

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392257** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.10.05

(22) Дата подачи заявки
2022.02.10

(51) Int. Cl. *A61K 31/715* (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДЫ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **21305183.2**

(32) **2021.02.11**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2022/053270**

(87) **WO 2022/171748 2022.08.18**

(71) Заявитель:
ДАНСТАР ФЕРМЕНТ АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Дюрмонт Фредерик (CH)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к экзополисахаридам, продуцируемым морскими бактериями, их композициям, применению указанных композиций и способу ослабления вирулентности микробной патогенной инфекции, или бактериальной, или вирусной инфекции, путем ингибирования или снижения колонизации указанных микробных патогенов на биологических и/или небιологических поверхностях.

202392257
A1

202392257

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578966EA/55

КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДЫ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к экзополисахаридам (ЭПС), происходящим из морских бактерий, их композициям, нетерапевтическим применениям указанных ЭПС и композиций и терапевтическим применениям указанных ЭПС и композиций. Настоящее изобретение также относится к способу получения указанных ЭПС. Настоящее изобретение дополнительно относится к системе назальной доставки, содержащей, по меньшей мере, один выделенный экзополисахарид, и терапевтическому применению указанной системы назальной доставки. Настоящее изобретение также относится к способу получения назальной композиции.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Инфекционные заболевания обычно вызываются микроорганизмами, которые проникают в организм и распространяются. Существует много типов инфекционных организмов, также называемых патогенными микроорганизмами. Вот несколько примеров того, как эти микроорганизмы могут проникнуть в организм: через рот, глаза или нос, при половом контакте, через раны или укусы, через зараженные медицинские устройства.

Люди в основном инфицируются такими микроорганизмами при употреблении зараженной воды или пищевых продуктов. Они могут вдыхать споры или пыль или вдыхать зараженные капли от чье-либо кашля или чихания. Люди также могут прикасаться к зараженным предметам (например, дверной ручке) или вступать в непосредственный контакт с зараженным человеком и затем касаться своих глаз, носа или рта.

Некоторые микроорганизмы также распространяются в жидкостях организма, таких как кровь, сперма и кал. Например, они могут проникнуть в организм при половом контакте с инфицированным партнером. Укусы людей и животных и другие раны, повреждающие кожу, могут способствовать проникновению в организм патогенных микроорганизмов.

Патогенные микроорганизмы также могут прилипать к имплантированным в организм медицинским устройствам (таким как катетеры, искусственные суставы или искусственные клапаны сердца). Они могут присутствовать на устройстве при имплантации, если устройство было случайно загрязнено. Инфекционные агенты из других мест также могут распространяться через кровоток и прикрепляться устройству, которое уже было имплантировано. Поскольку имплантированное устройство не имеет естественной защиты, такие микроорганизмы могут легко расти и распространяться, вызывая заболевание.

После проникновения в организм человека патогенные микроорганизмы должны размножиться или распространиться, чтобы вызвать инфекцию. После начала размножения или распространения возможны три сценария: 1) Микроорганизмы продолжают размножаться и подавляют защитные силы организма-хозяина. 2) Достигается состояние равновесия, вызывающее хроническую инфекцию. 3) Организм-хозяин, с лечением или без

него, уничтожает и элиминирует инвазивные микроорганизмы.

Эффективность существующих растворов (т. е. антибиотиков, противовирусных препаратов) для избавления от патогенных инфекций зависит от быстрого распознавания патогена с последующим нанесением патогенподавляющей композиции до необратимой адгезии микроорганизмов к поверхности. Было бы крайне желательно предоставить другой подход, ограничивающий необратимую адгезию микробных патогенов к поверхности, позволяющий уменьшить явления резистентности к лечению и, следовательно, их влияние на связанные с этим расходы на здравоохранение.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с первым аспектом настоящее раскрытие предоставляет выделенный экзополисахарид (ЭПС), имеющий средневесовую молекулярную массу в диапазоне от 40 до 4000 кДа, в котором ЭПС получают или могут получить путем ферментации морских бактерий. В варианте осуществления выделенный ЭПС имеет средневесовую молекулярную массу (M_w) в диапазоне от 40 до 2000 кДа, от 40 до 1400 кДа, от 40 до 1000 кДа, от 40 до 500 кДа, от 40 до 400 кДа, от 40 до 300 кДа, от 40 до 200 кДа, от 40 до 150 кДа или от 40 до 100 кДа. В предпочтительном варианте осуществления выделенный ЭПС имеет M_w в диапазоне от 40 до 150 кДа. В варианте осуществления выделенный ЭПС имеет M_w в диапазоне от 40 до 150 кДа и необязательно среднечисловую молекулярную массу (M_n) в диапазоне от 26 до 100 кДа и/или индекс полидисперсности (M_w/M_n) в диапазоне от 1,2 до 1,8. В варианте осуществления выделенный ЭПС, как описано в настоящей заявке, может содержать 30-90% нейтральных гликозильных звеньев, 10-70% аминогликозильных звеньев и 0-15% кислотных гликозильных звеньев по отношению к общему количеству гликозильных звеньев указанного ЭПС. В другом варианте осуществления выделенный ЭПС, как описано в настоящей заявке, может содержать маннозу, галактозу, глюкозу, N-ацетилгалактозамин и N-ацетилглюкозамин. В некотором дополнительном варианте осуществления выделенный ЭПС, как описано в настоящей заявке, может по существу не содержать рибозы, арабинозы, рамнозы, фруктозы и/или фукозы. В другом варианте осуществления морские бактерии могут представлять собой грамположительные термофильные бактерии, предпочтительно *Bacillus licheniformis*, более предпочтительно *Bacillus licheniformis* LP-T14, которые были депонированы в Национальной коллекции промышленных, пищевых и морских бактерий (NCIMB) 27 января 2020 г. под депозитарным номером NCIMB 43557. В другом варианте осуществления выделенный ЭПС, как описано в настоящей заявке, может по существу не обладать способностью индуцировать иммунный ответ.

В соответствии со вторым аспектом настоящее раскрытие предоставляет способ получения выделенного экзополисахарида (ЭПС), имеющего средневесовую молекулярную массу (M_w) в диапазоне от 40 до 4000 кДа, включающий стадии: культивирования морских бактерий в первой культуральной среде для получения культивированных морских бактерий; ферментации культивированных морских бактерий в ферментационной среде; термической обработки ферментационной среды;

центрифугирования ферментационной среды для получения супернатанта и фильтрования супернатанта для получения выделенного ЭПС. Выделенный ЭПС может быть выделенным ЭПС, как описано в настоящей заявке. В варианте осуществления морские бактерии могут представлять собой грамположительные термофильные бактерии, предпочтительно *Bacillus licheniformis*, более предпочтительно *Bacillus licheniformis* LP-T14, которые были депонированы в Национальной коллекции промышленных, пищевых и морских бактерий (NCIMB) 27 января 2020 г. под депозитарным номером NCIMB 43557. В варианте осуществления ферментационная среда может содержать морские соли (40 г/л), триптон (6 г/л), дрожжевой экстракт (6 г/л), пеногаситель (0,33 мл/л), декстрозу (12 г/л) и деионизированную H₂O (достат. кол.). В варианте осуществления ферментацию можно проводить при pH 5-8 в течение периода 20-40 ч при 40°C при 30-50% оксигенации. В варианте осуществления термообработку ферментационной среды можно проводить путем нагревания ферментационной среды в течение 1 ч при 85°C. В варианте осуществления центрифугирование ферментационной среды можно проводить при 14000g с использованием тарельчатого сепаратора со скоростью потока 200-800 л/ч. В варианте осуществления фильтрация супернатанта включает последовательную фильтрацию с использованием ступеней фильтрации от 1,60 до 0,22 мкм и/или ультрафильтрацию с использованием картриджей с отсекающим фильтром от 10 до 100 кДа. В варианте осуществления способ настоящего раскрытия может дополнительно включать свободную сушку выделенного ЭПС для получения свободно высушенного ЭПС. В варианте осуществления свободную сушку проводят при -20°C в течение, по меньшей мере, 16 часов.

В соответствии с третьим аспектом настоящее раскрытие предоставляет композицию, которая содержит, по меньшей мере, один выделенный ЭПС, как описано в настоящей заявке, и подходящий носитель. Композиция настоящего изобретения может представлять собой пероральную композицию, назальную композицию, местную композицию, трансдермальную композицию, офтальмологическую композицию или композицию, составленную для нанесения на медицинское устройство.

В соответствии с четвертым аспектом настоящее раскрытие предоставляет систему назальной доставки, которая содержит, по меньшей мере, один выделенный ЭПС, как описано в настоящей заявке, или, по меньшей мере, один выделенный ЭПС, полученный или доступный для получения с помощью способа, описанного в настоящей заявке. В варианте осуществления система назальной доставки может доставлять, по меньшей мере, один выделенный ЭПС в виде назальных капель, жидкого спрея, сухого спрея, геля или мази. В другом варианте осуществления, по меньшей мере, один выделенный ЭПС может быть составлен в виде композиции, которая дополнительно содержит физиологический раствор. В другом варианте осуществления система назальной доставки, как описано в настоящей заявке, может быть предназначена для лечения и/или предотвращения инфекции микробными патогенами у объекта, нуждающегося в таком лечении. В другом варианте осуществления система назальной доставки, как описано в настоящей заявке, может быть использована для лечения и/или предотвращения инфекции микробными патогенами у

объекта, нуждающегося в таком лечении. В некотором варианте осуществления система назальной доставки, как описано в настоящей заявке, может быть предназначена для ослабления вирулентности микробного патогена путем ингибирования или снижения колонизации микробным патогеном носовой полости объекта, нуждающегося в таком лечении. В некотором варианте осуществления система назальной доставки, как описано в настоящей заявке, может быть использована для ослабления вирулентности микробного патогена путем ингибирования или снижения колонизации микробным патогеном носовой полости объекта, нуждающегося в таком лечении.

В соответствии с пятым аспектом настоящее раскрытие предоставляет нетерапевтическое применение выделенного ЭПС, как описано в настоящей заявке, или выделенного ЭПС, полученного или доступного для получения с помощью способа, описанного в настоящей заявке, или композиции, как описано в настоящей заявке, для обработки небиологической поверхности с целью предотвращения или снижения колонизации поверхности микробным патогеном. В варианте осуществления поверхность может представлять собой поверхность медицинского устройства.

В соответствии с шестым аспектом настоящее раскрытие предоставляет выделенный ЭПС, как описано в настоящей заявке, или выделенный ЭПС, полученный или доступный для получения с помощью способа, описанного в настоящей заявке, композицию, как описано в настоящей заявке, или систему назальной доставки, как описано в настоящей заявке, для применения в способе лечения и/или предотвращения инфекции микробным патогеном у объекта, нуждающегося в таком лечении.

В соответствии с седьмым аспектом настоящее раскрытие предоставляет применение выделенного ЭПС, как описано в настоящей заявке, или выделенного ЭПС, полученного или доступного для получения с помощью способа, описанного в настоящей заявке, композиции, как описано в настоящей заявке, или системы назальной доставки, как описано в настоящей заявке, для изготовления лекарственного препарата для лечения и/или предотвращения инфекции микробным патогеном.

В соответствии с восьмым аспектом настоящее раскрытие предоставляет выделенный ЭПС, как описано в настоящей заявке, или выделенный ЭПС, полученный или доступный для получения с помощью способа, описанного в настоящей заявке, композицию, как описано в настоящей заявке, или систему назальной доставки для применения в способе для ослабления вирулентности микробного патогена.

В соответствии с девятым аспектом настоящее раскрытие предоставляет применение выделенного ЭПС, как описано в настоящей заявке, или выделенного ЭПС, полученного или доступного для получения с помощью способа, описанного в настоящей заявке, композиции, как описано в настоящей заявке, или системы назальной доставки, как описано в настоящей заявке, для изготовления лекарственного препарата для ослабления вирулентности микробного патогена.

В соответствии с десятым аспектом настоящее раскрытие предоставляет способ лечения и/или предотвращения микробной патогенной инфекции у объекта, нуждающегося

в таком лечении, включающий введение объекту эффективного количества выделенного ЭПС, как описано в настоящей заявке, или выделенного ЭПС, полученного или доступного для получения с помощью способа, описанного в настоящей заявке, или композиции, как описано в настоящей заявке.

В соответствии с одиннадцатым аспектом настоящее раскрытие предоставляет способ ослабления вирулентности микробной патогенной инфекции у объекта, нуждающегося в таком лечении, включающий введение объекту эффективного количества выделенного ЭПС, как описано в настоящей заявке, или выделенного ЭПС, полученного или доступного для получения с помощью способа, описанного в настоящей заявке, или композиции, как описано в настоящей заявке.

В соответствии с двенадцатым аспектом настоящее раскрытие предоставляет способ составления назальной композиции для ослабления вирулентности микробной патогенной инфекции путем ингибирования или снижения колонизации микробным патогеном в носовой полости, в котором способ включает стадию смешивания, по меньшей мере, одного выделенного экзополисахарида (ЭПС), происходящего из морских бактерий, с физиологическим раствором для получения назальной композиции, содержащей соль в концентрации от 0,1% до 10% масс./масс. В варианте осуществления, по меньшей мере, один выделенный ЭПС может представлять собой выделенный ЭПС в соответствии с настоящим раскрытием. В предпочтительном варианте осуществления полученная назальная композиция содержит соль в концентрации от 0,5% до 5% масс./масс. Более предпочтительно полученная назальная композиция содержит соль в концентрации от 0,7% до 3% масс./масс. В варианте осуществления полученная композиция содержит соль в концентрации приблизительно 0,9% масс./масс. В варианте осуществления полученная композиция содержит соль в концентрации приблизительно 2,2% масс./масс. В варианте осуществления полученная композиция содержит соль в концентрации приблизительно 2,7% масс./масс.

В соответствии с любым из выделенных ЭПС для применения в соответствии с настоящим раскрытием, композицией для применения в соответствии с настоящим раскрытием или способами настоящего раскрытия, по меньшей мере, один выделенный ЭПС или композиция, как описано в настоящей заявке, могут быть введены объекту до, во время и/или после микробной патогенной инфекции, таким образом предотвращая, ингибируя или снижая колонизацию микробным патогеном, по меньшей мере, одной биологической ткани объекта и/или интернализацию микробного патогена. В варианте осуществления, по меньшей мере, одна биологическая ткань может быть выбрана из ротовой полости, носовой полости, дыхательных путей, горла, ушей, офтальмологической области, мочеполового тракта, кожи, кожи волосистой части головы, волос, ногтей и их комбинации. В другом варианте осуществления микробный патоген может представлять собой бактериальный патоген и введение выделенного ЭПС или композиции объекту ослабляет вирулентность бактериальной патогенной инфекции за счет снижения или ингибирования образования ранней бактериальной биопленки и/или разрушения ранней

бактериальной биопленки. В другом варианте осуществления микробный патоген может представлять собой вирусный патоген и введение выделенного ЭПС или композиции объекту ослабляет вирулентность вирусной патогенной инфекции за счет снижения смертности клеток объекта, инфицированных вирусным патогеном, по сравнению с эквивалентными необработанными клетками, предотвращая или снижая высвобождение вирионов из инокулированных клеток объекта и/или предотвращая или снижая инфицирование неинфицированных соседних клеток объекта.

В соответствии с любой из систем назальной доставки настоящего раскрытия, нетерапевтическим применением настоящего раскрытия, выделенным ЭПС для применения в соответствии с настоящим раскрытием, композициями для применения в соответствии с настоящим раскрытием или способами настоящего раскрытия микробный патоген может представлять собой, по меньшей мере, один из бактериального патогена, вирусного патогена или грибкового патогена. В варианте осуществления указанный, по меньшей мере, один бактериальный патоген может быть выбран из родов *Cutibacterium*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* и *Streptococcus*. В некотором варианте осуществления, по меньшей мере, один из бактериальных патогенов может представлять собой виды *Cutibacterium acnes*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catharalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* или *Streptococcus mutans*. В варианте осуществления, по меньшей мере, один бактериальный патоген может быть выбран из видов *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и/или *Streptococcus mutans*. В другом варианте осуществления указанный, по меньшей мере, один вирусный патоген может быть выбран из гриппа А, гриппа А подтипа H1N1/2009/pdm09, гриппа А подтипа H1, гриппа А подтипа H3, гриппа В (ортомиксовируса), коронавируса 229Е, коронавируса HKU1, коронавируса NL63, коронавируса OC43, SARS-CoV-2 (коронавируса), вируса парагриппа 1, вируса парагриппа 2, вируса парагриппа 3, вируса парагриппа 4, респираторно-синцитиального вируса А/В, метапневмовируса человека А/В (парамиксовируса), аденовируса или риновируса/энтеровируса (пикорнавируса). В доополнительном варианте осуществления, по меньшей мере, один вирусный патоген может быть выбран из коронавируса OC43, аденовируса и/или риновируса/энтеровируса (пикорнавируса).

Количество, по меньшей мере, одного ЭПС в композиции настоящего раскрытия или композиции, используемой в соответствии со способами и применениями настоящего раскрытия, в пересчете на общую массу композиции может находиться в диапазоне 0,00005-0,5% масс./масс., предпочтительно 0,0001-0,1% масс./масс., более предпочтительно 0,0005-0,05% масс./масс.

