пневмоцитах и энтероцитах. Таким образом, основными органами-мишенями SARS-CoV-2 являются легкие и кишечник. Вирус передается воздушно-капельным и контактным путем.

До открытия этого вируса были известны только шесть коронавирусов (включая альфа- и бета-коронавирусы), способных заражать человека, а именно HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-NKUI1, ответственные за значительный процент случаев простудных заболеваний, ассоциированных с легкими симптомами. SARS-CoV и MERS-CoV, напротив, представляют собой два коронавируса, связанные с намного более серьезной клинической картиной даже с летальными исходами. Таким образом, SARS-CoV-2 является седьмым вирусом в том же семействе, которое включает вирусы человека. На сегодняшний день многие свойства вируса остаются неясными, и, хотя была установлена

его способность передаваться от человека к человеку, все еще остаются неопределенности в отношении точного пути передачи вируса и его патогенности (Hasoksuz M. et al., Turk J Med Sci, 2020, 549-556).

Вирусная инфекция SARS-CoV-2 может приводить к развитию серьезного заболевания под названием COVID-19 (CoronaVirus Disease 2019), пациенты испытывают гриппоподобные симптомы, такие как лихорадка, утомляемость, сухой кашель и затрудненное дыхание. В наиболее тяжелых случаях, часто встречающихся у субъектов, состояние которых уже отягощено предшествующими заболеваниями, развиваются пневмония, острая почечная недостаточность, вплоть до смерти пациента. Уровень смертности варьирует от страны к стране, но зависит прежде всего от типа инфицированного пациента, соответственно, от возраста, типа и числа предшествующих заболеваний и, безусловно, от доступности госпитализации.

По состоянию на июль 2020 года эффективных способов лечения этого заболевания еще не существовало: в более легких случаях Центры по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) рекомендовали облегчение симптомов путем регулярного приема противогриппозных лекарственных средств, таких как НПВС и жаропонижающие средства, в случаях определенных симптомов было показано лечение с применением стероидов, противовирусных средств, гипериммунной сыворотки или синтетических антител (пока в фазе испытаний), тогда как в более тяжелых случаях часто оказывалось необходимым поддержание жизненно важных функций с помощью таких видов терапии, как искусственная вентиляция легких и экстракорпоральная мембранная оксигенация ЭКМО (Yan-Rong Guo et al., *Military Medical Research*, 2020, 7-11).

На сегодняшний день в медицинской клинике было испытано множество лекарственных средств, относящихся к сильно отличающимся друг от друга фармакологическим классам, таким как классические стероидные противовоспалительные средства (Бентелан), антитела, ингибирующие цитокиновый каскад (тоцилизумаб и сарилумаб), ингибиторы протеазы (ритонавир), противомаларийные средства (хлорохин), аналоги нуклеотидов (ремдесивир), синтетические нуклеозиды (рибавирин), а также антипротозойные средства (нитазоксанид), с первоначально обнадеживающими, но затем зачастую противоречивыми результатами, однако показанных при лечении болезни COVID-19, когда коронавирус SARS-CoV-2 уже серьезно негативно повлиял на здоровье пациента, часто с такими осложнениями как пневмония.

С другой стороны, не существует известных лекарственных средств, показанных для

лечения начальной стадии патологии SARS-CoV-2, соответственно, для первой стадии инфекции, когда симптомы являются еще легкими и представляют собой такие симптомы как лихорадка, утомляемость, сухой кашель и/или одышка, но, к сожалению, невозможно предсказать ее развитие, и, более того, не существует известных лекарственных средств или устройств, показанных в профилактических целях для предупреждения адгезии вируса к его рецепторам и, таким образом, блокирования его проникновения в клетки-хозяева.

Настоящее изобретение относится к сложноэфирным и сульфатированным производным гиалуроновой кислоты (НА) для применения в предупреждении и лечении начальной стадии патологии SARS-CoV-2, поскольку авторы неожиданно обнаружили и продемонстрировали специфические противовирусные/вирулицидные свойства производных-объектов настоящего изобретения в отношении этого вируса.