ФИГУРЫ

На *Фигуре 1* представлен постадийный способ, используемый для получения ЭПС настоящего раскрытия.

На *Фигуре 2* представлено образование биопленки (%) различных бактериальных

патогенов при различных концентрациях ЭПС. Образование биопленки нормировали к необработанным бактериальным клеткам (контроль). Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение двух независимых экспериментов (N=2), проведенных в трех повторностях (n=3). * $p < 0,05$ по сравнению с контролем; * $p < 0,01$ по сравнению с контролем;

На *Фигуре 3* представлена оценка антибактериального эффекта повышения концентрации ЭПС на рост культур различных бактериальных патогенов в двух независимых экспериментах (N=2), проведенных в трех повторностях (n=3), при сравнении значений OD₆₀₀, среднее значение \pm стандартное отклонение. В качестве контроля использовали культуру роста в отсутствие ЭПС;

На *Фигуре 4* представлена жизнеспособность HNEpC, культивируемых с возрастающими концентрациями ЭПС в течение 2 и 24 ч. Жизнеспособность TO-PRO-3-отрицательных клеток через 2 и 24 ч культивирования в полной среде использовали в качестве контроля (C). Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение одного эксперимента (N=1), проведенного в трех повторностях (n=3);

На *Фигуре 5* представлено снижение адгезии на HNEpC *P. aeruginosa* и *S. aureus* в присутствии возрастающей концентрации ЭПС. Образование биопленки (адгезия клеток) нормировали к необработанным клеткам (контроль). Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего значения 2-4 независимых экспериментов (N=2-4), проведенных в трех повторностях (n=3). * $p < 0,01$ по сравнению с контролем;

На *Фигуре 6* представлен индекс эмульгирующей активности после смешивания различных концентраций раствора ЭПС с растительным маслом с последующим 24-часовым перерывом. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение трех независимых экспериментов (N=3);

На *Фигуре 7* представлена жизнеспособность HNEpC, инфицированных аденовирусом или риновирусом или обработанных ЭПС (400 мкг/мл) в течение 2 ч до или после вирусной инфекции высокой дозы. Клетки, культивируемые в течение 48 ч в полной среде ВЕВМ, использовали в качестве положительного контроля, тогда как клетки, инокулированные вирусом без обработки ЭПС, использовали в качестве отрицательного контроля. Значения представляют собой среднее значение TO-PRO-3-отрицательных (жизнеспособных клеток) \pm стандартное отклонение двух независимых экспериментов (N=2), проведенных в трех повторностях (n=3);

На *Фигуре 8A* и *Фигуре 8B* представлена жизнеспособность HNEpC, инфицированных аденовирусом или риновирусом, соответственно, или обработанных ЭПС (200 мкг/мл) в течение 2 ч до или после вирусной инфекции высокой дозы. Клетки, культивируемые в течение 48 ч в полной среде ВЕВМ, использовали в качестве положительного контроля, тогда как клетки, инокулированные вирусом без обработки ЭПС, использовали в качестве отрицательного контроля. Значения представляют собой среднее значение TO-PRO-3-отрицательных (жизнеспособных клеток) \pm стандартное отклонение двух независимых экспериментов (N=2), проведенных в трех повторностях

(n=3);

На *Фигуре 9* представлена жизнеспособность HNEpC, инфицированных аденовирусом или риновирусом, или предварительно обработанных ЭПС (400 мкг/мл) в течение 2 ч до инфицирования, или подвергнутых последующей обработке путем добавления ЭПС в течение 5 дней, или подвергнутых последующей обработке путем замены ЭПС каждый день в течение 5 дней. Жизнеспособность TO-PRO-3-отрицательных клеток через 5 дней культивирования в полной среде ВЕВМ использовали в качестве контроля. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение двух независимых экспериментов (N=2), проведенных в двух повторностях (n=2);

На *Фигуре 10А* и *Фигуре 10В* представлена жизнеспособность HNEpC, инфицированных аденовирусом или риновирусом, соответственно, или предварительно обработанных ЭПС (200 мкг/мл) в течение 2 ч до инфицирования, или подвергнутых последующей обработке путем добавления ЭПС в течение 5 дней, или подвергнутых последующей обработке путем замены ЭПС каждый день в течение 5 дней. Жизнеспособность TO-PRO-3-отрицательных клеток через 5 дней культивирования в полной среде ВЕВМ использовали в качестве контроля. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение двух независимых экспериментов (N=2), проведенных в трех повторностях (n=3);

На *Фигуре 11* представлена жизнеспособность HNEpC, инфицированных коронавирусом (1 TCID₅₀ или 0,001 TCID₅₀), или предварительно обработанных ЭПС (200-400 мкг/мл) за 2 ч до инфицирования, или подвергнутых последующей обработке путем добавления 1 дозы ЭПС в течение 5 дней. Жизнеспособность TO-PRO-3-отрицательных клеток через 5 дней культивирования в полной среде ВЕВМ использовали в качестве контроля. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение двух независимых экспериментов (N=2), проведенных в трех повторностях (n=3);

На *Фигуре 12А* и *Фигуре 12В* представлено соотношение ИЛ-8-продуцирующих HNEpC и ИЛ-6-продуцирующих HNEpC, соответственно, после 24 ч стимуляции образцом ЭПС (400 мкг/мл). Клетки, оставленные нестимулированными или стимулированные ИЛ-1 β , использовали в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно. Данные представляют собой результаты трех независимых экспериментов (N=3), планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение;

На *Фигуре 13А* и *Фигуре 13В* представлена А) экспрессия молекул активации/созревания (CD83, CD40 и CD25) на дендритных клетках (ДК), культивируемых с образцом ЭПС (400 мкг/мл) в течение 24 ч. Клетки, оставленные нестимулированными или стимулированные липополисахаридом (ЛПС, 1 мкг/мл), использовали в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно. Столбцы представляют собой среднее значение \pm SEM MFI указанных молекул. ДК, полученные из МКПК от двух различных доноров, использовали для экспериментов в двух повторностях (N=2, n=2). Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение; В) соотношение ИЛ-8-продуцирующих ДК и ИЛ-6-продуцирующих ДК после 24 ч стимуляции образцом ЭПС

(400 мкг/мл). Клетки, оставленные нестимулированными или стимулированные ЛПС, использовали в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно. Данные представляют собой результаты трех независимых экспериментов (N=2, n=2), планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В настоящем раскрытии предлагается новый подход к борьбе с патогенными инфекциями, основанный на мерах, которые заключаются в снижении или предотвращении адгезии патогенов к поверхностям. Таким образом, химические компоненты, выделяемые морскими бактериями, выделенными из неглубоких гидротермальных источников в море, окружающем остров Панарея (Италия), были исследованы с целью изучения их способности препятствовать, контролировать и/или ингибировать стадию обратимой адгезии патогенных микроорганизмов, таких как бактерии, грибки и вирусы, к биологическим и небиологическим поверхностям.

Бактерии из морских источников, а именно *Bacillus licheniformis* LP-T14, которые были депонированы в NCIMB (Национальная коллекция промышленных, пищевых и морских бактерий, NCIMB Ltd. Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Шотландия, Великобритания) 27 января 2020 г. Danstar Ferment A.G. (Poststrasse 30, Цуг, 6300, Швейцария) под депозитарным номером NCIMB 43557, обладают необычной способностью расти в экстремальных условиях окружающей среды, таких как высокая температура (50°C), соленая вода (электропроводность 42,90 мСм.см⁻¹), pH 5,4, высокая концентрация сероводорода и тяжелых металлов, и экзополисахариды, секретируемые таким морским штаммом, как было обнаружено, обладают уникальными физико-химическими свойствами.

Таким образом, раскрытие в настоящем описании демонстрирует способность нового экзополисахарида (ЭПС), высвобождаемого морским штаммом *Bacillus licheniformis* LP-T14, ослаблять вирулентность патогенной инфекции путем предотвращения и/или снижения адгезии патогенов к обработанным поверхностям по сравнению с необработанной поверхностью.

Настоящее раскрытие предоставляет ЭПС, его композицию, применение композиции и способ ослабления вирулентности микробной патогенной инфекции. В настоящем раскрытии вирулентность микробной патогенной инфекции ослабляется путем ингибирования или снижения колонизации микробных патогенов, ответственных за инфекцию, на биологических и/или небиологических поверхностях.

В контексте настоящего раскрытия используемый в настоящем описании термин «вирулентность» означает способность микроба (*m. e.* бактерии, вируса, дрожжей, грибка) размножаться и/или распространяться в живом организме, таким образом подавляя защитные механизмы организма. Следовательно, при использовании в качестве профилактического и/или терапевтического средства композиция настоящего раскрытия (косвенно) поддерживает иммунную систему хозяина, так что она может эффективно защищаться от любого типа патогенной микробной инфекции.

При этом в контексте настоящего раскрытия выражение «ингибирование или снижение колонизации» относится к любому действию, относящемуся к композиции, раскрытой в настоящей заявке, имеющему эффект нарушения установки патогенных бактерий на поверхности и, таким образом, их размножения, а именно, не ограничиваясь ими: ингибированию или сокращению образования ранней биопленки, разрушению или деградации (частичной или полной) ранней биопленки, разрушению или деградации (частичной или полной) развитой биопленки.

В контексте настоящего раскрытия выражение «ингибирование или снижение колонизации» относится к любому действию, связанному с композицией, раскрытой в настоящей заявке, имеющему эффект локального нарушения приживаемости вирусов в живом организме. Таким образом, композиция имеет эффект, не ограничиваясь ими, частичного или полного предотвращения интернализации вирусов внутри живой клетки и/или ограничения распространения вирионов из инфицированных клеток в соседние живые клетки.

ЭКЗОПОЛИСАХАРИДЫ И ИХ КОМПОЗИЦИИ

Бактерии из морских источников обладают необычной способностью расти в экстремальных условиях окружающей среды, таких как высокая температура, соленая вода, высокая концентрация сероводорода и тяжелых металлов, и экзополисахариды (ЭПС), продуцируемые морскими видами, как было обнаружено, обладают уникальными физическими свойствами и молекулярной структурой. Поэтому морские бактериальные ЭПС имеют широкий спектр биотехнологических, медицинских и фармацевтических применений благодаря своим особым характеристикам, таким как растворимость в воде, биоразлагаемость, биосовместимость, биоадгезивность, термостойкость, способность к набуханию или гелеобразованию.

ЭПС представляют собой полисахариды, которые после образования в результате бактериальной ферментации высвобождаются в культуральную среду. Они состоят из моносахаридов, связанных друг с другом гликозидной связью. Они могут состоять из одного или более типов моносахаридов и могут содержать повторяющиеся звенья моносахаридных блоков, упорядоченные или случайно распределенные. Скелет ЭПС может быть или линейным, или разветвленным, при этом ответвления могут быть различной длины и включать или одинаковые, или различные моносахаридные звенья.

В одном варианте осуществления, по меньшей мере, один выделенный ЭПС получают или могут получить путем ферментации морских бактерий и его приемлемого носителя. В другом варианте осуществления композиция настоящего раскрытия содержит, по меньшей мере, один выделенный ЭПС, полученный или доступный для получения путем ферментации грамположительных термофильных бактерий и его приемлемого носителя. В другом варианте осуществления композиция настоящего раскрытия содержит, по меньшей мере, один выделенный ЭПС, полученный или доступный для получения путем ферментации бактерий, принадлежащих к роду *Bacillus*, и его приемлемого носителя. В другом варианте осуществления композиция настоящего раскрытия содержит, по меньшей

мере, один выделенный ЭПС, полученный или доступный для получения путем ферментации бактерий, принадлежащих к видам *Bacillus licheniformis*, и его приемлемого носителя. В еще одном варианте осуществления композиция настоящего раскрытия содержит, по меньшей мере, один выделенный ЭПС, полученный или доступный для получения путем ферментации определенного бактериального штамма, термофильного морского экстремофила *Bacillus licheniformis* LP-T14, депонированного в Национальной коллекции промышленных, пищевых и морских бактерий (NCIMB) под NCIMB 43557, и его приемлемого носителя.

В варианте осуществления ферментацию морских бактерий проводят в ферментационной среде, содержащей морские соли (40 г/л), триптон (6 г/л), дрожжевой экстракт (6 г/л), пеногаситель (0,33 мл/л), декстрозу (12 г/л) и деионизированную H₂O (достат. кол.) при pH 5-8, в течение периода 20-40 ч при 40°C, при 30-50% оксигенации. В конце ферментации как морские бактерии, так и белки указанных морских бактерий могут быть инактивированы путем нагревания ферментационной среды в течение 1 ч при 85°C перед выделением ЭПС.

Термин «выделенный» следует рассматривать как означающий материал, удаленный из исходной среды, в которой он был получен естественным путем, например, в данном случае из ферментационной среды. Удаленный материал обычно очищают от окружающей среды, в которой он был получен. В варианте осуществления ЭПС в выделенной форме в идеале не содержит каких-либо значительных количеств бактериального штамма, который в некоторых вариантах осуществления может быть частично или полностью инактивирован. В некотором другом варианте осуществления ЭПС в выделенной форме содержит незначительное количество бактериальных штаммов. В дополнительном варианте осуществления ЭПС в выделенной форме содержит не более 10¹ КОЕ/г ЭПС, не более 10² КОЕ/г ЭПС, не более 10³ КОЕ/г ЭПС, не более 10⁴ КОЕ/г ЭПС или не более 10⁵ КОЕ/г. В варианте осуществления ЭПС в выделенной форме испытывает недостаток в поддающемся обнаружению количестве белков бактериального штамма, используемого для его получения, которые в некоторых вариантах осуществления могут быть частично или полностью инактивированы при анализе с помощью метода Лоури (Пример 4). В некоторых вариантах осуществления ЭПС в выделенной форме содержит незначительное количество белков бактериального штамма, используемого для его получения, при анализе с помощью метода Лоури (Пример 4). В некотором дополнительном варианте осуществления ЭПС в выделенной форме содержит не более 0,1% масс./масс., не более 0,5% масс./масс., не более 1% масс./масс., не более 2% масс./масс., не более 3% масс./масс. белков из бактериального штамма, используемого для его получения, при анализе с помощью метода Лоури (Пример 4). Более того, после отделения от большей части других компонентов бактериальной культуральной среды выделенный ЭПС настоящего раскрытия может быть сконцентрирован, не ограничиваясь ими, фильтрацией, ультрафильтрацией, испарением, сушкой распылением, или лиофилизацией, или их комбинацией. Следовательно, выделенный ЭПС настоящего

раскрытия находится в форме концентрата, суспензии, порошка или лиофилизированной формы.

В варианте осуществления выделенный ЭПС, содержащийся в композиции настоящего раскрытия, имеет, по меньшей мере, 1 средневесовое распределение молекулярной массы в диапазоне от 40 до 4000 кДа, от 40 до 2000 кДа, от 40 до 1000 кДа, от 40 до 500 кДа, от 40 до 400 кДа, от 40 до 300 кДа, от 40 до 200 кДа, как определено эксклюзионной хроматографией (HP-SEC). В варианте осуществления указанный выделенный ЭПС имеет, по меньшей мере, 2 средневесовых распределения молекулярной массы, каждое из которых находится в диапазоне от 40 до 4000 кДа, от 40 до 2000 кДа, от 40 до 1000 кДа, от 40 до 500 кДа, от 40 до 400 кДа, от 40 до 300 кДа, от 40 до 200 кДа, как определено эксклюзионной хроматографией (HP-SEC).

В варианте осуществления выделенный ЭПС настоящего раскрытия включает нейтральные гликозильные звенья, аминогликозильные звенья и кислотные гликозильные звенья. Примеры нейтральных гликозильных звеньев включают, но не ограничиваются ими, глюкозу, рамнозу, маннозу, ксилозу и галактозу. Примеры аминогликозильных звеньев включают, но не ограничиваются ими, галактозамин, глюкозамин, N-ацетилглюкозамин и N-ацетилгалактозамин. Примеры кислотных гликозильных звеньев включают, но не ограничиваются ими, уроновые кислоты, включая глюкуроновую кислоту, галактуроновую кислоту и гексуруновую кислоту. В одном варианте осуществления выделенный ЭПС настоящего раскрытия включает нейтральные гликозильные звенья, включающие глюкозу, рамнозу, маннозу, ксилозу и галактозу. В одном варианте осуществления выделенный ЭПС настоящего раскрытия включает аминогликозильные звенья, включающие N-ацетилглюкозамин и N-ацетилгалактозамин. В одном варианте осуществления выделенный ЭПС настоящего раскрытия может включать кислотные гликозильные звенья, включающие глюкуроновую кислоту. В одном варианте осуществления выделенный ЭПС настоящего раскрытия содержит от 30 до 90%, от 35 до 80%, от 40 до 75% нейтральных гликозильных звеньев по отношению к общему количеству гликозильных звеньев указанного ЭПС. В одном варианте осуществления выделенный ЭПС настоящего раскрытия содержит от 10 до 70%, от 15 до 65%, от 20 до 60% аминогликозильных звеньев по отношению к общему количеству гликозильных звеньев указанного ЭПС. В одном варианте осуществления выделенный ЭПС настоящего раскрытия содержит от 0 до 15%, от 0 до 10%, от 0 до 5% кислотных гликозильных звеньев по отношению к общему количеству гликозильных звеньев указанного ЭПС. В другом варианте осуществления выделенный ЭПС настоящего раскрытия структурно состоит из гликозильных звеньев, включающих маннозу, галактозу, глюкозу, N-ацетилгалактозамин и N-ацетилглюкозамин. В другом варианте осуществления выделенный ЭПС настоящего раскрытия не структурно состоит из рибозы, арабинозы, рамнозы, фруктозы и/или фукозы. В другом варианте осуществления выделенный ЭПС настоящего раскрытия по существу не содержит рибозы, арабинозы, рамнозы, фруктозы и/или фукозы.