НА представляет собой гетерополисахарид, состоящий из чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина. Это полимер, содержащий линейную цепь с молекулярной массой (MW) в диапазоне от 50000 до  $13 \times 10^6$  Да в зависимости от источника, из которого он получен, и используемых способов получения. Он присутствует в перицеллюлярных гелях, в основном веществе соединительной ткани позвоночных организмов (одним из основных компонентов которой он является), в синовиальной жидкости суставов, в стекловидном теле и в пуповине. Таким образом, НА играет важную роль в биологическом организме, в частности в качестве механической опоры для клеток многих тканей, таких как кожа, сухожилия, мышцы и хрящи, выполняя такие функции как гидратация тканей и смазка суставов; кроме того, посредством своего мембранного рецептора CD44 НА модулирует множество различных процессов, связанных с клеточной физиологией и биологией, таких как, например, пролиферация, миграция, дифференцировка клеток и ангиогенез.

В течение многих лет в научной и патентной литературе была изучена и описана сульфатированная гиалуроновая кислота (HAS), синтетический полисахарид, полученный из гиалуроновой кислоты, сульфатированной подходящим образом по ее гидроксильным группам, как описано в публикациях известного уровня техники (EP0940410, EP3377536), которому изначально были приписаны в основном антикоагулянтные эффекты. Этот полисахарид также может быть получен путем деацетилирования НА с последующим сульфатированием глюкозамина (определяемого, соответственно, как НА-NS), однако это другая молекула с другими функциями (EP0971961). Со временем многочисленные эксперименты с HAS привели к обнаружению его новых применений, таких как

применение его в качестве противовоспалительного агента при таких заболеваниях как острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), суставной ревматизм, ревматоидный артрит и дерматит (EP754460 и EP1385492), применение его в качестве агента, регулирующего активность цитокинов (WO2010130466), и, наконец, также применение его в качестве противовирусного агента, как то в EP3103459, где заявлена специфическая противовирусная активность в отношении штаммов вируса герпеса, ВИЧ, цитомегаловируса и вируса везикулярного стоматита (VSV).

Другое производное НА, объект настоящего изобретения, представляет собой сложный эфир, образованный ее карбоксильными группами и спиртами алифатического, арилалифатического, циклоалифатического, ароматического, циклического и гетероциклического (Нуафф<sup>®</sup>) рядов, с процентом этерификации, который может варьировать в зависимости от типа и длины используемого спирта (EP216453); сложные эфиры гиалуроновой кислоты относятся к числу производных НА, которые особенно важны в процессе формирования новых конструированных тканей, в частности, бензиловые сложные эфиры с процентом этерификации в диапазоне от 75 до 100% представляют интерес с этой точки зрения. На практике известно применение этих сложноэфирных производных для формирования волокон, которые при обработке нетканого материала образуют трехмерную матрицу, которая может применяться как в ортопедии, так и в дерматологии (EP618817). Многочисленные научные эксперименты в полной мере продемонстрировали, что Нуафф является полностью биосовместимым биоразлагаемым полимером (Camposcia D. et al., *Biomaterials*, 1998, 19: 2101-2127), способным индуцировать и стимулировать пролиферацию и дифференцировку различных типов клеток, прикрепленных к этому полимеру, для получения *in vitro* новых искусственных тканей (Brun P. et al., *J Biomed Mater Res*, 1999, 46: 337-346; Aigner J. et al., *J Biomed Mater Res*, 1998, 42: 172-181).

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к сложноэфирным и сульфатированным производным гиалуроновой кислоты, выбранным из сульфатированной гиалуроновой кислоты со средней степенью сульфатирования на дисахаридное звено, равной 3 (НАS3), и бензилового эфира гиалуроновой кислоты (НА) со средним процентом этерификации карбоксильных групп 50% (Нуафф11p50), для применения в предупреждении и лечении патологии, вызванной альфа- и/или бета-коронавирусом, предпочтительно вирусом SARS-CoV-2.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям для местного применения, содержащим указанные HAS3 или Hyaff11p50, предпочтительно в фармацевтической форме спреев для носа или ротоглотки или в форме растворов для распыления, таких как аэрозоли, в сочетании с подходящими эксципиентами (такими как, например, стабилизаторы, растворители, гелеобразующие полимеры или консерванты, известные специалисту в данной области техники), для применения в предупреждении и лечении патологии, вызванной альфа- и/или бета-коронавирусом, в частности вирусом SARS-CoV-2, и предпочтительно в лечении начальной стадии заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2.

HA, применяемая в настоящем изобретении для получения HAS3 и Hyaff11p50, может быть получена из любого источника, известного специалисту в данной области техники, например, из экстракта петушиного гребня (EP138572, EP3491027), в результате ферментации *Streptococcus Equi* или *Zooepidemicus* (EP716688, EP3491027, EP3655138) или биосинтетическим путем (из *Bacillus*, EP2614088), и может иметь среднюю молекулярную массу (MW) в диапазоне от 150 до 250 кДа.

Следует отметить, что средняя молекулярная масса относится к средней молекулярной MW, рассчитанной методом «характеристической вязкости» (Terbojevich et al., *Carbohydr Res*, 1986, 363-377).

HAS3 получают в соответствии с тем, что известно специалисту в данной области техники (например, EP0940410), предпочтительно как описано в EP2429533 и EP3377536; сульфатирование HA происходит исключительно на уровне ее гидроксильных групп с получением средней степени сульфатирования на дисахаридное звено, равной 3 (то есть со средней степенью сульфатирования, равной 3 сульфатным группам на дисахаридное звено: HAS3), и в этом процессе, соответственно, не участвует глюкозамин HA.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям для местного применения, содержащим указанную HAS3, для описанного выше применения, предпочтительно в фармацевтической форме спреев для носа или ротоглотки или в виде растворов для распыления, таких как аэрозоли, возможно в сочетании с подходящими эксципиентами, где это производное присутствует в концентрации от 0,1 до 10% по массе из расчета на общую массу композиции (масс./масс.) и предпочтительно в концентрации от 2% масс./масс. до 5% масс./масс., доставляемое с физиологическим раствором (0,9% NaCl) или фосфатно-солевым буфером (ФСБ) в форме раствора для распыления.

Бензиловый эфир HA получают в соответствии с тем, что известно специалисту в

данной области техники (например, EP216453); этерификация НА затрагивает исключительно ее карбоксильные группы и приводит к образованию Nyaff11p50, то есть бензилового эфира НА, карбоксильные группы которой этерифицированы в среднем на 50%.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям Nyaff11p50 для местного применения для описанного выше применения, предпочтительно в фармацевтической форме спреев для носа и ротоглотки, в сочетании с подходящими эксципиентами, стабилизаторами или консервантами, где это производное присутствует в концентрации в диапазоне от 0,1 до 1% по массе из расчета на общую массу композиции (масс./масс.) и предпочтительно в концентрации, равной 0,2% масс./масс., в сочетании с

- гелеобразующим агентом, таким как карбомер (имеющим название Carbopol® согласно Международной номенклатуре косметических ингредиентов (INCI): синтетический полимер полиакриловой кислоты), предпочтительными являются Карбомер/карбопол 934 или Карбомер/карбопол 5984EP (идентичные синтетические полимеры полиакриловой кислоты, полученные в разных растворителях), предпочтительно присутствующим в концентрации в диапазоне 0,5%-1,5% масс./масс., и еще более предпочтительно в концентрации 0,9% масс./масс., и

- пропиленгликолем в качестве смачивающего агента/растворителя, предпочтительно присутствующим в концентрации в диапазоне 5%-15% масс./масс., и еще более предпочтительно в концентрации 10% масс./масс., и также возможно в сочетании с

- консервантами, регуляторами pH и любым другим эксципиентом, считающимся подходящим специалистом в данной области техники.

Ниже приведена предпочтительная фармацевтическая композиция Nyaff11p50 для местного применения в форме спрея для носа/ротоглотки **(A)** для применения в предупреждении и лечении патологии, вызванной альфа- и/или бета-коронавирусом, в частности вирусом SARS-CoV-2, и предпочтительно в лечении начальной стадии патологии, вызванной вирусом SARS-CoV-2, который имеет следующий состав:

Фармацевтическая композиция A:

Компонент	Количество в граммах	Функция
Nyaff11p50	0,2	Активный агент

Карбомер/карбопол 934 или Карбомер/карбопол 5984EP	0,9	Гелеобразующий агент
Пропиленгликоль	10	Смачивающий агент
Метил- <i>пара</i> - гидроксибензоат	0,1	Консервирующий агент
Пропил- <i>пара</i> - гидроксибензоат	0,05	Консервирующий агент
Дегидроацетат натрия	0,1	Консервирующий агент
Масло мяты перечной	0,005	Ароматизирующий агент
Гидроксид натрия	q.s.* до pH = 5,5-6,5	Регулятор pH
Этоксилированное гидрогенизированное касторовое масло 40	0,025	Солюбилизующий агент
Очищенная вода	q.s.* до 100 граммов	Растворитель

\*q.s.: *quantum sufficit*, необходимое количество.