Выделенный ЭПС настоящего раскрытия проявляет высокую эмульгирующую

активность даже при низкой концентрации (*m. e.* E24 50% достигалась при использовании только 50 мкг·мл⁻¹, что соответствует 0,005% ЭПС).

В одном варианте осуществления способ настоящего раскрытия включает введение эффективного количества, по меньшей мере, одного ЭПС, необязательно предоставленного в виде композиции. Выражение «эффективное количество» означает концентрацию выделенного ЭПС, достаточную для обеспечения ослабления вирулентности микробной патогенной инфекции путем ингибирования или снижения колонизации микробными патогенами на обработанной поверхности по сравнению с необработанной поверхностью. В некотором варианте осуществления концентрация выделенного ЭПС находится в диапазоне от 0,00005% до 0,5% масс./масс. в расчете на общую массу композиции. В некотором другом варианте осуществления концентрация выделенного ЭПС находится в диапазоне от 0,0001% до приблизительно 0,1% масс./масс. в расчете на общую массу композиции. В еще одном варианте осуществления концентрация выделенного ЭПС находится в диапазоне от 0,0005% до приблизительно 0,08% масс./масс. в расчете на общую массу композиции.

В другом варианте осуществления композиция настоящего раскрытия содержит, по меньшей мере, 0,000005% масс./масс. композиции, по меньшей мере, 0,00001% масс./масс. композиции, по меньшей мере, 0,00002% масс./масс. композиции, по меньшей мере, 0,00005% масс./масс. композиции, по меньшей мере, 0,0001% масс./масс. композиции, по меньшей мере, 0,0002% масс./масс. композиции, по меньшей мере, 0,0005% масс./масс. композиции, по меньшей мере, 0,001% масс./масс. композиции, по меньшей мере, 0,002% масс./масс. композиции, по меньшей мере, 0,004% масс./масс. композиции, по меньшей мере, 0,005% масс./масс. композиции, по меньшей мере, 0,0075% масс./масс. композиции, по меньшей мере, 0,01% масс./масс. композиции, по меньшей мере, 0,015% масс./масс. композиции, по меньшей мере, 0,02% масс./масс. композиции, по меньшей мере, одного выделенного ЭПС, обладающего способностью ослаблять вирулентность микробной патогенной инфекции путем ингибирования или снижения колонизации указанных микробных патогенов на обрабатываемой поверхности.

В другом варианте осуществления композиция настоящего раскрытия может представлять собой водный раствор или суспензию, содержащую приблизительно от 0,5 до 5000 мкг·мл⁻¹, приблизительно от 1 до 1000 мкг·мл⁻¹, приблизительно от 5 до 500 мкг·мл⁻¹, по меньшей мере, одного выделенного ЭПС, обладающего способностью ослаблять вирулентность микробной патогенной инфекции путем ингибирования или снижения колонизации указанными микробными патогенами обрабатываемой поверхности.

В другом варианте осуществления композиция настоящего раскрытия может представлять собой водный раствор или суспензию, содержащую, по меньшей мере, 50 нг·мл⁻¹, по меньшей мере, 100 нг·мл⁻¹, по меньшей мере, 200 нг·мл⁻¹, по меньшей мере, 500 нг·мл⁻¹, по меньшей мере, 1 мкг·мл⁻¹, по меньшей мере, 2 мкг·мл⁻¹, по меньшей мере, 5 мкг·мл⁻¹, по меньшей мере, 10 мкг·мл⁻¹, по меньшей мере, 20 мкг·мл⁻¹, по меньшей мере, 40 мкг·мл⁻¹, по меньшей мере, 50 мкг·мл⁻¹, по меньшей мере, 75 мкг·мл⁻¹, по меньшей мере, 100

мкг.мл⁻¹, по меньшей мере, 150 мкг.мл⁻¹, по меньшей мере, 200 мкг.мл⁻¹, по меньшей мере, одного выделенного ЭПС, обладающего способностью ослаблять вирулентность микробной патогенной инфекции путем ингибирования или снижения колонизации указанными микробными патогенами обрабатываемой поверхности.

Композиция, раскрытая в настоящем описании, содержит, по меньшей мере, один выделенный экзополисахарид, полученный из морских бактерий, и подходящий носитель. Выбор носителя(ей) будет осуществляться в соответствии с типом конечного состава. В варианте осуществления носитель композиции в настоящем описании может повышать биологическую активность (*m. e.* антибиопленочную и/или противовирусную активность) композиции, но не снижать ее. В другом варианте осуществления носитель композиции в настоящем описании является иммунологически инертным. В другом варианте осуществления носитель композиции в настоящем описании может представлять собой комбинацию одного или более носителей.

В одном варианте осуществления композиция, раскрытая в настоящем описании, может дополнительно содержать другой ЭПС. В еще одном варианте осуществления композиция, раскрытая в настоящем описании, может дополнительно содержать полиглутаминовую кислоту.

В одном варианте осуществления, помимо своей антибиопленочной активности (например, *in vitro*), выделенный ЭПС, как описано в настоящей заявке, необязательно предоставленный в виде композиции, не оказывает отрицательного влияния на рост патогенных бактерий, и, в более общем смысле, присутствие ЭПС не влияет на скорость роста всех исследуемых бактериальных штаммов. В другом варианте осуществления выделенный ЭПС, как описано в настоящей заявке, необязательно предоставленный в виде композиции, не оказывает никакого бактерицидного, бактериостатического или антибиотического действия независимо от его концентрации и от рассматриваемых патогенных бактерий. В другом варианте осуществления выделенный ЭПС, как описано в настоящей заявке, необязательно предоставленный в виде композиции, также сохраняет целостность естественной микробиоты, присутствующей в биологических тканях. В другом варианте осуществления выделенный ЭПС, как описано в настоящей заявке, необязательно предоставленный в виде композиции, не вызывает цитотоксичности у объекта, которому предполагается их получить, независимо от его концентрации и продолжительности инкубации.

В еще одном варианте осуществления выделенный ЭПС, как описано в настоящей заявке, необязательно предоставленный в виде композиции, по существу не обладает способностью индуцировать иммунный (клеточный и/или гуморальный) ответ. В некотором варианте осуществления выделенный ЭПС, как описано в настоящей заявке, необязательно предоставленный в виде композиции, не обладает способностью индуцировать какой-либо иммунологический ответ, такой как воспалительный ответ и/или анергия. В другом варианте осуществления выделенный ЭПС, как описано в настоящей заявке, необязательно предоставленный в виде композиции, не оказывает какого-либо

обнаруживаемого влияния на созревание дендритных клеток в иммуностимулирующие антиген-презентирующие клетки. В еще одном варианте осуществления выделенный ЭПС, как описано в настоящей заявке, необязательно предоставленный в виде композиции, не может индуцировать экспрессию CD83, CD40 и/или CD25 из дендритных клеток. В другом варианте осуществления выделенный ЭПС, как описано в настоящей заявке, необязательно предоставленный в виде композиции, не вызывает пролиферацию клеток, экспрессирующих ИЛ-6 и/или ИЛ-8. В некотором другом варианте осуществления выделенный ЭПС, как описано в настоящей заявке, необязательно предоставленный в виде композиции, не индуцирует выработку медиаторов воспаления, таких как цитокины, хемокины и/или простагландины. В еще одном варианте осуществления выделенный ЭПС, как описано в настоящей заявке, необязательно предоставленный в виде композиции, не индуцирует выработку ИЛ-6 и/или ИЛ-8.

АНТИБИОПЛЕНОЧНАЯ АКТИВНОСТЬ

В случае бактериальных патогенов патогенные биопленки могут развиваться на различных слизистых оболочках и эпителиальных клетках, ротовой, назальной, легочной, пищеварительной, кожной, офтальмологической и урогенитальной, а также на абиотических и гидрофобных неполярных поверхностях (например, тефлоне, стекле и пластике), таких как центральные венозные, мочевые и перитонеальные диализные катетеры, эндотрахеальные трубки, кардиостимуляторы, протезы суставов и механические клапаны сердца.

Микробные патогены, внедренные в такую матрицу, могут выживать, развивая свою собственную экосистему, в которой они защищают себя от метаболитов или веществ, генерируемых иммунной защитой организма, а также от экзогенных воздействий, в то время как приобретая новые способности посредством межклеточного взаимодействия (например, чувство кворума), такие как гены устойчивости, чтобы адаптироваться и противостоять окружающей среде. Следовательно, клинически известно, что образование биопленки является ключевым фактором в возникновении и сохранении некоторых трудностей при лечении инфекций. Например, выработка экзополисахаридов из патогенных бактерий защищает их и делает невосприимчивыми к антимикробной обработке.

Следовательно, настоящее раскрытие, направленное на ослабление вирулентности бактериальной инфекции, направлено не только на активные или развившиеся бактериальные инфекции, но также на ингибирование начального возникновения патогенеза, ведущего к бактериальной инфекции, а именно на раннее образование биопленки, при котором бактерии обратимо прилипают к поверхности.

В одном варианте осуществления композиция настоящего раскрытия оказывает ингибирующее действие на образование биопленки в отношении различных бактериальных патогенов, инкубируемых в оптимальных условиях на синтетической поверхности, по сравнению с необработанной поверхностью. В другом варианте осуществления предварительная обработка поверхности ЭПС в соответствии с настоящим раскрытием

ингибирует раннее образование биопленки даже при нанесении в низкой концентрации по сравнению с необработанной поверхностью. В другом варианте осуществления применение композиции настоящего раскрытия приводит к снижению образования биопленки от различных бактериальных патогенов, инкубируемых в оптимальных условиях на синтетической поверхности. В другом варианте осуществления предварительная обработка поверхности композицией снижает раннее образование биопленки даже при нанесении в низкой концентрации по сравнению с необработанной поверхностью. В другом варианте осуществления композиция настоящего раскрытия снижает, по меньшей мере, на 1%, по меньшей мере, на 2%, по меньшей мере, на 3%, по меньшей мере, на 4%, по меньшей мере, на 5%, по меньшей мере, на 6%, по меньшей мере, на 7%, по меньшей мере, на 8%, по меньшей мере, на 9%, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере, на 11%, по меньшей мере, на 12%, по меньшей мере, на 13%, по меньшей мере, на 14%, по меньшей мере, на 15% образование патогенной бактериальной биопленки на синтетической поверхности по сравнению с необработанной синтетической поверхностью. В другом варианте осуществления композиция настоящего раскрытия, имеющая концентрацию ЭПС, по меньшей мере, 200 мкг/мл, снижает, по меньшей мере, на 5%, по меньшей мере, на 6%, по меньшей мере, на 7%, по меньшей мере, на 8%, по меньшей мере, на 9%, по меньшей мере, на 10% образование патогенной бактериальной биопленки на синтетической поверхности по сравнению с необработанной синтетической поверхностью. В другом варианте осуществления композиция настоящего раскрытия, имеющая концентрацию ЭПС 400 мкг/мл, снижает, по меньшей мере, на 15%, по меньшей мере, на 16%, по меньшей мере, на 17%, по меньшей мере, на 18%, по меньшей мере, на 19%, по меньшей мере, на 20% образование патогенной бактериальной биопленки на синтетической поверхности по сравнению с необработанной синтетической поверхностью.

В одном варианте осуществления ЭПС настоящего раскрытия обладает способностью снижать и/или ограничивать последствия внедрения бактериальной биопленки, независимо от ее происхождения, на биологических поверхностях. Действительно, в дополнение к продемонстрированному профилактическому эффекту, снижающему и/или предотвращающему образование биопленки, промывание поверхности композициями в соответствии с настоящим раскрытием может также иметь терапевтическую активность благодаря своей способности удалять патогенные бактериальные клетки из биопленки. В другом варианте осуществления композиции в соответствии с настоящим описанием способствуют разрушению или растворению биопленки (уменьшению уже существующей колонизации и предварительно сформированной или накопленной биопленки) на поверхности. В некотором варианте осуществления композиции в соответствии с настоящим описанием способствуют разрушению или растворению ранней биопленки на поверхности. В другом варианте осуществления обработка поверхности композициями в соответствии с настоящим раскрытием предотвращает, снижает и/или ингибирует повторную колонизацию бактерий на поверхности. В другом варианте осуществления композиция ЭПС настоящего раскрытия

снижает, по меньшей мере, на 1%, по меньшей мере, на 2%, по меньшей мере, на 3%, по меньшей мере, на 4%, по меньшей мере, на 5%, по меньшей мере, на 6%, по меньшей мере, на 7%, по меньшей мере, на 8%, по меньшей мере, на 9%, по меньшей мере, на 10% образование патогенной бактериальной биопленки на биологической поверхности по сравнению с необработанной биологической поверхностью. В другом варианте осуществления композиция настоящего раскрытия, имеющая концентрацию ЭПС, по меньшей мере, 200 мкг/мл, снижает, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере, на 11%, по меньшей мере, на 12%, по меньшей мере, на 13%, по меньшей мере, на 14%, по меньшей мере, на 15%, по меньшей мере, на 16%, по меньшей мере, на 17%, по меньшей мере, на 18%, по меньшей мере, на 19%, по меньшей мере, на 20% образование патогенной бактериальной биопленки на биологической поверхности по сравнению с необработанной биологической поверхностью. В другом варианте осуществления композиция настоящего раскрытия, имеющая концентрацию ЭПС 400 мкг/мл, снижает, по меньшей мере, на 15%, по меньшей мере, на 16%, по меньшей мере, на 17%, по меньшей мере, на 18%, по меньшей мере, на 19%, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 21%, по меньшей мере, на 22%, по меньшей мере, на 23%, по меньшей мере, на 24%, по меньшей мере, на 25%, по меньшей мере, на 26%, по меньшей мере, на 27%, по меньшей мере, на 28%, по меньшей мере, на 29%, по меньшей мере, на 30% образование патогенной бактериальной биопленки на биологической поверхности по сравнению с необработанной биологической поверхностью.

В другом варианте осуществления обработка поверхности композициями в соответствии с настоящим раскрытием проводится не позднее 8 ч, не позднее 6 ч, не позднее 4 ч, не позднее 3 ч, не позднее 2 ч, не позднее 1 ч после контакта с патогенными бактериями. Обработка поверхности композициями в соответствии с настоящим раскрытием также может применяться непосредственно после контакта с патогенными бактериями. Обработка поверхности композициями в соответствии с настоящим раскрытием также может применяться в качестве превентивной меры перед любым контактом с патогенными бактериями. Таким образом, обработка поверхности композициями в соответствии с настоящим раскрытием может применяться в течение, по меньшей мере, 5 мин, по меньшей мере, 10 мин, по меньшей мере, 15 мин, по меньшей мере, 30 мин, по меньшей мере, 60 мин, по меньшей мере, 2 ч, по меньшей мере, 3 ч, по меньшей мере, 4 ч, по меньшей мере, 6 ч, по меньшей мере, 8 ч до потенциального контакта с патогенными бактериями.

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ

Вирусные заболевания или инфекции передаются вирусами, которые атакуют организм в одной или более определенных точках. Например, объект может заразиться вирусным заболеванием при непосредственном контакте с другим уже больным объектом, т. е. через биологические жидкости или аэрозоли, также как при контакте с инфицированными поверхностями.

После инокуляции в организм вирус проникает в определенные клетки-хозяина,

переключает клеточный механизм на размножение, и синтезированные таким образом вирионы, в свою очередь, распространяются и инфицируют соседние клетки.

Настоящее раскрытие также направлено на ослабление вирулентности вирусной инфекции путем ингибирования и/или снижения колонизации вирусных патогенов на обрабатываемой поверхности. Другими словами, снижение и/или ингибирование колонизации поверхности вирусными патогенами достигается за счет снижения смертности живых клеток по сравнению с необработанными клетками и/или за счет предотвращения высвобождения вирионов, также как их распространения в соседние живые клетки.