Для исключительно описательных и неограничивающих целей приведены некоторые примеры препаратов вместе с результатами, полученными в экспериментах *in vitro*.

### Пример 1

Синтез сульфатированной НА, начиная с НА, имеющей среднюю молекулярную массу 200 кДа, с получением средней степени сульфатирования, равной 3 сульфатным группам на дисахаридное звено: НАS<sub>3</sub>.

1,00 грамм натриевой соли НА (200 кДа) суспендировали в 55 мл диметилсульфоксида (ДМСО). К этой суспензии добавляли 0,8 мл чистой метансульфоновой кислоты, и смесь перемешивали в течение 24 часов при 25°C с получением таким образом прозрачного и бесцветного раствора (поглощение при 600 нм = 0,02 ОЕ). К этому раствору добавляли 5,0 г комплекса пиридина и триоксида серы (пиридин SO<sub>3</sub>) при перемешивании в течение еще 24 часов при 25°C.

Затем к полученному таким образом раствору добавляли 90 мл этанола с получением каучукообразного осадка коричневого цвета, который отделяли посредством фильтрования, растворяли в 32 мл воды с добавлением 1,3 г NaCl. Наконец, добавляли 24 мл ДМСО и доводили pH до 3,4 с помощью 3 М NaOH. Полученное производное осаждали в виде мелкодисперсного порошка путем добавления 90 мл этанола; затем его отделяли



посредством фильтрования и промывали 3 раза раствором этанол/вода (8/2). Для удаления остаточного пиридина порошок промывали еще 3 раза раствором этанол/0,1 М NaOH (8:2), 2 раза раствором этанол/0,1 М HCl (8:2), 2 раза раствором этанол/вода (8:2) и, наконец, еще 2 раза чистым этанолом. Полученный таким образом желтовато-белый порошок сушили с помощью вакуумного насоса при 40 °С в течение 24 часов. Получали 1,70 г HAS3 в виде мелкодисперсного желтовато-белого порошка, что соответствовало выходу 98% при чистоте 99,4%.

### **Пример 2**

Получение бензилового эфира НА, 50% карбоксильных групп которого этерифицированы бензиловым спиртом: Nyaff11p50.

10,6 г тетрабутиламмониевой соли НА (имеющей среднюю молекулярную массу 200 кДа, что соответствует 17 миллиэквивалентам мономерных звеньев) растворяли в 530 мл ДМСО при 25°С, затем добавляли 7,8 миллиэквивалента бензилбромида, и полученный раствор выдерживали при 30 °С в течение 12 часов. Далее добавляли раствор, содержащий 62 мл воды и 9 г хлорида натрия, и полученную смесь медленно выливали в 3000 мл ацетона при постоянном перемешивании. Образовавшийся осадок отфильтровывали, три раза промывали 500 мл смеси ацетон/вода 5:1 и, наконец, сушили в вакууме при 30°С в течение 8 часов. Стадию осаждения повторяли; затем осадок дважды промывали смесью ацетон/вода 5:1 и затем 3 раза только ацетоном; наконец, его сушили в вакууме при 30°С в течение 24 часов.

Количественное определение сложноэфирных групп Nyaff11p50 выполняли в соответствии с Cundiff and Markunas, *Anal Chem*, 1961, 33, 1028-1030.