В одном варианте осуществления предварительная обработка живых клеток композициями в соответствии с настоящим раскрытием перед инокуляцией вируса подчеркивает профилактический характер композиций ЭПС в отношении вирусных инфекций независимо от рассматриваемого вируса. В варианте осуществления предварительная обработка живых клеток композициями в соответствии с настоящим раскрытием перед инокуляцией вируса снижает смертность клеток по сравнению с необработанными клетками. В еще одном варианте осуществления предварительную обработку живых клеток (*m. e.* перед инокуляцией вируса живых клеток) композициями в соответствии с настоящим раскрытием вводят в виде однократной дозы перед инокуляцией вируса. В другом варианте осуществления предварительная обработка живых клеток композициями в соответствии с настоящим раскрытием перед инокуляцией вируса увеличивает выживаемость клеток после вирусной инфекции (независимо от рассматриваемого вируса) по сравнению с выживаемостью необработанных клеток. В другом варианте осуществления предварительная обработка живых клеток композициями в соответствии с настоящим раскрытием перед инокуляцией вируса (1 TCID₅₀) увеличивает выживаемость клеток, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере, на 11%, по меньшей мере, на 12%, по меньшей мере, на 13%, по меньшей мере, на 14%, по меньшей мере, на 15% по сравнению с выживаемостью необработанных клеток. В другом варианте осуществления предварительная обработка живых клеток композициями в соответствии с настоящим раскрытием перед инокуляцией вируса (0,001 TCID₅₀) увеличивает выживаемость клеток, по меньшей мере, на 15%, по меньшей мере, на 16%, по меньшей мере, на 17%, по меньшей мере, на 18%, по меньшей мере, на 19%, по меньшей мере, на 20% по сравнению с выживаемостью необработанных клеток.

В одном варианте осуществления последующая обработка живых клеток (*m. e.* после инокуляции вируса живых клеток) композициями в соответствии с настоящим раскрытием предотвращает высвобождение вирионов, также как их распространение в соседние клетки. В другом варианте осуществления последующая обработка живых клеток (*m. e.* после инокуляции вируса живых клеток) композициями в соответствии с настоящим раскрытием предоставляет терапевтический эффект, который снижает вирулентность вирусной инфекции по сравнению с необработанными клетками в течение, по меньшей мере, 1 дня, по меньшей мере, 2 дней, по меньшей мере, 3 дней, по меньшей мере, 4 дней, по меньшей мере, 5 дней инокуляции вируса. В еще одном варианте осуществления последующую

обработку живых клеток (*m. e.* после инокуляции вируса живых клеток) композициями в соответствии с настоящим раскрытием вводят в виде однократной дозы после вирусной инокуляции. В другом варианте осуществления, не ограничиваясь какой-либо теорией, введение композиций ЭПС в соответствии с настоящим раскрытием в живые клетки человека создает внеклеточный «барьер», который стерически препятствует интернализации вирусов независимо от рассматриваемого вируса. В варианте осуществления последующая обработка живых клеток композициями ЭПС в соответствии с настоящим раскрытием после инокуляции вируса увеличивает выживаемость клеток по сравнению с выживаемостью необработанных клеток. В другом варианте осуществления последующая обработка живых клеток композициями ЭПС в соответствии с настоящим раскрытием после инокуляции вируса (1 TCID₅₀) увеличивает выживаемость клеток, по меньшей мере, на 1%, по меньшей мере, на 2%, по меньшей мере, на 3%, по меньшей мере, на 4% по сравнению с выживаемостью необработанных клеток. В некотором другом варианте осуществления последующая обработка живых клеток композициями в соответствии с настоящим раскрытием после инокуляции вируса (0,001 TCID₅₀) увеличивает выживаемость клеток, по меньшей мере, на 25%, по меньшей мере, на 26%, по меньшей мере, на 27%, по меньшей мере, на 28%, по меньшей мере, на 29%, по меньшей мере, на 30% по сравнению с выживаемостью необработанных клеток.

В другом варианте осуществления обработка поверхности композициями в соответствии с настоящим раскрытием предотвращает, снижает и/или ингибирует повторную колонизацию вирусами поверхности.

В другом варианте осуществления обработка поверхности композициями в соответствии с настоящим раскрытием проводится не позднее 8 ч, не позднее 6 ч, не позднее 4 ч, не позднее 3 ч, не позднее 2 ч, не позднее 1 ч после контакта с вирусом. Обработка поверхности композициями ЭПС в соответствии с настоящим раскрытием также может применяться непосредственно после контакта с вирусом. Обработка поверхности композициями в соответствии с настоящим раскрытием также может применяться в качестве превентивной меры перед любым контактом с вирусом. Таким образом, обработка поверхности композициями в соответствии с настоящим раскрытием может проводиться, по меньшей мере, 5 мин, по меньшей мере, 10 мин, по меньшей мере, 15 мин, по меньшей мере, 30 мин, по меньшей мере, 60 мин, по меньшей мере, 2 ч, по меньшей мере, 3 ч, по меньшей мере, 4 ч, по меньшей мере, 6 ч, по меньшей мере, 8 ч до потенциального контакта с вирусом.

ПАТОГЕНЫ

Композиции в соответствии с настоящим раскрытием являются эффективными для ослабления вирулентности микробной патогенной инфекции путем ингибирования или снижения колонизации микробных организмов, таких как бактерии, грибы, дрожжи и вирусы, на поверхностях, обработанных заявленной композицией.

В варианте осуществления композиции в соответствии с настоящим раскрытием являются эффективными для ослабления вирулентности бактериальной патогенной

инфекции путем ингибирования или снижения колонизации бактерий. В некотором варианте осуществления бактерии, для которых раскрытие может иметь значимость в отношении специального применения, включают как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии, такие как, но не ограничиваясь ими, бактерии, принадлежащие к видам *Staphylococcus*, видам *Streptococcus*, видам *Enterococcaceae* и *Enterococcus*, видам *Neisseria* или *Branhamella*, видам *Bacillus*, видам *Propionibacterium*, видам *Corynebacterium*, видам *Listeria*, видам *Clostridium*, видам *Escherichia*, видам *Enterobacter*, видам *Proteus*, видам *Pseudomonas*, видам *Klebsiella*, видам *Salmonella*, видам *Shigella*, видам *Campylobacter*, видам *Actinomyces*, видам *Actinobacillus*, видам *Acinetobacter*, видам *Aggregatibacter*, видам *Fusobacterium*, видам *Haemophilus*, видам *Mycobacterium*, видам *Pseudomonas*, видам *Porphyromonas*, видам *Bacteriodes*, видам *Treponema*, видам *Prevotella* или видам *Eubacterium*. В некотором другом варианте осуществления бактерии, для которых раскрытие может иметь значимость в отношении специального применения, включают как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии, такие как, но не ограничиваясь ими, *Staphylococcus aureus*, метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pyogenes* (группа А), *Streptococcus spp.* (группа *viridans*), *Streptococcus agalactiae* (группа В), *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (анаэробные виды), *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. gordonii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium tetani*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Campylobacter jejuni*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Acinetobacter baumannii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteriodes forcythus*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* или *Eubacterium nodatum*. В варианте осуществления виды бактерий представляют собой *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *Moraxella catharalis*, *Propionibacterium acnes* (также известные как *Cutibacterium acnes*) или их комбинацию. В еще одном варианте осуществления виды бактерий представляют собой *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catharalis*, *Propionibacterium acnes* (также известные как *Cutibacterium acnes*) или их комбинацию.

Таким образом, композиции в соответствии с настоящим раскрытием могут быть пригодны для ослабления вирулентности бактериальной патогенной инфекции путем ингибирования и/или снижения колонизации на обработанных поверхностях для предотвращения, ослабления микробной(ых) инфекции(й) и/или снижения вероятности микробной(ых) инфекции(й), включая, но не ограничиваясь ими: бактериемию, септицемию, пневмонию, менингит, остеомиелит, эндокардит, кариес, пародонтоз, синусит, ринит, конъюнктивит, инфекции мочевыводящих путей, столбняк, гангрену,

колит, острый гастроэнтерит, импетиго, акне, розацеа, красные язвы, атопический дерматит, псориаз, раневые инфекции, ожоговые инфекции, фасциит, бронхит или различные абсцессы, нозокомиальные инфекции и/или условно-патогенные инфекции.

В другом варианте осуществления композиции в соответствии с настоящим раскрытием являются эффективными для ослабления вирулентности вирусной патогенной инфекции путем ингибирования или снижения колонизации вирусов на поверхности или эпителии. Композиции ЭПС в соответствии с настоящим раскрытием являются эффективными в отношении определенных вирусов, таких как ВИЧ, вирус простого герпеса, цитомегаловирус и/или вирус папилломы человека, а также в отношении риновируса, ортомиксовируса, парамиксовируса, коронавируса, аденовируса, гриппа, вируса саркомы Рауса, парагриппа, метапневмовируса и/или вируса Эпштейна-Барр.

Таким образом, композиции в соответствии с настоящим раскрытием являются также эффективными для предотвращения и/или лечения инфекций, таких как простуда, грипп, герпес, генитальный герпес, бородавки и/или эффективными для предотвращения инфекций ВИЧ и SARS-CoV-2. В некотором варианте осуществления вирусы представляют собой вирусы гриппа, коронавируса, SARS-CoV-2, парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус или их комбинацию.

ПРИМЕНЕНИЕ НА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОВЕРХНОСТЯХ

В одном варианте осуществления композиции и способы в соответствии с настоящим раскрытием применимы к тканям человека или в более общем смысле к тканям животных, включающим, но не ограничиваясь ими: клетки, эпителиальные клетки и/или слизистую оболочку. Рассматриваемые биологические поверхности настоящего раскрытия включают, но не ограничиваются ими: полость рта, поверхность зубов, полость носа, дыхательные пути, горло, уши, офтальмологическую область, мочеполовой тракт, кожу, кожу волосистой части головы, волосы и/или ногти. В некотором варианте осуществления способ введения композиций в соответствии с настоящим раскрытием представляет собой назальный, респираторный и/или трансбуккальный пути.

В варианте осуществления композиции и способы в соответствии с настоящим раскрытием можно вводить здоровым объектам, имеющим неповрежденные и здоровые ткани, но они являются пригодными, когда у объектов повреждены ткани после раны или царапины, что может привести к местным и/или системным инфекциям. В другом варианте осуществления композиции и способы в соответствии с настоящим раскрытием можно вводить объектам, предрасположенным к инфицированию. В другом варианте осуществления композиции и способы в соответствии с настоящим раскрытием можно вводить инфицированным объектам.

В варианте осуществления объекты, которым вводят композицию и способы в соответствии с настоящим раскрытием, представляют собой животных. В другом варианте осуществления объекты, которым вводят композицию и способы в соответствии с настоящим раскрытием, представляют собой млекопитающих. В еще одном варианте осуществления объекты, которым вводят композицию и способы в соответствии с

настоящим раскрытием, представляют собой людей.

В варианте осуществления для интраназального введения композиции в соответствии с настоящим раскрытием можно вводить в форме мазей или гелей для нанесения непосредственно на слизистую оболочку носа. В другом варианте осуществления композиции в соответствии с настоящим раскрытием можно вводить в виде назальных капель, жидкого спрея, например, с помощью аэрозольного ингалятора в пластиковом флаконе, клапанного мешка и/или дозирующего ингалятора. Назальные растворы обычно представляют собой водные растворы, предназначенные для введения в носовые ходы в виде капель или спреев, и готовятся таким образом, чтобы во многих отношениях они были похожи на назальные выделения, чтобы можно было поддерживать нормальное биение ресничек. В одном варианте осуществления водные назальные растворы обычно являются изотоническими или могут быть гипертоническими, обеспечивая конечные концентрации физиологического раствора от 0,1% до 10% масс./масс. в расчете на общую массу назальной композиции. В некоторых вариантах осуществления водные назальные растворы обычно являются изотоническими или могут быть гипертоническими, обеспечивая конечные концентрации физиологического раствора от 0,5% до 5% масс./масс. в расчете на общую массу назальной композиции. В некотором другом варианте осуществления водные назальные растворы обычно являются изотоническими или могут быть гипертоническими, обеспечивая конечные концентрации физиологического раствора от 0,7% до 3% масс./масс. в расчете на общую массу назальной композиции.

Для респираторного введения, также известного как ингаляция, распыление или инсуффляция, композиции в соответствии с настоящим раскрытием вводят с помощью аэрозолей под давлением в виде мелкодисперсной порошкообразной суспензии или в виде раствора в сочетании со сжиженным газом-пропеллентом. При высвобождении через подходящий клапан и пероральный адаптер композиция продвигается в дыхательные пути объекта. Мелкодисперсные туманы образуются аэрозолями под давлением (т. е. инсуффлятором, небулайзером), и поэтому их использование считается предпочтительным. Аэрозоли под давлением могут содержать подходящий пропеллент, такой как дихлордифторметан, трихлорфторметан, дихлортетрафторэтан, азот, диоксид углерода или другой подходящий газ. В случае аэрозоля под давлением стандартная дозировка может быть определена путем обеспечения клапана для подачи отмеренного количества.

Композиции в соответствии с настоящим раскрытием можно наносить местно на слизистую ткань полости рта, на десневую ткань полости рта и/или на поверхность зубов некоторыми стандартными способами. Например, ткань десны или слизистой оболочки можно промыть раствором (например, ополаскивателем для полости рта, спреем для полости рта), содержащим композиции в соответствии с настоящим раскрытием; или если композиции в соответствии с настоящим раскрытием находятся в форме средства для чистки зубов (например, зубной пасты, зубного геля или зубного порошка), ткань десны/слизистой оболочки или зубы омываются жидкостью и/или пеной, образующейся

при чистке зубов. Другие неограничивающие примеры включают нанесение неабразивного геля или пасты, содержащих заявленную композицию, непосредственно на ткань десны/слизистой оболочки или на зубы с использованием или без приспособления для ухода за полостью рта, описанного ниже; жевательную резинку, содержащую заявленную композицию; жевание или рассасывание таблетки, пастилки или растворимой полоски для дыхания, содержащей заявленную композицию. В некотором варианте осуществления способы нанесения композиции на ткань десны/слизистой оболочки и/или зубы представляют собой полоскание раствором для полоскания полости рта или чистку средством для ухода за зубами. В некотором другом варианте осуществления способы нанесения композиций в соответствии с настоящим раскрытием на ткань десны/слизистой оболочки и/или зубы осуществляются с помощью аэрозольного ингалятора в пластиковом флаконе или клапанного мешка. Другие способы местного нанесения композиций ЭПС в соответствии с настоящим раскрытием на ткань десны/слизистой оболочки и поверхности зубов будут очевидны специалисту в данной области техники.

Для вагинального введения композиции в соответствии с настоящим раскрытием могут быть представлены в виде pessaries, тампонов, суппозитория, кремов, гелей, паст, пен или спреев, содержащих в дополнение к активному ингредиенту такие носители, которые, как известно в данной области техники, являются подходящими.

При составлении для местного введения композиции в соответствии с настоящим раскрытием могут содержать ингредиенты, типичные для местных фармацевтических препаратов, медицинских изделий, таких как перевязочные материалы для ран или косметические композиции, такие как носитель, наполнитель или среда. В частности, носитель, наполнитель или среда совместимы с тканями, на которые они будут наноситься, такими как ротовая полость, поверхность зубов, полость носа, дыхательные пути, горло, уши, офтальмологическая область, мочеполовой тракт, кожа, кожа волосистой части головы, волосы, ногти или слизистая оболочка. Композиции и компоненты раскрытия подходят для контакта с инфицированными тканями или для применения у объектов в целом без чрезмерной токсичности, несовместимости, нестабильности, аллергической реакции и подобного. При необходимости композиции ЭПС в соответствии с настоящим раскрытием могут содержать любой дополнительный ингредиент, стандартно используемый в рассматриваемых областях.

В отношении их формы композиции в соответствии с настоящим раскрытием могут включать растворы, эмульсии (включая микроэмульсии), суспензии, кремы, лосьоны, гели, порошки или другие типичные твердые или жидкие композиции, используемые для нанесения на кожу и другие ткани, где композиции могут быть использованы. Такие композиции могут содержать: противомикробные вещества, увлажнители и гидратирующие вещества, улучшающие проникновение вещества, консерванты, эмульгаторы, натуральные или синтетические масла, растворители, поверхностно-активные вещества, детергенты, гелеобразователи, смягчающие вещества, антиоксиданты, отдушки, наполнители, загустители, воски, поглотители запахов, красители, красящие

вещества, порошки, регулирующие вязкость вещества или воду и необязательно включать анестетики, противозудные активные вещества, растительные экстракты, кондиционирующие агенты, затемняющие или осветляющие агенты, блестки, увлажнители, слюду, минералы, полифенолы, силиконы или их производные, солнцезащитные средства, витамины или фитопрепараты. В еще одном варианте осуществления композиции ЭПС в соответствии с настоящим раскрытием составлены с использованием вышеупомянутых ингредиентов, предоставляя долговременную стабильность композиций ЭПС, которая может быть необходима для продолжительного или длительного лечения.

В отношении способа введения носитель композиций в соответствии с настоящим раскрытием может быть выбран для обеспечения времени удержания композиции на обрабатываемой поверхности в течение, по меньшей мере, 1 минуты, или, по меньшей мере, 5 минут, или, по меньшей мере, 10 минут, или, по меньшей мере, 15 минут, или, по меньшей мере, 20 минут, или, по меньшей мере, 25 минут, или, по меньшей мере, 30 минут, или, по меньшей мере, 1 ч, или, по меньшей мере, 2 ч, или, по меньшей мере, 4 ч, или, по меньшей мере, 8 ч после нанесения.

В случае жидких составов объем заявленной композиции можно регулировать в соответствии с оценкой общей площади поверхности обрабатываемой ткани для данного человека или животного. Например, от приблизительно 1 мл до приблизительно 30 мл, например, от приблизительно 3 мл до приблизительно 25 мл или от приблизительно 5 мл до приблизительно 20 мл для состава для полоскания полости рта; или от приблизительно 0,05 мл до приблизительно 2 мл, например, от приблизительно 0,1 мл до приблизительно 1,5 мл для состава назального спрея. В некотором варианте осуществления объем заявленной композиции, предназначенной для назальных составов, составляет от приблизительно 50 мкл до приблизительно 300 мкл на ноздрю или от приблизительно 100 мкл до 200 мкл на ноздрю для доставки аэрозоля с помощью клапанного мешка. В некотором другом варианте осуществления объем заявленной композиции, предназначенной для назальных составов, составляет приблизительно от 0,3 мл до 2 мл или приблизительно от 0,6 мл до 1,2 мл на ноздрю при доставке с помощью ингалятора в пластиковом флаконе. Другие среды доставки, такие как растворимые полоски, могут иметь дозировки, выведенные из этих диапазонов, с учетом поправок на концентрации и других факторов, известных специалисту в данной области техники.

Суточная дозировка композиций в соответствии с настоящим раскрытием обычно зависит от состояния объекта (здоровый для профилактического лечения или больной для радикального лечения), также как от обрабатываемой поверхности. Суточная дозировка может вводиться один раз в день или разделена на две или более дозировок, вводимых два или более раз в день.

В варианте осуществления композиции в соответствии с настоящим раскрытием вводят ежедневно в течение периода времени, составляющего, по меньшей мере, 1 день, по меньшей мере, 3 дня, по меньшей мере, 5 дней, или, по меньшей мере, 1 неделю, или, по

меньшей мере, 2 недели, или, по меньшей мере, 3 недели, или, по меньшей мере, 4 недели, или, по меньшей мере, 1 месяц, или, по меньшей мере, 2 месяца, или, по меньшей мере, 3 месяца. В одном неограничивающем варианте осуществления может быть желательно, чтобы обработка продолжалась до тех пор, пока на обработанной поверхности не перестанут обнаруживаться патогенные бактерии. В другом варианте осуществления композиции ЭПС в соответствии с настоящим раскрытием вводят объекту в качестве профилактического лечения, например, один раз в день или два раза в день в течение неопределенного периода времени.

Композиции в соответствии с настоящим раскрытием можно использовать отдельно или в комбинации с другим антибиотиком/противомикробным/противовирусным средством. Например, ингибирование образования биопленки сделало бы микробный патоген гораздо более восприимчивым к действию другого антибиотика/противомикробного/противовирусного средства, такого как те, которые обычно используются для обработки специфических микробных патогенов. Подобным образом композиции в соответствии с настоящим раскрытием также можно использовать отдельно или в комбинации с другим ЭПС.

ПРИМЕНЕНИЕ НА НЕБИОЛОГИЧЕСКИХ ПОВЕРХНОСТЯХ

В варианте осуществления композиции в соответствии с настоящим раскрытием также можно наносить на небиологические поверхности, включая, но не ограничиваясь ими, гидрофобные и неполярные поверхности. По существу любое медицинское устройство, которое подвержено колонизации патогенными микроорганизмами и/или покрыто, по меньшей мере, частично биопленкой, подходит для применения на практике настоящего раскрытия, включая контактные линзы, футляры для контактных линз, контейнеры с офтальмологическими растворами и растворами для обработки линз или другие родственные устройства, устройства для измерения анализируемого вещества, такие как электрохимические сенсоры для определения глюкозы, устройства для доставки лекарственных средств, такие как инсулиновые помпы, устройства, улучшающие слух, такие как кохлеарные импланты, устройства, контактирующие с мочой (например, уретральные стенты, мочевые катетеры), устройства, контактирующие с кровью (включая сердечно-сосудистые стенты, устройства для венозного доступа, клапаны, сосудистые трансплантаты, гемодиализные и билиарные стенты) или устройства, контактирующие с тканями тела и жидкостью тканей (включая биосенсоры, импланты и искусственные органы). Медицинские устройства, которые можно обрабатывать композициями, включают, но не ограничиваются ими, постоянные катетеры (*например*, центральные венозные катетеры, диализные катетеры, туннельные центральные венозные катетеры длительного действия, центральные венозные катетеры кратковременного действия, периферически вводимые центральные катетеры, периферические венозные катетеры, катетеры Свана-Ганца в легочной артерии, мочевые катетеры или перитонеальные катетеры), устройства для длительного мочеиспускания, мочевыделительные устройства для связывания тканей, сосудистые трансплантаты, порты для сосудистых катетеров,

дренажные трубки для ран, вентрикулярные катетеры, шунты при гидроцефалии, церебральные или спинальные шунты, сердечные клапаны, вспомогательные устройства для сердца (например, левожелудочковые устройства вспомогательного кровообращения), капсулы кардиостимулятора, устройства для лечения недержания мочи, имплантаты полового члена, небольшие или временные замены суставов, расширитель для мочевого пузыря, канюли, эластомеры, гидрогели, хирургические инструменты, стоматологические инструменты, трубки, такие как внутривенные трубки, дыхательные трубки, стоматологические трубки с водой, стоматологические дренажные трубки или трубки для кормления, ткани, бумагу, индикаторные полоски (например, бумажные индикаторные полоски или пластиковые индикаторные полоски), адгезивные вещества (например, гидрогелевые адгезивные вещества, термоплавкие адгезивные вещества или адгезивные вещества на основе растворителей), бинты, перевязочные материалы для ран, ортопедические имплантаты или любое другое устройство, используемое в области медицины. Дополнительные медицинские устройства также включают, но не ограничиваются ими, любое устройство, которое может быть вставлено или имплантировано в человека или другое животное или помещено в место введения или имплантации, например, на кожу рядом с местом введения или имплантации, и которое включает, по меньшей мере, одну поверхность, восприимчивую к колонизации микроорганизмами, внедренными в биопленку. Медицинские устройства также включают любую другую поверхность, которая может быть желательной или необходимой для предотвращения роста или размножения микроорганизмов, внедренных в биопленку, по меньшей мере, на одной поверхности медицинского устройства, или для удаления или очистки микроорганизмов, внедренных в биопленку, по меньшей мере, с одной поверхности медицинского устройства, например, поверхностей оборудования в операционных, отделениях неотложной помощи, больничных палатах, клиниках или ваннах комнатах.

Композиции в соответствии с настоящим раскрытием можно вводить с добавлением приемлемого носителя на обеззараженную небиологическую поверхность, которая будет контактировать с биологической поверхностью. В некоторых случаях функциональность или физическая стабильность композиций в соответствии с настоящим раскрытием также могут быть повышены путем добавления различных добавок к водным растворам или суспензиям. Можно использовать добавки, такие как, но не ограничиваясь ими, полиолы (включая сахара), аминокислоты, поверхностно-активные вещества, полимеры, другие белки или определенные соли. Композиции и способ в соответствии с настоящим раскрытием можно использовать отдельно или в комбинации с другим средством дезинфекции. Например, ингибирование образования биопленки сделало бы микробный патоген гораздо более восприимчивым к действию других средств дезинфекции, таких как те, которые обычно используются для уничтожения или удаления специфических микробных патогенов с обрабатываемой поверхности.

В варианте осуществления композиции в соответствии с настоящим раскрытием

наносится, погружаются и/или покрываются на медицинское устройство или аппарат до контакта медицинского устройства или аппарата с загрязненной окружающей средой и/или до контакта объекта или аппарата с тканями объекта. В другом варианте осуществления как ткани объекта, так и медицинское устройство или аппарат, находящиеся в контакте с указанными тканями, можно обрабатывать композициями в соответствии с настоящим раскрытием, чтобы ограничить адгезию патогенов и/или снизить риск инфекций (после в контакте с тканью объекта). В другом варианте осуществления композиции в соответствии с настоящим раскрытием могут быть использованы для облегчения процесса обеззараживания многоцветного медицинского материала или оборудования. В некотором дополнительном варианте осуществления композиции в соответствии с настоящим раскрытием могут быть использованы для облегчения процесса обеззараживания многоцветного медицинского материала или оборудования до и/или после стерилизации медицинского материала или оборудования.

Поверхность, обработанная композициями в соответствии с настоящим раскрытием путем распыления или замачивания, должна быть частично или полностью покрыта, чтобы уменьшить адгезию патогенов на указанной поверхности. Наносимые композиции ЭПС в соответствии с настоящим раскрытием могут эффективно покрывать значительный процент обработанной поверхности, такой как, например, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% общей поверхности.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1: Способ получения ЭПС

7-стадийный способ, используемый для получения ЭПС, показан на Фигуре 1. Вкратце:

Реактивация и предварительное культивирование: Содержимое криопробирки, содержащей *Bacillus licheniformis* LP-T14 (депозитарный номер NCIMB 43557), разделяли на пробирки для предварительного культивирования и затем суспендировали в 9 мл адаптированной жидкой среды Зобелла, соблюдая стерильные условия. Затем пробирки для предварительного культивирования помещали в режим орбитального перемешивания при 40°C и использовали для посева исследуемой жидкой среды, полученной в 150 мл Эрлена, при перемешивании в течение 5 ч при 40°C в жидкой среде Зобелла. Затем 4 ферментера по 5 л засеивали предварительной культурой Эрлена объемом 150 мл и помещали на 4-8 ч при 40°C, при контролируемом перемешивании, оксигенации (30-60%) и pH (5-8) до оптической плотности (ОП) > 2, чтобы гарантировать, что бактериальный рост находится в начале экспоненциальной фазы.

Ферментация: 500 л ферментер заполняли 150 л стерильной ферментационной среды, состоящей из морских солей (40 г/л), триптона (6 г/л), дрожжевого экстракта (6 г/л), пеногасителя (0,33 мл/л), декстрозы (12 г/л) и деионизированной H₂O (достат. колич.). В культуральную среду для ферментации инокулировали 5 л предварительных культур для

ферментации и помещали на 20-40 ч при 40°C, при контролируемом перемешивании, оксигенации 30-60% и pH 5-8. До конца ферментации контролировали как рост штамма (ОП), так и потребление глюкозы.

Термическая обработка: Термическую обработку проводили в 400 л смесительном баке с рубашкой в течение 1 часа при 85°C для инактивации ферментов и бактерий.

Центрифугирование: Всю культуральную среду центрифугировали с использованием тарельчатого сепаратора, 14000 g, поток 200-800 л/ч для разделения биомассы и супернатанта.

Фильтрация и ультрафильтрация: Супернатант дополнительно подвергали последовательным стадиям фильтрации (1,60-0,22 мкм) и ультрафильтрации (10-100 кДа картриджи с отсекающим фильтром из полисульфонового полого волокна) для очистки и извлечения только соединений с высокой молекулярной массой; *т. е.* ЭПС.

Лиофилизация: ЭПС замораживали при -20°C в течение, по меньшей мере, 16 часов, затем лиофилизировали в сублимационной сушилке со льдом емкостью 100 кг.

Упаковка: Лиофилизированный ЭПС упаковывали в пакет из полиэтилена низкой плотности, запаянный под вакуумом и промаркированный, до того, как был получен соответствующий состав. Образцы каждой партии были охарактеризованы в соответствии со стандартными методиками.

ПРИМЕР 2: Характеристика ЭПС - определение средней молекулярной массы

ЭПС, используемый в примере в настоящем описании, получали путем ферментации *Bacillus licheniformis* LP-T14 (депозитарный номер NCIMB 43557), как описано в Примере 1.

ЭПС анализировали с помощью прибора эксклюзионной хроматографии (HP-SEC), а именно TDA 302 (Viscotek), оснащенного детекторами показателя преломления и рассеяния лазерных лучей и вискозиметрами. Система была откалибрована с помощью стандарта пуллулана с сертифицированной молекулярной массой, индексом полидисперсности и характеристической вязкостью (PolyCAL-PullulanSTD-105k, Malvern Panalytical). Образцы ЭПС (100 мкл, 1 мг/мл), растворенные в подвижной фазе (0,2 М NaNO₃+0,05% NaN₃, pH 6,81), вводили в колонку GMPWX (7,8 мм × 30 см, Tosoh Bioscience) при 40°C со скоростью потока 0,6 мл/мин.

Результаты анализа (средние значения двух анализов для образца ЭПС) представлены с учетом средневесовой молекулярной массы (M_w; 40-150 кДа), среднечисловой молекулярной массы (M_n; 26-100 кДа) и индекса полидисперсности (M_w/M_n: 1,2-1,8), все с использованием параметра dn/dc 0,135-0,147; и с учетом % восстановления (94-99%), который представляет собой соотношение концентрации, рассчитанной с помощью детектора показателя преломления, и экспериментальной концентрации.

ПРИМЕР 3: Характеристика ЭПС - определение гликозильной композиции

ЭПС, используемый в примере в настоящем описании, получали путем ферментации *Bacillus licheniformis* LP-T14 (депозитарный номер NCIMB 43557), как описано в Примере

1.

Гликозильную композицию ЭПС определяли в соответствии с 2 методами характеризации, а именно альдитолацетатным методом (Peña *et al.* (2012) *Methods Enzymol.* 510:121-39) и методом ТМС-derivатизированных метилгликозидов (Santander *et al.* (2013) *Microbiology* 159:1471). Вкратце:

Анализ гликозильной композиции альдитолацетатным (АА) методом: Анализ гликозильной композиции проводили с помощью комбинированной газовой хроматографии/масс-спектрометрии (ГХ/МС) альдитолацетатов. Образцы ЭПС (250 мкг) гидролизовали в 2 М трифторуксусной кислоте (ТФУК) в течение 2 ч в герметичной пробирке при 120°C, восстанавливали с помощью NaBD₄ и ацетилировали с использованием уксусного ангидрида/ТФУК. Полученные альдитолацетаты анализировали на ГХ Agilent 7890А, соединенном с МСД 5975С, в режиме ионизации электронным ударом. Разделение проводили на капиллярной колонке из плавленного кварца со связанной фазой 30 м Supelco SP-2331. Разделение аминсахаров осуществляли с использованием отдельной колонки ЕС-1.

Анализ гликозильной композиции с помощью ГХ-МС ТМС-derivатизированных метилгликозидов: Анализ гликозильной композиции проводили с помощью комбинированной газовой хроматографии/масс-спектрометрии (ГХ/МС) пер-О-триметилсилильных (ТМС) производных моносахаридных метилгликозидов, полученных из образца кислотным метанолизом. Образцы ЭПС (250 мкг) нагревали с метанольным HCl в герметичной стеклянной пробирке с завинчивающейся крышкой в течение 18 ч при 80°C. После охлаждения и удаления растворителя в токе азота образцы повторно N-ацетилировали и снова высушивали. Затем образцы derivатизировали Tri-Sil® (Pierce) при 80°C в течение 30 мин. ГХ-МС анализ ТМС-метилгликозидов проводили на ГХ Agilent 7890А, соединенном с МСД 5975С, с использованием капиллярной колонки из плавленного кварца Supelco Equity-1 (30 м x 0,25 мм ВД).

Два метода анализа композиции показывают, что манноза является основным обнаруженным гексозным сахаром и N-ацетилгалактозамин является основным присутствующим аминсахаром. В образцах также присутствуют значительные количества галактозы, глюкозы и N-ацетилглюкозамина. Также была обнаружена низкая доля ксилозы, тогда как глюкуроновая кислота была обнаружена только с помощью ТМС-метода. Однако ни следы рибозы, ни арабинозы, ни рамнозы, ни фукозы, ни фруктозы не были обнаружены с использованием обоих методов характеризации, как представлено в Таблице 1.

*Таблица 1. Анализы гликозильной композиции (альдитолацетатный метод и ТМС-метод) ЭПС, полученного путем ферментации *Bacillus licheniformis* LP-T14 (депозитарный номер NCIMB 43557). Результаты выражены с учетом относительной доли обнаруженных гликозильных звеньев. Н/О означает «не обнаружено».*

Гликозильный остаток	Альдитолацетатный метод (Мол.%)	ТМС-метод (Мол.%)
Рибоза	Н/О	Н/О
Арабиноза	Н/О	Н/О
Рамноза	Н/О	Н/О
Фукоза	Н/О	Н/О
Фруктоза	Н/О	Н/О
Ксилоза	1,5	1,8
Глюкуроновая кислота	Н/О	4,2
Манноза	23,1	35,0
Галактоза	14,2	24,7
Глюкоза	5,1	9,1
N-Ацетилгалактозамин	46,7	18,4
N-Ацетилглюкозамин	9,4	6,8
Общее количество	100	100

ПРИМЕР 4: Анализ содержания белка и нуклеиновой кислоты ЭПС

ЭПС, используемый в примере в настоящем описании, получали путем ферментации *Bacillus licheniformis* LP-T14 (депозитарный номер NCIMB 43557), как описано в Примере 1.

Анализ содержания белка ЭПС: Содержание белка определяли с использованием модифицированного метода Лоури, а именно окрашивания общего белка BioRad. Анализ проводили в соответствии с инструкциями изготовителя на чистых образцах ЭПС и количественно оценивали по стандартной кривой БСА. Вкратце, 10 мкл образца смешивали с 200 мкл реагента в разведении 1:4. Через 10 минут образцы анализировали по поглощению при 595 нм. Белковые примеси в ЭПС оценивали при $0,052 \pm 0,019$ мг/мл⁻¹, что составляет приблизительно 0,005% масс./масс. в расчете на общую массу выделенного ЭПС.