### **Пример 3**

Оценка противовирусного действия HAS3:

Активность исследуемого образца определяли *in vitro* путем оценивания его эффективной противовирусной активности в отношении вируса BCoV (то есть бычьего коронавируса, относящегося к виду *Betacoronavirus 1*, штамм *S379 Riems*) в клетках РТ (СCLV-RIE 11, клетки почки быка), поддерживаемых в культуре с использованием подходящих сред. BCoV является признанным и подходящим бета-коронавирусом, который используется и может использоваться в экспериментах и исследованиях по инаktivации вирусов MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2 (Siddharta et al., *The Journal of Infectious Diseases*, 2017, 15; 215 (6): 902–906). Процедуру эксперимента проводили в соответствии с европейским законодательством EN 14476: 2013 + A2: 2019,

регламентирующим методы определения вирулицидной активности антисептических продуктов, применяемых в области медицины.

Перед использованием вирус ВСоV размножали (по показателю числа инфекционных вирусных частиц) с использованием клеток РТ, которые инкубировали с этим вирусом в течение 2-3 дней при 37°C; после чего клеточный препарат центрифугировали и затем собирали супернатант (далее определенный в настоящем документе как вирусная суспензия), содержащий вышеупомянутый вирус. Титр вируса выражали как TCID<sub>50</sub>/мл вирусной суспензии (TCID<sub>50</sub>: цитопатическая инфекционная доза, способная инфицировать 50% инокулированных клеточных единиц и, таким образом, соответствующая разведению вирусной суспензии, способному вызывать цитопатический эффект в 50% инокулированных клеток; TCID<sub>50</sub> рассчитывали с использованием метода Спирмена-Кербера (Kärber G., *Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmacol*, 1931, 162, 480–483; Spearman CI, *Br J Psychol*, 1908, 2: 227-242) после оценивания под микроскопом эффективной дозы вируса, способной вызывать цитопатическое воздействие на обрабатываемые клетки). Для этого анализа титр вируса должен был составлять по меньшей мере 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/мл суспензии.

Для этого исследования использовали различные концентрации HAS3, предварительно проверенные в отношении отсутствия цитотоксичности. HAS3 была получена в соответствии с примером 1 и исследована в концентрации

1. 4 мг/мл в ФСБ
2. 2 мг/мл в ФСБ
3. 0,2 мг/мл в ФСБ.

Клетки РТ высевали в 96-луночные планшеты и подвергали анализу по достижении их слияния.

#### Экспериментальная модель: оценка кратковременной обработки

1 мл вирусной суспензии разбавляли с применением 9 мл указанных выше образцов при времени контакта 30 минут при 20°C; эти препараты впоследствии разводили в соотношении 1:10 с получением последовательно разведенных растворов, каждый из которых был разбавлен культуральной средой 1:10.

Затем по 0,1 мл каждого последовательно разведенного раствора вводили в контакт с клетками, содержащимися в лунках 96-луночных планшетов (6 лунок на каждое разведение, 1 планшет на каждый образец). После подвергания клеток воздействию указанных выше растворов в течение 60 минут при 37°C все исследуемые растворы удаляли

путем аспирации и добавляли равное количество культуральной среды (взамен).

Отрицательный контроль представлял собой 6 необработанных лунок на каждый планшет (таким образом, соответствующие клетки всегда должны были быть живыми); с другой стороны, положительный контроль для сравнения с планшетами, обработанными указанными выше последовательно разведенными растворами (для всех разведений) состоял из 1 планшета, инокулированного теми же вышеупомянутыми разведениями растворов вируса, но без исследуемых образцов, для оценки противовирусной активности анализируемых образцов.

Все обработанные клетки изучали под микроскопом через 48 часов для оценки % жизнеспособности и каких-либо вирусных патологических эффектов, затем рассчитывали значение TCID<sub>50</sub> для образцов и для положительного контроля.

Оценивание противовирусной эффективности исследованных образцов осуществляли путем расчета логарифмического снижения титра вируса (выраженного как log TCID<sub>50</sub>) для клеток, обработанных различными концентрациями/разведениями исследуемых образцов, по сравнению с титром вируса (log TCID<sub>50</sub>) для положительного контроля с последующим вычитанием логарифмического значения TCID<sub>50</sub> для исследуемых образцов из логарифмического значения TCID<sub>50</sub> для положительного контроля.

#### Экспериментальная модель: оценка длительной обработки

Та же экспериментальная модель, которую использовали для оценки кратковременной обработки, была выполнена со следующими модификациями:

- после подвергания клеток воздействию указанных выше растворов в течение 60 минут при 37°C к этим клеткам в исследуемых растворах дополнительно добавляли 0,1 мл культуральной среды. После обработки в течение 48 часов культуры изучали под микроскопом для оценки % выживаемости и патогенности для клеток, вызванной вирусом или ингибируемой исследуемым образцом, всегда по сравнению с положительным контролем. После проведения этого анализа для всех образцов рассчитывали соответствующие TCID<sub>50</sub>.

#### Результаты

Снижение титра вируса, определенное для каждого образца в обеих используемых моделях, приведено ниже в таблицах 1-2:

#### Таблица 1

Логарифмическое снижение TCID <sub>50</sub> , определенное для HAS3 по сравнению с положительным контролем; кратковременная обработка, через 48 часов			
Вирус	HAS3	HAS3	HAS3
BCoV	4 мг/мл	2 мг/мл	0,2 мг/мл
	Лог. сниж. = 2,00	Лог. сниж. = 2,00	Лог. сниж. = 1,00

Таблица 2

Логарифмическое снижение TCID <sub>50</sub> , определенное для HAS3 по сравнению с положительным контролем; длительная обработка, через 48 часов			
Вирус	HAS3	HAS3	HAS3
BCoV	4 мг/мл	2 мг/мл	0,2 мг/мл
	Лог. сниж. = 1,00	Лог. сниж. = 1,00	Лог. сниж. = 1,00

Формула, применяемая для преобразования этих значений в % снижения инфекционной способности BCoV в исследуемых образцах (*Log and Percent Reductions in Microbiology and Antimicrobial Testing*, Microchem Laboratory, December 16, 2015) представляет собой следующую:

$$P = (1 - 10^{-L}) \times 100,$$

где P представляет собой полученный процент снижения вирусной нагрузки,

L представляет собой логарифмическое снижение (log TCID<sub>50</sub>) вирусной нагрузки, полученное для каждого образца в двух использованных экспериментальных моделях, описанных выше. Таким образом, при замене L на указанные выше значения получается следующее:

для L = 1 P = снижение на 90%

для L = 2, P = снижение на 99%.

HAS3 в обеих моделях с кратковременной и длительной обработкой, в которых она была исследована, и для всех оцениваемых концентраций вызывала снижение вирусной нагрузки и, как следствие, инфекционной способности бета-коронавируса, составляющее от 90% до 99%, демонстрируя высокоэффективные противовирусные свойства против этого типа вируса.

#### Пример 4

Оценка противовирусного действия фармацевтической композиции А, содержащей производное Nuaff11p50:

Nuaff11p50 получали, как описано в примере 2.

Противовирусную активность композиции A определяли *in vitro* путем оценивания ее эффективной противовирусной активности в отношении вируса BCoV (то есть бычьего бета-коронавируса, относящегося к виду *Betacoronavirus* 1, штамм *S379 Riems*) в клетках PT (CCLV-RIE 11), поддерживаемых в культуре с использованием подходящих сред.

Вкратце, эксперимент проводили полностью аналогично указанному выше эксперименту, выполненному для HAS3, и в этом случае вирус BCoV перед применением размножали с использованием клеток PT, которые инкубировали с этим вирусом в течение 2-3 дней при 37°C; затем клеточный препарат центрифугировали и собирали супернатант, содержащий вышеупомянутый вирус. Титр вируса выражали как TCID<sub>50</sub>/мл вирусной суспензии, где TCID<sub>50</sub> рассчитывали с использованием указанного выше метода Спирмена-Кербера после оценивания под микроскопом эффективной дозы вируса, способной вызывать воздействие на обрабатываемые клетки. Также для этого анализа титр вируса должен был составлять по меньшей мере 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/мл суспензии.

Для этого анализа использовали 2 разных разведения композиции A, предварительно проверенные в отношении отсутствия цитотоксичности:

1. композиция A, исследованная в разведении 66% в 0,9% NaCl.
2. композиция A, исследованная в разведении 6,6% в 0,9% NaCl.

Экспериментальная модель: оценка кратковременной обработки

Два разведения композиции A (см. выше) были исследованы в экспериментальной модели с кратковременной обработкой, ранее описанной для анализа HAS3.