Измерения содержания нуклеиновой кислоты ЭПС с помощью анализа 260/280 и 260/230: Два микролитра образцов ЭПС анализировали на спектрофотометре Nanodrop при 260/280 и 260/230 нм. Примеси нуклеиновой кислоты в ЭПС оценивали при $58,0 \pm 8,7$ нг/мкл⁻¹, что составляет приблизительно 0,006% масс./масс. в расчете на общую массу выделенного ЭПС.

ПРИМЕР 5: Антибиопленочная активность ЭПС in vitro в отношении бактериальных патогенов

ЭПС, используемый в примере в настоящем описании, получали путем ферментации *Bacillus licheniformis* LP-T14 (депозитарный номер NCIMB 43557), как описано в Примере 1.

В следующих экспериментах *in vitro* описано ингибирующее действие ЭПС на образование биопленок патогенных штаммов, а именно: грамотрицательных бактерий [*Haemophilus influenzae* тип b ATCC 9795, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 8047 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853] и грамположительных бактерий [*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pneumoniae* серотип 3 ATCC 6303 и *Streptococcus mutans* DSM 20523].

Образование биопленок бактериальных патогенов осуществляли в 96-луночных полистироловых микротитрационных планшетах, в которых аликвоты по 180 мкл ночной культуры ($1,5 \times 10^8$ бактерий.мл⁻¹) каждого бактериального патогена инокулировали вместе с 20 мкл раствора ЭПС в ФСБ при различных концентрациях (50, 100, 200 и 400 мкг.мл⁻¹) или 20 мкл ФСБ в качестве контроля. Планшеты инкубировали при 37°C в течение 24 ч (*St. pneumoniae*), 48 ч (*H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*) и 96 ч (*St. mutans*), учитывая скорость роста каждого штамма и без встряхивания для получения биопленки. Инкубационные среды также адаптировали для каждого штамма, поэтому инкубацию микроаэрофильных или анаэробных штаммов проводили в 5% CO₂ или в анаэробных условиях, соответственно. Неприсоединенные бактерии удаляли промыванием 3 раза дистиллированной стерильной водой и присоединенные бактерии (биопленки) окрашивали 0,1% раствором кристаллического фиолетового в этаноле 96% об. (масс./об.) в течение 25 мин. Излишки красителя удаляли аспирацией, и планшеты промывали дистиллированной стерильной водой (5 раз), и высушивали на воздухе (в течение 15 мин). Окрашенные биопленки солюбилизировали 96% этанолом и измеряли их оптическую плотность (ОП) при 585 нм с использованием микротитрационного планшет-ридера (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO микропланшетный спектрофотометр). Образование биопленки (%) рассчитывали в соответствии со следующей формулой:

$$\text{Образование биопленки (\%)} = \left(1 - \frac{\text{ОП}_{585} \text{ контроль} - \text{ОП}_{585} \text{ образец}}{\text{ОП}_{585} \text{ контроль}}\right) \times 100$$

Ингибирующее действие ЭПС на биопленки при различных концентрациях (от 0 до 400 мкг.мл⁻¹) на различные бактериальные патогены, инкубированные при оптимальных условиях, представлено на Фигуре 2. Эти эксперименты проводили в трех повторностях (n=3) в 2 независимых случаях (N=2). Статистическую значимость определяли с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) и р-значения рассчитывали с использованием двустороннего t-критерия для неодинаковой дисперсии, когда это уместно. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

В этих экспериментах патогенные бактериальные штаммы культивировали и инкубировали в оптимальных условиях, в адаптированной среде и без конкуренции со стороны других существующих патогенов. Процент образованной биопленки рассчитывается по ОП, поэтому чем больше клеток, отмеченных кристаллическим фиолетовым, измерено после промывания, тем больше клеток прикрепляется к планшету и, следовательно, тем больше биопленки образуется в течение периода инкубации. Наблюдалось снижение образования биопленки независимо от вовлеченного патогенного

штамма. Профилактическое антибиопленочное действие ЭПС представлено на Фигуре 2. Максимальная эффективность наблюдается при добавлении ЭПС в течение первых 2 часов после инокуляции патогенных бактерий (данные не представлены). При добавлении ЭПС через 4 часа после инокуляции его влияние на образование биопленки несколько менее выражено (данные не представлены).

ПРИМЕР 6: Эксперименты по антибактериальной активности ЭПС in vitro

ЭПС, используемый в примере в настоящем описании, получали путем ферментации *Bacillus licheniformis* LP-T14 (депозитарный номер NCIMB 43557), как описано в Примере 1.

Чтобы исследовать, может ли ингибирующее действие ЭПС на образование биопленки бактериальными патогенами быть следствием прямого ингибирования роста, антибактериальную активность оценивали, проводя эксперименты, аналогичные экспериментам Примера 5, в трех повторностях ($n=3$) в 2 независимых случаях ($N=2$). Вкратце: Полистироловые микротитрационные планшеты заполняли ночными культурами патогенных бактерий в их соответствующей оптимальной среде (180 мкл) исследуемого штамма ($OP_{600}=0,1$) с 20 мкл ЭПС в растворе ФСБ в конечной концентрации 50, 100, 200 и 400 мкг.мл⁻¹ или с 20 мкл ФСБ в качестве контроля. Планшеты инкубировали при 37°C в диапазоне времени от 24 ч до 96 ч (оптимальная продолжительность роста, которая зависит от исследуемого штамма) в аэробных, микроаэробных или анаэробных условиях без встряхивания. Антибактериальную активность определяли, измеряя значения OP_{600} с помощью микротитрационного планшет-ридера (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO микропланшетный спектрофотометр) и сравнивая средние значения OP_{600} контрольных лунок со средними значениями OP_{600} каждого исследуемого состояния.

Антибактериальное действие ЭПС на рост культур различных бактериальных патогенов показан на Фигуре 3, где сравниваются значения OP_{600} , среднее значение ± стандартное отклонение обработанных и необработанных клеток после их соответствующей оптимальной продолжительности роста. Измерения мутности образца (например, OP_{600}) обычно используются в спектрофотометрии для оценки концентрации бактерий в среде, позволяя измерять рост клеточной популяции с течением времени. В качестве контроля использовали рост культур в отсутствие ЭПС.

Результаты, представленные на Фигуре 3, показывают, что одинаковый уровень роста патогенных бактерий был достигнут как с ЭПС, так и без него. Это свидетельствует о том, что присутствие ЭПС в различных концентрациях (50-400 мкг.мл⁻¹) не оказывает отрицательного влияния на рост патогенных бактерий и в более общем плане присутствие ЭПС не влияло на скорость роста всех исследуемых бактериальных штаммов. Таким образом, ЭПС не оказывает ни бактерицидного, ни бактериостатического, ни антибиотического действия независимо от его концентрации и от рассматриваемых патогенных бактерий. Таким образом, показано, что присутствие ЭПС, не обладающего биоцидным действием, не нарушает целостность естественной микробиоты, которая должна присутствовать в биологических тканях.

ПРИМЕР 7: Анализы на цитотоксичность ЭПС

ЭПС, используемый в примере в настоящем описании, получали путем ферментации *Bacillus licheniformis* LP-T14 (депозитарный номер NCIMB 43557), как описано в Примере 1.

Предварительные исследования предполагаемого цитотоксического действия ЭПС на клетки эпителия носа человека (HNEpC) проводили *in vitro*. Эпителиальные клетки носа человека (HNEpC) выращивали до 80% слияния в полной среде BEBM в соответствии с рекомендациями изготовителя. Клетки дважды промывали ФСБ и культивировали в течение 2 ч или 24 ч с ЭПС в диапазоне от 0 (контроль) до 800 мкг.мл⁻¹ при 37°C, 5% CO₂ в среде. После культивирования клетки дважды промывали ФСБ, собирали и оценивали жизнеспособность путем окрашивания красителем для определения жизнеспособности TO-PRO3. Процент TO-PRO3-отрицательных клеток, представляющих собой жизнеспособные клетки в культуре, оценивали с помощью проточного цитометра Symphony BD Sciences.

Зависящие от времени эффекты увеличения концентраций ЭПС на жизнеспособность HNEpC через 2 и 24 ч показаны на Фигуре 4. Клетки HNEpC, выбранные в качестве модели вследствие их чувствительности, инкубировали с увеличивающейся дозой ЭПС в течение 2 часов и 24 часов последовательно. Как показано на Фигуре 4, значения выживаемости клеток были идентичны контролю, результаты показывают, что присутствие ЭПС не вызывало цитотоксичности, независимо от его концентрации и продолжительности инкубации.

ПРИМЕР 8: Анализ ЭПС ex vivo на клетках HNEpC

ЭПС, используемый в примере в настоящем описании, получали путем ферментации *Bacillus licheniformis* LP-T14 (депозитарный номер NCIMB 43557), как описано в Примере 1.

Затем оценивали эффективность композиций ЭПС для удаления двух бактериальных штаммов, *m. e. Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, из монослоя эпителиальных клеток носа человека.

Эпителиальные клетки носа человека (HNEpC; PromoCell, кат. номер C-12620) выращивали до 80% слияния в полной среде BEBM в соответствии с рекомендациями изготовителя. Клетки HNEpC дважды промывали ФСБ и культивировали с патогенными бактериями (*P. aeruginosa* или *S. Aureus*) при 37°C, 5% CO₂ в среде без антибиотиков в течение 2 ч. *P. aeruginosa* выращивали в бульоне Лурия-Бертани, в то время как *S. aureus* - в триптон-соевом бульоне. После ночного культивирования в бульоне бактерии разводили в ФСБ при оптической плотности (ОП600) 0,1 и использовали для экспериментов. Загрязненные клетки HNEpC дважды промывали ФСБ и добавляли ЭПС при 0 (контроль), 50, 100, 200 и 400 мкг.мл⁻¹ в течение 2 ч в полной среде BEBM. После 2 промываний ФСБ проводили окончательное промывание дистиллированной H₂O в течение 10 минут для уничтожения и отделения клеток HNEpC и сбора всех остаточных бактерий. Затем собирали супернатанты (содержащие мертвые клетки и бактерии) и высевали после соответствующих разбавлений на среду AGAR (цетримидный агар для *P. aeruginosa* и

солевой агар с маннитом для *S. aureus*). Бактериальный рост анализировали через 24 ч путем подсчета бактериальных колоний (КОЕ) в планшетах.

Эффективность ЭПС в отношении удаления *P. aeruginosa* и *S. aureus* из монослоев эпителиальных клеток носа человека (HNEpC) *in vitro* представлена на Фигуре 5. Эти эксперименты проводили в трех повторностях (n=3) в 2-4 независимых случаях (N=2-4). Статистическую значимость определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с критерием Краскела-Уоллиса по рангам. Значение $p < 0,05$ считалось статически значимым. Апостериорный анализ проводили с использованием критерия Дьюнна.

При измерении количества патогенных бактерий, которые были прикреплены к клеткам носа до осмотического шока (промывание деионизированной водой) в этих экспериментах косвенно измеряется влияние ЭПС на отделение патогенных бактерий от их носителя, *т. е.* эпителиальных клеток носа (HNEpC). Таким образом, эти результаты показали, что ЭПС обладает способностью ограничивать последствия образования бактериальной биопленки, независимо от ее происхождения, на биологических поверхностях. Действительно, в дополнение к профилактическому эффекту, продемонстрированному в Примере 5, в котором на образование биопленки влияло присутствие ЭПС, в настоящем описании было продемонстрировано, что промывание ЭПС может иметь терапевтическую активность благодаря эффекту удаления патогенных бактериальных клеток (Фигура 5).

ПРИМЕР 9: Эмульгирующие/поверхностно-активные свойства ЭПС

ЭПС, используемый в примере в настоящем описании, получали путем ферментации *Bacillus licheniformis* LP-T14 (депозитарный номер NCIMB 43557), как описано в Примере 1.

Определяли эмульгирующие/поверхностно-активные свойства ЭПС с помощью способа, описанного Song *et al.* (Preparation of Calcipotriol Emulsion using bacterial Exopolysaccharides as Emulsifier for percutaneous treatment of Psoriasis Vulgaris. Int J Mol Sci. 2019, 20;21(1) 2019). Вкратце, лиофилизированный ЭПС ресуспендировали в ФСБ для достижения нескольких концентраций в диапазоне от 5 до 800 мкг.мл⁻¹. Объем 2,0 мл каждого раствора ЭПС добавляли в стеклянную пробирку с 2,0 мл растительного масла. Затем полученный гетерогенный раствор перемешивали в течение 2 мин при 3000 об/мин, используя вихревой смеситель для эмульгирования. «Растительное масло+ФСБ» и «растительное масло+сапонин (1%)» использовали в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно. Образцы выдерживали при комнатной температуре в течение 24 ч без перемешивания перед оценкой индекса эмульсии (E24). E24 представляет собой высоту эмульгированного слоя, деленную на общую высоту столба жидкости, умноженную на 100.

Результаты трех независимых экспериментов (N=3), представленные на Фигуре 6, демонстрировали, что ЭПС проявляет высокую эмульгирующую активность даже при низкой концентрации (*т. е.* E24 50% достигалась при использовании только 50 мкг.мл⁻¹, что соответствует 0,005% ЭПС). Более того, было четко продемонстрировано, что чем больше

количество ЭПС в окружающей среде, тем выше эмульгирующий эффект.

ПРИМЕР 10: Профилактическая противовирусная активность ЭПС ex vivo в отношении HNEpC, инокулированных высокой дозой аденовируса или риновируса

ЭПС, используемый в примере в настоящем описании, получали путем ферментации *Bacillus licheniformis* LP-T14 (депозитарный номер NCIMB 43557), как описано в Примере 1.

Оценивали способность ЭПС предотвращать вирусную инфекцию живых эпителиальных клеток носа человека, инокулированных аденовирусом человека 2 (ATCC VR-846) и риновирусом человека 16 (ATCC VR-283). Вкратце,

Эпителиальные клетки носа человека (HNEpC) выращивали до 80% слияния в полной среде ВЕВМ в соответствии с рекомендациями изготовителя. Клетки обрабатывали ЭПС при 400 мкг.мл⁻¹ и инкубировали в течение 2 ч при 37°C, 5% CO₂, промывали ФСБ и затем инокулировали и инкубировали в тех же условиях с высокой нагрузкой риновирусом или аденовирусом (1 TCID₅₀, представляя вирусную дозу, включающую цитопатический эффект у 50% инокулированных клеток через 48 ч). Альтернативно, живые HNEpC инфицировали тем же инокулятом в течение 2 ч при 37°C, 5% CO₂, промывали и затем обрабатывали ЭПС при 400 мкг.мл⁻¹ в течение дополнительных 2 ч при 37°C, 5% CO₂. Необработанные живые клетки (только полная среда ВЕВМ) использовали в качестве положительного контроля, тогда как инокулированные вирусом живые клетки без обработки ЭПС использовали в качестве отрицательного контроля. После промывания ФСБ предварительно обработанные клетки (*m. e.* клетки, обработанные композицией ЭПС до инокуляции вируса), клетки после обработки (*m. e.* клетки, обработанные композицией ЭПС после инокуляции вируса) и контроля культивировали в среде ВЕВМ в течение 48 ч при 37°C, 5% CO₂. После 48 ч культивирования клетки собирали и оценивали их жизнеспособность путем окрашивания красителем для определения жизнеспособности TO-PRO-3. Процентное содержание TO-PRO-3-отрицательных клеток, представляющих жизнеспособные клетки в культуре, оценивали с помощью проточного цитометра Symphony BD Sciences.

Противовирусная активность ЭПС (400 мкг.мл⁻¹) в отношении HNEpC, инфицированных высокой дозой аденовируса или риновируса, представлена на Фигуре 7. Отрицательный контроль (только вирусная инокуляция) показывает, что половина HNEpC была поражена вирусной инокуляцией через 48 ч. Однако предварительная обработка клеток ЭПС перед инокуляцией вируса снижала наблюдаемую гибель клеток наполовину по сравнению с отрицательным контролем. Таким образом, такая предварительная обработка увеличивала выживаемость клеток после вирусной инфекции и подчеркивает профилактический характер ЭПС в отношении вирусных инфекций, независимо от рассматриваемого вируса. Обработка ЭПС эпителиальных клеток носа, которые были ранее инокулированы вирусной нагрузкой, менее выражена, чем при предварительной обработке (Фигура 7). Не желая привязываться к теории, такое наблюдение можно объяснить инокуляцией с высокой вирусной нагрузкой, когда большое количество вирусов было

интернализировано внутри HNEpC за 2 часа, что обеспечивает быстрое контаминирование большей части клеток вирионами. Эти результаты косвенно продемонстрировали, что ЭПС не способствовало какому-либо внутриклеточному эффекту (*m. e.* запуску иммунного ответа), а скорее оказывает внеклеточный «барьерный» эффект, который стерически препятствует интернализации вирусов. Тем не менее, стоит отметить, что инокуляция такой высокой вирусной нагрузкой (*m. e.* 1 TCID₅₀) не отражает реальность вирусной инфекции, при которой используется инокуляция с более низкой вирусной нагрузкой (*m. e.* 0,001 TCID₅₀).

Дополнительные противовирусные эксперименты проводили при тех же условиях, за исключением того, что концентрация ЭПС была снижена до 200 мкг.мл⁻¹. Противовирусная активность ЭПС (200 мкг.мл⁻¹) в отношении HNEpC, инокулированных высокой дозой аденовируса или риновируса, представлена на Фигуре 8А и Фигуре 8В, соответственно. Эти результаты продемонстрировали профилактическую противовирусную активность, эквивалентную активности, наблюдаемой при более высоких дозах ЭПС.

ПРИМЕР 11: Терапевтическая противовирусная активность ЭПС ex vivo в отношении HNEpC, инокулированных низкой дозой аденовируса или риновируса

ЭПС, используемый в примере в настоящем описании, получали путем ферментации *Bacillus licheniformis* LP-T14 (депозитарный номер NCIMB 43557), как описано в Примере 1.

Определяли способность ЭПС предотвращать распространение клеточной инфекции после высвобождения вирионов из клеток, инокулированных вирусным инокулятом. Для большего соответствия реальности вирусной инфекции эти эксперименты проводили с использованием более низкой вирусной нагрузки (*m. e.* 0,001 TCID₅₀) как аденовируса человека 2 (ATCC VR-846), так и риновируса человека 16 (ATCC VR-283), чем представлено в Примере 10, при этом продолжительность культивирования клеток увеличивается до 5 дней, чтобы сделать возможным распространение вируса после инокуляции. Также была предпринята попытка понять, требуется ли постоянное присутствие ЭПС или достаточно начального контакта с HNEpC, чтобы оказать защитный эффект. Следовательно, применяли различные условия культивирования клеток, в которых ЭПС добавляли только в качестве предварительной обработки (как в Примере 10) или дополнительно добавляли после вирусного инокулята (или добавляли один раз в начале 5-дневного культивирования, или добавляли каждый день в течение 5 дней). Вкратце, живые эпителиальные клетки носа человека (HNEpC) выращивали до 80% слияния в полной среде ВЕВМ в соответствии с рекомендациями изготовителя. i) В качестве положительного контроля живые HNEpC культивировали в среде ВЕВМ, тогда как отрицательный контроль включал HNEpC, которые инокулировали вирусным инокулятом (низкая доза, 0,001 TCID₅₀) в течение 2 ч, промывали ФСБ, чтобы избавиться от вирусов, которые не интернализировались, и культивировали в течение 5 дней. ii) Живые HNEpC обрабатывали ЭПС при 400 мкг.мл⁻¹ в течение 2 ч, промывали ФСБ и инокулировали вирусным

инокулятом (низкая доза, 0,001 TCID₅₀) в течение 2 ч, промывали ФСБ и культивировали в течение 5 дней. iii) Живые HNEpC инокулировали вирусным инокулятом (низкая доза, 0,001 TCID₅₀) в течение 2 ч, промывали ФСБ и культивировали в течение 5 дней в присутствии ЭПС (400 мкг.мл⁻¹), добавляя раствор ЭПС за один раз в день 1. iv) Живые HNEpC инокулировали вирусным инокулятом (низкая доза, 0,001 TCID₅₀) в течение 2 ч, промывали ФСБ и культивировали в течение 5 дней в присутствии ЭПС (400 мкг.мл⁻¹), добавляя ЭПС (400 мкг.мл⁻¹) в культуру каждый день. Через 5 дней культивирования клетки собирали и оценивали их жизнеспособность с помощью TO-PRO3. Процентное содержание TO-PRO-3-отрицательных клеток (представляющих жизнеспособные клетки) оценивали для каждого состояния с помощью проточного цитометра Symphony BD Sciences.

Противовирусная активность ЭПС в отношении HNEpC, инокулированных низкой дозой аденовируса или риновируса, представлена на Фигуре 9: Отрицательный контроль (только низкая доза вирусной инокуляции) показал, что более половины HNEpC было поражено вирусной инокуляцией через 5 дней. Профилактический характер предварительной обработки ЭПС (*m. e.* клеток, обработанных композицией ЭПС перед инокуляцией вируса) в отношении вирусной инфекции, наблюдаемый в Примере 10, был подтвержден после 5 дней культивирования показателями выживаемости клеток, близкими к показателям положительного контроля. Более того, когда композиция ЭПС применяли после инокуляции вируса (*m. e.* после обработки клеток), было показано, что вирусы не были способны индуцировать такую же гибель клеток, как в случае отрицательного контроля (*m. e.* вирус без обработки ЭПС).

2 эксперимента после обработки (1 применение ЭПС через 5 дней и 1 применение ЭПС в день в течение 5 дней) дали аналогичные результаты (Фигура 9), было продемонстрировано, что ЭПС также предотвращает высвобождение вирионов, также как их распространение в соседние клетки. Таким образом, ЭПС обеспечивает терапевтический эффект, снижающий на 50% вирулентность вирусной инокуляции через 5 дней инкубации (Фигура 9). Эти результаты подтверждают наблюдения Примера 10, в котором эффект внеклеточного «барьера», который стерически препятствует интернализации вирусов, был бы важным фактором в настоящем описании.

Эти два комбинированных эффекта, а именно профилактический (наблюдаемый при предварительной обработке клеток ЭПС перед вирусной инокуляцией) и терапевтический эффект (наблюдаемый при последующей обработке клеток ЭПС после вирусной инокуляции), таким образом, способствуют исчезновению вирусной инфекции. Таким образом, такое введение ЭПС может действовать как поддержка клеточного механизма для эффективной защиты от любого типа вирусной инфекции, поскольку не было продемонстрировано никакой специфичности в отношении целевого штамма вируса.

Дополнительные противовирусные эксперименты проводили в том же режиме, за исключением того, что концентрация ЭПС была снижена до 200 мкг.мл⁻¹. Противовирусная активность ЭПС (200 мкг.мл⁻¹) в отношении HNEpC, инокулированных низкой дозой аденовируса или риновируса, представлена на Фигуре 10А и Фигуре 10В, соответственно.

Эти результаты продемонстрировали как профилактическую, так и терапевтическую противовирусную активность, эквивалентную активности, наблюдаемой при более высоких дозах ЭПС.

ПРИМЕР 12: Терапевтическая противовирусная активность ЭПС ex vivo в отношении HNEpC, инфицированных низкой и высокой дозой коронавируса

ЭПС, используемый в примере в настоящем описании, получали путем ферментации *Bacillus licheniformis* LP-T14 (депозитарный номер NCIMB 43557), как описано в Примере 1.

Определяли способность ЭПС предотвращать вирусную инфекцию живых эпителиальных клеток носа человека, инокулированных коронавирусом человека OC43 (HCoV-OC43), при высокой (1 TCID₅₀) и низкой (0,001 TCID₅₀) вирусной нагрузке. Коронавирус человека OC43 (HCoV-OC43), используемый в исследовании в настоящем описании, чаще всего связан с инфекциями человека, на которые приходится от 5 до 30% инфекций дыхательных путей человека. (Lau SKP *et. al.*, 2011, Journal of Virology). Вкратце, эпителиальные клетки носа человека (HNEpC) выращивали до 80% слияния в полной среде ВЕВМ в соответствии с рекомендациями изготовителя. Клетки обрабатывали ЭПС при 200-400 мкг.мл⁻¹ и инкубировали в течение 2 ч при 37°C, 5% CO₂, промывали ФСБ, и затем инокулировали, и инкубировали при тех же условиях дозой коронавируса (или 1 TCID₅₀, или 0,001 TCID₅₀). Альтернативно, живые HNEpC инокулировали тем же инокулятом в течение 2 ч при 37°C, 5% CO₂, промывали и затем обрабатывали ЭПС при 200-400 мкг.мл⁻¹ в течение дополнительных 2 ч при 37°C, 5% CO₂. Необработанные живые клетки (только полная среда ВЕВМ) использовали в качестве положительного контроля, тогда как инокулированные вирусом живые клетки без обработки ЭПС использовали в качестве отрицательного контроля. После промывания ФСБ предварительно обработанные клетки (*m. e.* клетки, обработанные композицией ЭПС до вирусной инфекции), клетки после обработки (*m. e.* клетки, обработанные композицией ЭПС после вирусной инфекции) и контроли культивировали в среде ВЕВМ в течение 48 ч при 37°C, 5% CO₂. После 48 ч культивирования клетки собирали и оценивали их жизнеспособность путем окрашивания красителем для определения жизнеспособности TO-PRO-3. Процентное содержание TO-PRO-3-отрицательных клеток, представляющих собой жизнеспособные клетки в культуре, оценивали с помощью проточного цитометра Symphony BD Sciences.

Противовирусная активность ЭПС (200-400 мкг.мл⁻¹) в отношении HNEpC, инокулированных или высокой, или низкой дозой коронавирусов, представлена на Фигуре 11. Эти результаты показали, что ЭПС предоставляет: i) профилактическую противовирусную активность, как описано в Примере 10 в настоящем описании, и ii) терапевтическую противовирусную активность, как описано в Примере 11 в настоящем описании, независимо от рассматриваемого вируса.

ПРИМЕР 13: Состав ЭПС - Назальные составы

ЭПС, используемый в примере в настоящем описании, получали путем ферментации *Bacillus licheniformis* LP-T14 (депозитарный номер NCIMB 43557), как описано в Примере

1.

Назальный состав 1: Морскую воду и опресненную морскую воду смешивали в очищенном объемном резервуаре при комнатной температуре до достижения желаемого содержания соли (0,9%, или 2,2%, или 2,7% в соответствии с формулой). Объем этого нерасфасованного раствора (10 л) собирают для растворения лиофилизированного ЭПС настоящего раскрытия, достигая желаемой концентрации ЭПС 0,02% или 0,04%, что соответствует 200 мкг/мл или 400 мкг/мл (в зависимости от желаемой формулы). Как ЭПС, так и нерасфасованный раствор гомогенизировали в течение, по меньшей мере, 30 мин и затем отфильтровывали через фильтр 0,22 мкм. Эту операцию повторяли один раз перед наполнением контейнера назального спрея.

Назальный состав 2: Хлорид натрия растворяли в воде при комнатной температуре и в очищенном объемном резервуаре до достижения желаемой концентрации соли 0,9%, 2,2% или 2,7% (в зависимости от желаемой формулы). Затем ЭПС настоящего раскрытия растворяли в вышеуказанном нерасфасованном растворе для достижения желаемой концентрации ЭПС 0,02% или 0,04%, что соответствует 200 мкг/мл или 400 мкг/мл (в зависимости от желаемой формулы). Как ЭПС, так и нерасфасованный раствор гомогенизировали в течение, по меньшей мере, 30 мин и затем отфильтровывали через фильтр 0,22 мкм. Эту операцию повторяли один раз перед наполнением контейнера назального спрея.

ПРИМЕР 14: Состав ЭПС - Состав для местного применения (крем)

ЭПС, используемый в примере в настоящем описании, получали путем ферментации *Bacillus licheniformis* LP-T14 (депозитарный номер NCIMB 43557), как описано в Примере 1.

Полиакрилатный кроссполимер-6 (1,5% масс./масс.) и воду (63,0% масс./масс.) тщательно смешивали перед добавлением ксантановой камеди (4,0% масс./масс.) и глицерина (2,0). Полученную смесь (Фаза А) нагревали до 70-75°C при непрерывном перемешивании. Смесь полистеарата сахарозы (3,0% масс./масс.), дибегената глицерина (1,7% масс./масс.), гидрогенизированного масла жожоба (21,0% масс./масс.) нагревали до 70-75°C и затем добавляли к Фазе А при непрерывном перемешивании, получая Фазу В. Фазу В смешивали для эмульгирования в течение 20 мин при 70-75°C и затем эмульгированной Фазе В давали остыть до 30°C. ЭПС (0,02-0,04% масс./масс.), ацетат витамина Е и отдушку добавляли к эмульгированной Фазе В при 30°C при постоянном перемешивании. рН полученной смеси доводили до рН 4,5-5,0 раствором лимонной кислоты в воде (достат. колич.).

ПРИМЕР 15: Фармакологический/иммунологический характер ЭПС, раскрытого в настоящем описании.

ЭПС, используемый в примере в настоящем описании, получали путем ферментации *Bacillus licheniformis* LP-T14 (депозитарный номер NCIMB 43557), как описано в Примере 1.

Поскольку сообщалось, что ЭПС, продуцируемый морскими бактериями, может

индуцировать выбранный набор регуляторных цитокинов в лейкоцитах и тканевых клетках (Okutani K. *et al.* Bull Jpn Soc Sci Fish 1984;50:1035-7), цель этих анализов заключалась в определении степени, в которой ЭПС настоящего раскрытия будет способен индуцировать иммунный ответ в клетках, с которыми ЭПС будет контактировать. Таким образом, поскольку две различные системы, вероятно, подвержены модификациям при контакте с веществами, полученными из бактерий, *т. е.* эпителиальные клетки и лейкоциты врожденной иммунной системы, анализы в настоящем описании проводили на эпителиальных клетках носа человека (HNEpC) и дендритных клетках моноцитарного происхождения человека (ДК), соответственно.

В частности, проводили следующие серии экспериментов для оценки i) продуцирования ключевых цитокинов, участвующих в воспалительном пути, таких как ИЛ-6 и ИЛ-8, после культивирования образцов ЭПС с HNEpC и ii) статуса активации ДК после стимуляции ЭПС путем оценки экспрессии наиболее важных маркеров активации/созревания, таких как CD83, CD40 и CD25, и продуцирования воспалительных цитокинов (ИЛ-6 и ИЛ-8).

i) Влияние ЭПС настоящего раскрытия на HNEpC:

Эпителиальные клетки носа человека (HNEpC) выращивали до слияния в полной среде BEBM и затем стимулировали образцом ЭПС (400 мкг/мл) в течение 24 ч. Клетки, оставленные нестимулированными или стимулированные ИЛ-1 β (50 нг/мл), использовали в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно. Монензин и брэфельдин использовали в качестве GolgiStop (ингибитора транспорта белка) и добавляли в течение последних 12 ч культивирования. Клетки собирали, фиксировали в 1% параформальдегиде, пермеабилizировали 0,1% сапонином (Sigma-Aldrich) в ФСБ, и окрашивали фикоэритрин (ФЭ)-конъюгированными анти-ИЛ-8 и анти-ИЛ-6 антителами (BD Bioscience), и затем анализировали с помощью проточной цитометрии.

Эти два цитокина являются основными медиаторами, участвующими в воспалительном пути и рекрутировании иммунных клеток, способных инициировать флогистическое явление. Как показано на Фигуре 12А и Фигуре 12В, после 24 ч стимуляции ЭПС настоящего раскрытия не было продуцирования ИЛ-6 и ИЛ-8 HNEpC по сравнению с нестимулированными HNEpC. Примечательно, что, несмотря на то, что HNEpC были способны продуцировать эти цитокины при соответствующей стимуляции прототипной воспалительной молекулой (*т. е.* ИЛ-1 β), при воздействии ЭПС не наблюдали продуцирования цитокинов. Следовательно, эти результаты показали, что ЭПС настоящего раскрытия не способен индуцировать воспалительную реакцию.

ii) Влияние ЭПС настоящего раскрытия на ДК:

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли от двух здоровых доноров с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколла-гипака. Моноциты выделяли прилипанием к пластиковым поверхностям в течение 45 мин при 37°C, 5% CO₂. В дальнейшем неприсоединенные клетки удаляли путем промывания фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Полученные клетки культивировали в полной среде

RPМI с добавками в присутствии ИЛ-4 (20 нг/мл, Miltenyi Biotec, Германия) и GM-CSF (25 нг/мл, сарграмостим). Через 6 дней культивирования неприсоединенные клетки демонстрировали фенотип CD14⁻/CD11c⁺/CD83⁻, характерный для незрелых дендритных клеток (ДК).

ДК стимулировали раскрытым в настоящем описании ЭПС (400 мкг/мл) в течение 24 ч. Клетки, оставленные нестимулированными или стимулированные липополисахаридом (ЛПС, 1 мкг/мл), использовали в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно. Для анализа продуцирования цитокинов монензин и брэфельдин использовали в качестве GolgiStop и добавляли в культуру ДК в течение последних 12 ч. А) Активация ДК: Через 24 ч ДК собирали и окрашивали анти-CD83 (анти-CD83 - ФЭ), анти-CD40 (анти-CD40 - AlexaFluor 647) и анти-CD25 (анти-CD25 - Тихоокеанский синий) моноклональными антителами при 4°C в течение 20 минут. Клетки промывали ФСБ и затем анализировали в отношении уровня поверхностной экспрессии указанных молекул активации с помощью проточной цитометрии. В) Продуцирование цитокинов: ДК собирали, фиксировали в 1% параформальдегиде, пермеабилizировали 0,1% сапонином (Sigma-Aldrich) в ФСБ, окрашивали фикоэритрин (ФЭ)-конъюгированными анти-ИЛ-8 и анти-ИЛ-6 антителами (BD Bioscience) и анализировали с помощью проточной цитометрии.

Влияние ЭПС настоящего раскрытия на ДК определяли, оценивая обе активации ДК, анализируя уровень экспрессии CD83, CD40 и CD25 как среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI), как показано на Фигуре 13А. Анализ ДК после стимуляции ЭПС показал, что ЭПС настоящего раскрытия не влиял на созревание ДК, о чем свидетельствует очень низкий уровень экспрессии CD83, CD40 и CD25, который оставался сравнимым с нестимулированными ДК.