В этом случае обработанные клетки также изучали под микроскопом через 48 часов для оценки % жизнеспособности и каких-либо патологических эффектов, затем определяли вирусную активность путем расчета значения TCID<sub>50</sub>. Оценивание противовирусной эффективности двух указанных разведений осуществляли путем расчета логарифмического снижения титра вируса для обработанных клеток по сравнению с титром вируса (log TCID<sub>50</sub>) для положительного контроля.

Экспериментальная модель: оценка длительной обработки

Два разведения композиции A исследовали в экспериментальной модели с длительной обработкой, описанной ранее для анализа HAS3.

После обработки в течение 48 часов культуры изучали под микроскопом для оценки % выживаемости и патогенности для клеток, вызванной вирусом или ингибируемой исследуемым образцом, опять же по сравнению с положительным контролем. После проведения этого анализа для всех образцов рассчитывали соответствующие TCID<sub>50</sub>.

### Результаты

Снижение титра вируса для 2 разведений композиции А, исследованных в обеих используемых моделях, выраженное в виде логарифмического значения, приведено ниже (в таблицах 3-4):

Таблица 3

<b>Логарифмическое снижение TCID<sub>50</sub>, определенное для композиции <u>А</u>, по сравнению с положительным контролем; кратковременная обработка через 48 часов</b>		
Вирус	Комп. <u>А</u> , содержащая Нуафф1 1р50	Комп. <u>А</u> , содержащая Нуафф1 1р50
ВсоV	Разведение 66%	Разведение 6,6%
	<b>Лог. сниж. = 2,00</b>	<b>Лог. сниж. = 1,00</b>

Таблица 4

<b>Логарифмическое снижение TCID<sub>50</sub>, определенное для композиции <u>А</u>, по сравнению с положительным контролем; длительная обработка через 48 часов</b>		
Вирус	Комп. <u>А</u> , содержащая Нуафф1 1р50	Комп. <u>А</u> , содержащая Нуафф1 1р50
ВсоV	Разведение 66%	Разведение 6,6%
	<b>Лог. сниж. = 1,00</b>	<b>Лог. сниж. = 1,00</b>

$$P = (1-10^{-L}) \times 100$$

При замене L на указанные выше значения получается следующее:

для L = 1 P = снижение на 90%

для L = 2 P = снижение на 99%.

Таким образом, HAS3 и предпочтительная фармацевтическая композиция А, содержащая Нуафф1 1р50, вызывали в моделях как с кратковременной, так и с длительной обработкой для всех исследованных концентраций и для обоих оцениваемых разведений радикальное снижение инфекционной дозы TCID<sub>50</sub>, то есть инфекционной нагрузки/способности бета-коронавируса, составляющее от 90% до 99%, таким образом демонстрируя высокоэффективные противовирусные свойства против этого типа вируса.

### **Пример 5**

Заявителем было проведено еще два других эксперимента для исследования

противовирусного действия HAS3 в отношении риновируса человека (энтеровируса из семейства *Picornaviridae*, который проникает за счет диффузии воздуха, локализуется и размножается в слизистой оболочке носа) и обезьяньего вируса (полиомавируса из семейства *Polyomaviridae*, потенциально онкогенного вируса).

Для этого использовали риновирус HR-37, исследованный в клетках HELA (иммortalизованные опухолевые клетки), и обезьяний вирус SV40 в клетках CV-1 (фибробласты почки обезьяны); в обоих случаях соблюдали европейское законодательство EN 14476: 2013 + A1: 2015, регламентирующее методы определения вирулицидной активности антисептических продуктов, применяемых в области медицины.

Как для риновируса, так и для обезьяньего вируса HAS3 не вызывала какого-либо вирулицидного эффекта, следовательно, она не демонстрировала какой-либо противовирусной активности против вышеупомянутых вирусов.

В заключение, с помощью этих экспериментов Заявителем было показано, что HAS3 и Nuaff11p50 (в сочетании с карбомером и пропиленгликолем), для простоты определяемые далее в настоящем документе как «продукты», способны оказывать предупреждающее действие и лечебное противовирусное действие против коронавирусной патологии, так как

- Эксперименты с клетками с кратковременной обработкой, выполненные после первой инкубации с вирусом/продуктами, явно продемонстрировали, что оба этих продукта способны оказывать высокоэффективное предупреждающее вирулицидное/противовирусное действие, которое сохраняется с течением времени, поскольку после наблюдения в течение 48 часов обработанные клетки оказались живыми и по меньшей мере на 90% морфологически здоровыми по сравнению с положительным контролем;

- Эксперименты с клетками с длительной обработкой, в которых коронавирус оставался в контакте с клетками, обрабатываемыми непрерывно в течение 48 часов (всегда в присутствии продуктов), явно продемонстрировали, что оба этих продукта способны оказывать высокоэффективное лечебное противовирусное действие благодаря блокированию репликации остаточного вируса в культуральной среде, при этом обработанные клетки оказались живыми и морфологически здоровыми по меньшей мере на 90% по сравнению с положительным контролем;

- эксперименты с HAS3 с энтеровирусами и полиомавирусами не дали каких-либо результатов, что является доказательством того, что ее вирулицидное/противовирусное действие специфично для коронавируса и не применимо к другим семействам вирусов,

таким образом, не распространяется в целом на весь вирусный мир.



## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сложноэфирные и сульфатированные производные гиалуроновой кислоты, выбранные из сульфатированной гиалуроновой кислоты со средней степенью сульфатирования на дисахаридное звено, равной 3 (HAS3), и бензилового эфира гиалуроновой кислоты (НА) со средним процентом этерификации карбоксильных групп 50%, для применения в предупреждении и лечении патологии, вызванной альфа- и/или бета-коронавирусом, предпочтительно вирусом SARS-CoV-2.

2. Сложноэфирные и сульфатированные производные гиалуроновой кислоты для применения по п. 1 в лечении начальной стадии патологии, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

3. Сложноэфирные и сульфатированные производные гиалуроновой кислоты для применения по п. 1 или п. 2, полученные из гиалуроновой кислоты со среднемассовой молекулярной массой в диапазоне 150-250 кДа.

4. Фармацевтические композиции для местного применения для применения по любому из пп. 1-3, содержащие указанные сложноэфирные и сульфатированные производные гиалуроновой кислоты, предпочтительно в фармацевтической форме спреев для носа, ротоглотки или в форме распыляемых растворов, таких как аэрозоли, в сочетании с подходящими эксципиентами.

5. Фармацевтические композиции для местного применения для применения по любому из пп. 1-4, содержащие HAS3 в диапазоне концентраций от 0,1 до 10% по массе из расчета на общую массу композиции (масс./масс.) и предпочтительно от 2% масс./масс. до 5% масс./масс., доставляемую с 0,9% масс./масс. NaCl или фосфатно-солевого буфера (ФСБ) в качестве раствора для распыления.

6. Фармацевтические композиции для местного применения для применения по одному или более из пп. 1-4, содержащие бензиловый эфир гиалуроновой кислоты (НА) со средним процентом этерификации карбоксильных групп 50% в диапазоне концентраций от 0,1 до 1% по массе из расчета на общую массу композиции (масс./масс.) и предпочтительно в концентрации, равной 0,2% масс./масс.

7. Фармацевтические композиции для местного применения для применения по одному или более из пп. 1-4 и п. 6, содержащие бензиловый эфир НА со средним процентом этерификации карбоксильных групп 50% в сочетании с эксципиентом карбомер/карбопол и с пропиленгликолем, возможно в сочетании с дополнительными эксципиентами.

**8.** Фармацевтические композиции для местного применения для применения по п. 7, где карбомер/карбопол присутствует в концентрации в диапазоне 0,5%-1,5% масс./масс., и пропиленгликоль присутствует в концентрации в диапазоне 5%-15% масс./масс., возможно в сочетании с дополнительными эксципиентами.

**9.** Фармацевтические композиции для местного применения для применения по п. 7, где карбомер/карбопол присутствует в концентрации 0,9% масс./масс., и пропиленгликоль присутствует в концентрации 10% масс./масс.

**10.** Фармацевтические композиции для местного применения для применения по любому из пп. 1-4 или пп. 6-9, содержащие бензиловый эфир НА со средним процентом этерификации карбоксильных групп 50% в концентрации 0,2% масс./масс. в сочетании с эксципиентом карбомер/карбопол в концентрации 0,9% масс./масс., с пропиленгликолем в концентрации 10% масс./масс., и в сочетании с дополнительными эксципиентами.