Влияние ЭПС настоящего раскрытия на ДК и их продуцирование цитокинов, *т. е.* ИЛ-8 и ИЛ-6, после 24 ч стимуляции оценивали как процентное содержание клеток, продуцирующих цитокины, как показано на Фигуре 13В. После 24 ч стимуляции ЭПС не было продуцирования ИЛ-6 и ИЛ-8 ДК по сравнению с нестимулированными ДК.

Примечательно, что оба типа клеток человека, используемые в этих экспериментальных системах (HNEpC и ДК), хорошо оснащены образ-распознающими рецепторами (ОРР), способными ощущать присутствие патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП), включая бактерии. ДК чрезвычайно компетентны в обнаружении потенциальных ПАМП, чтобы инициировать воспалительный процесс. Кроме того, следует отметить, что ЛПС, полученный из грамотрицательных бактерий и используемый в качестве положительного контроля в экспериментах с ДК, был эффективен при 1 мкг/мл, *т. е.* при концентрации в 400 раз ниже исследуемой концентрации ЭПС (Фигура 13). Следовательно, было продемонстрировано, что ЭПС настоящего раскрытия не обладает способностью индуцировать иммунный (клеточный и/или гуморальный) ответ.

Хотя изобретение было описано применительно к его конкретным вариантам

осуществления, следует понимать, что объем формулы изобретения не должен ограничиваться предпочтительными вариантами осуществления, изложенными в примерах, а должно даваться самое широкое толкование, согласующееся с описанием в целом.

Дополнительные аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения изложены в следующих пронумерованных пунктах:

1. Композиция, содержащая, по меньшей мере, один выделенный экзополисахарид (ЭПС), полученный из морских бактерий, и подходящий носитель, в которой, по меньшей мере, один выделенный ЭПС имеет средневесовую молекулярную массу в диапазоне от 40 до 4000 кДа и в которой, по меньшей мере, один выделенный ЭПС могут получить путем ферментации морских бактерий.

2. Композиция по п.1, в которой композиция содержит, по меньшей мере, два экзополисахарида, каждый из которых независимо имеет средневесовую молекулярную массу в диапазоне от 40 до 4000 кДа.

3. Композиция по п.1 или 2, в которой средневесовая молекулярная масса ЭПС составляет от 40 до 2000 кДа, необязательно от 100 до 1400 кДа.

4. Композиция по любому одному из пп.1-3, в которой морские бактерии представляют собой грамположительные термофильные бактерии, необязательно в которой грамположительные термофильные бактерии представляют собой *Bacillus licheniformis*, предпочтительно в которой указанные грамположительные термофильные бактерии представляют собой *Bacillus licheniformis* LP-T14, которые были депонированы в Национальной коллекции промышленных, пищевых и морских бактерий (NCIMB) 27 января 2020 г. под депозитарным номером NCIMB 43557.

5. Композиция по любому одному из пп.1-4, в которой:

(i) указанная композиция представляет собой пероральную композицию, назальную композицию, местную композицию, трансдермальную композицию, офтальмологическую композицию или композицию, составленную для нанесения на медицинское устройство, предпочтительно в которой указанная композиция представляет собой назальную композицию; и/или

(ii) указанный носитель представляет собой физиологический раствор.

6. Система назальной доставки, содержащая, по меньшей мере, один выделенный экзополисахарид (ЭПС), полученный из морских бактерий, в которой, по меньшей мере, один выделенный ЭПС имеет средневесовую молекулярную массу в диапазоне от 40 до 4000 кДа и в которой, по меньшей мере, один выделенный ЭПС могут получить путем ферментации морских бактерий.

7. Система назальной доставки по п.6, в которой:

(i) средневесовая молекулярная масса, по меньшей мере, одного выделенного ЭПС составляет от 40 до 2000 кДа, необязательно от 100 до 1400 кДа и/или

(ii) морские бактерии представляют собой грамположительные термофильные бактерии, необязательно в которой грамположительные термофильные бактерии

представляют собой *Bacillus licheniformis*, предпочтительно в которой указанные грамположительные термофильные бактерии представляют собой *Bacillus licheniformis* LP-T14, которые были депонированы в NCIMB под депозитарным номером NCIMB 43557;

(iii) система назальной доставки доставляет, по меньшей мере, один выделенный ЭПС в виде назальных капель, жидкого спрея, сухого спрея, геля или мази;

(iv) по меньшей мере, один выделенный ЭПС вводят в состав композиции, которая дополнительно содержит физиологический раствор;

(v) система назальной доставки предназначена для лечения и/или предотвращения микробной патогенной инфекции у пациента, нуждающегося в таком лечении; и/или

(vi) система назальной доставки предназначена для ослабления вирулентности микробного патогена путем ингибирования или снижения колонизации микробным патогеном полости носа пациента, нуждающегося в таком лечении.

8. Нетерапевтическое применение композиции, как определено по любому одному из пп.1-5, для обработки небиологической поверхности с целью предотвращения или снижения колонизации поверхности микробным патогеном, необязательно в котором поверхность представляет собой поверхность медицинского устройства.

9. Композиция, как определено по любому одному из пп.1-5, или система назальной доставки, как определено по п.6 или 7, для применения в способе лечения и/или предотвращения микробной патогенной инфекции у пациента, нуждающегося в таком лечении.

10. Композиция, как определено по любому одному из пп.1-5, или система назальной доставки, как определено по п.6 или 7, для применения в способе ослабления вирулентности микробного патогена.

11. Способ лечения и/или предотвращения микробной патогенной инфекции у пациента, нуждающегося в таком лечении, способ, включающий введение пациенту эффективного количества композиции, как определено по любому одному из пп.1-5.

12. Способ ослабления вирулентности микробной патогенной инфекции у пациента, нуждающегося в таком лечении, способ, включающий введение пациенту эффективного количества композиции, как определено по любому одному из пп.1-5.

13. Композиция для применения по п.9 или 10 или способ по п.11 или 12, в котором:

(i) композицию вводят пациенту до, во время и/или после микробной патогенной инфекции, таким образом предотвращая, ингибируя или снижая колонизацию микробным патогеном, по меньшей мере, одной биологической ткани пациента и/или интернализацию микробного патогена, необязательно в которой, по меньшей мере, одна биологическая ткань выбрана из ротовой полости, носовой полости, дыхательных путей, горла, ушей, офтальмологической области, мочеполового тракта, кожи, кожи волосистой части головы, волос, ногтей и их комбинации, предпочтительно в которой, по меньшей мере, одна биологическая ткань представляет собой носовую полость; и/или

(ii) микробный патоген представляет собой бактериальный патоген и введение композиции пациенту ослабляет вирулентность бактериальной патогенной инфекции за

счет снижения или ингибирования образования ранней бактериальной биопленки и/или разрушения ранней бактериальной биопленки или

(iii) микробный патоген представляет собой вирусный патоген и введение композиции пациенту ослабляет вирулентность вирусной патогенной инфекции за счет снижения смертности клеток пациента, инфицированных вирусным патогеном, по сравнению с эквивалентными необработанными клетками, путем предотвращения или снижения высвобождения вирионов из инфицированных клеток пациента и/или путем предотвращения или снижения инфицирования неинфицированных соседних клеток пациента.

14. Система назальной доставки по п.6 или 7, применение по п.8, композиция для применения по п.9, 10 или 13 или способ по любому одному из п.11-13, в котором микробный патоген представляет собой:

(i) бактериальный патоген, необязательно выбранный из родов *Cutibacterium*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* и/или *Streptococcus*, предпочтительно в котором бактериальный патоген представляет собой виды *Cutibacterium acnes*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catharalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, или *Streptococcus mutans*, или их комбинацию;

(ii) вирусный патоген, необязательно выбранный из гриппа А, гриппа А подтипа H1N1/2009/pdm09, гриппа А подтипа H1, гриппа А подтипа H3, гриппа В (ортомиксовируса), коронавируса 229Е, коронавируса HKU1, коронавируса NL63, коронавируса OC43, SARS-CoV-2 (коронавируса), вируса парагриппа 1, вируса парагриппа 2, вируса парагриппа 3, вируса парагриппа 4, респираторно-синцитиального вируса А/В, метапневмовируса человека А/В (парамиксовируса), аденовируса, или риновируса/энтеровируса (пикорнавируса), или их комбинации;

(iii) грибковый патоген или

(iv) смесь одного или более из (i), (ii) и (iii).

15. Композиция по любому одному из пп.1-5, применение по п.8, композиция для применения по любому одному из пп.9, 10, 13 и 14 или способ по любому одному из пп.11-14, в котором количество, по меньшей мере, одного ЭПС в композиции в расчете на общую массу композиции находится в диапазоне 0,00005-0,5% масс./масс., предпочтительно 0,0001-0,1% масс./масс., более предпочтительно 0,0005-0,05% масс./масс.

16. Способ получения назальной композиции для ослабления вирулентности микробной патогенной инфекции путем ингибирования или снижения колонизации микробным патогеном в носовой полости, в котором способ включает стадию смешивания, по меньшей мере, одного выделенного экзополисахарида (ЭПС), происходящего из морских бактерий, с физиологическим раствором и необязательно подходящим носителем для получения назальной композиции, содержащей соль в концентрации от 0,1% до 10% масс./масс., предпочтительно от 0,5% до 5% масс./масс., более предпочтительно от 0,7% до 3% масс./масс.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный экзополисахарид (ЭПС), имеющий средневесовую молекулярную массу (M_w) в диапазоне от 40 до 4000 кДа, в котором ЭПС получают или могут получить путем ферментации морских бактерий.

2. Выделенный ЭПС по п.1, имеющий средневесовую молекулярную массу (M_w) в диапазоне от 40 до 2000 кДа, от 40 до 1400 кДа, от 40 до 1000 кДа, от 40 до 500 кДа, от 40 до 400 кДа, от 40 до 300 кДа, 40 до 200 кДа, от 40 до 150 кДа или от 40 до 100 кДа, предпочтительно от 40 до 150 кДа.

3. Выделенный ЭПС по п.1 или 2, имеющий M_w в диапазоне от 40 до 150 кДа и необязательно среднечисловую молекулярную массу (M_n) в диапазоне от 26 до 100 кДа и/или индекс полидисперсности (M_w/M_n) в диапазоне от 1,2 до 1,8.

4. Выделенный ЭПС по любому одному из пп.1-3, содержащий 30-90% нейтральных гликозильных звеньев, 10-70% аминокликозильных звеньев и 0-15% кислотных гликозильных звеньев по отношению к общему количеству гликозильных звеньев указанного ЭПС.

5. Выделенный ЭПС по любому одному из пп.1-4, содержащий маннозу, галактозу, глюкозу, N-ацетилгалактозамин и N-ацетилглюкозамин.

6. Выделенный ЭПС по любому одному из пп.1-5, по существу не содержащий рибозы, арабинозы, рамнозы, фруктозы и/или фукозы.

7. Выделенный ЭПС по любому одному из пп.1-6, в котором морские бактерии представляют собой грамположительные термофильные бактерии, предпочтительно в котором грамположительные термофильные бактерии представляют собой *Bacillus licheniformis*, более предпочтительно в котором указанные грамположительные термофильные бактерии представляют собой *Bacillus licheniformis* LP-T14, которые были депонированы в Национальной коллекции промышленных, пищевых и морских бактерий (NCIMB) 27 января 2020 г. под депозитарным номером NCIMB 43557.

8. Выделенный ЭПС по любому одному из пп.1-7, по существу лишенный способности индуцировать иммунный ответ.

9. Способ получения выделенного экзополисахарида (ЭПС), имеющего средневесовую молекулярную массу (M_w) в диапазоне от 40 до 4000 кДа, включающий стадии:

- культивирование морских бактерий в первой культуральной среде для получения культивируемых морских бактерий;
- ферментация культивируемых морских бактерий в ферментационной среде;
- термическая обработка ферментационной среды;
- центрифугирование ферментационной среды для получения супернатанта и
- фильтрование супернатанта для получения выделенного ЭПС.

10. Способ по п.9, в котором:

- выделенный ЭПС представляет собой, как определено по любому одному из пп.2-

- морские бактерии представляют собой грамположительные термофильные бактерии, предпочтительно в котором грамположительные термофильные бактерии представляют собой *Bacillus licheniformis*, более предпочтительно в котором указанные грамположительные термофильные бактерии представляют собой *Bacillus licheniformis* LP-T14, которые были депонированы в Национальной коллекции промышленных, пищевых и морских бактерий (NCIMB) 27 января 2020 г. под депозитарным номером NCIMB 43557;

- ферментационная среда, содержащая морские соли (40 г/л), триптон (6 г/л), дрожжевой экстракт (6 г/л), пеногаситель (0,33 мл/л), декстрозу (12 г/л) и деионизированную H₂O (достат. колич.);

- ферментацию проводят при pH 5-8 в течение периода 20-40 ч при 40°C, при оксигенации 30-50%;

- термическую обработку ферментационной среды проводят путем нагревания ферментационной среды в течение 1 ч при 85°C;

- центрифугирование ферментационной среды проводят при 14000g с использованием тарельчатого сепаратора со скоростью потока 200-800 л/ч и/или

- фильтрация супернатанта включает последовательную фильтрацию с использованием ступеней фильтрации от 1,60 до 0,22 мкм и/или ультрафильтрацию с использованием картриджей с отсекающим фильтром от 10 до 100 кДа.

11. Способ по п.9 или 10, который дополнительно включает свободную сушку выделенного ЭПС для получения лиофилизированного ЭПС, в котором свободную сушку необязательно проводят при -20°C в течение, по меньшей мере, 16 часов.

12. Композиция, содержащая, по меньшей мере, один выделенный экзополисахарид (ЭПС) по любому одному из пп.1-8 или, по меньшей мере, один выделенный ЭПС, полученный или доступный для получения способом по любому одному из пп.9-11 и подходящий носитель.

13. Композиция по п.12, представляющая собой пероральную композицию, назальную композицию, местную композицию, трансдермальную композицию, офтальмологическую композицию или композицию, составленную для нанесения на медицинское устройство.

14. Система назальной доставки, содержащая, по меньшей мере, один выделенный экзополисахарид (ЭПС) по любому одному из пп.1-8 или, по меньшей мере, один выделенный ЭПС, полученный или доступный для получения способом по любому одному из пп.9-11.

15. Система назальной доставки по п.14, в которой:

- система назальной доставки доставляет, по меньшей мере, один выделенный ЭПС в виде назальных капель, жидкого спрея, сухого спрея, геля или мази;

- по меньшей мере, один выделенный ЭПС составлен в виде композиции, которая дополнительно содержит физиологический раствор;

- система назальной доставки предназначена для лечения и/или предотвращения микробной патогенной инфекции у объекта, нуждающегося в таком лечении; и/или

- система назальной доставки предназначена для ослабления вирулентности микробного патогена путем ингибирования или снижения колонизации микробным патогеном носовой полости объекта, нуждающегося в таком лечении.

16. Нетерапевтическое применение выделенного ЭПС, как определено по любому одному из пп.1-8, выделенного ЭПС, полученного или доступного для получения способом по любому одному из пп.9-11, или композиции, как определено по п.12 или 13, для нанесения на небиологическую поверхность для предотвращения или снижения колонизации поверхности микробным патогеном, в котором поверхность необязательно представляет собой поверхность медицинского устройства.

17. Выделенный экзополисахарид (ЭПС), как определено по любому одному из пп.1-8, выделенный ЭПС, полученный или доступный для получения способом по любому одному из пп.9-11, композиция, как определено по п.12 или 13, или система назальной доставки, как определено по п.14 или 15, для применения в способе лечения и/или предотвращения микробной патогенной инфекции у объекта, нуждающегося в таком лечении.

18. Выделенный экзополисахарид (ЭПС), как определено по любому одному из пп.1-8, выделенный ЭПС, полученный или доступный для получения способом по любому одному из пп.9-11, композиция, как определено по п.12 или 13, или система назальной доставки, как определено по п.14 или 15, для применения в способе ослабления вирулентности микробного патогена.

19. Способ лечения и/или предотвращения микробной патогенной инфекции у объекта, нуждающегося в таком лечении, способ, включающий введение пациенту эффективного количества выделенного экзополисахарида (ЭПС), как определено по любому одному из пп.1-8, выделенного ЭПС, полученного или доступного для получения способом по любому одному из пп.9-11, или композиции, как определено по п.12 или 13.

20. Способ ослабления вирулентности микробной патогенной инфекции у объекта, нуждающегося в таком лечении, способ, включающий введение объекту эффективного количества выделенного экзополисахарида (ЭПС), как определено по любому одному из пп.1-8, выделенного ЭПС, полученного или доступного для получения способом по любому одному из пп.9-11, или композиции, как определено по п.12 или 13.

21. Выделенный ЭПС, или композиция для применения по п.17 или 18, или способ по п.19 или 20, в котором:

- выделенный ЭПС или композицию вводят объекту до, во время и/или после микробной патогенной инфекции, таким образом предотвращая, ингибируя или снижая колонизацию микробным патогеном, по меньшей мере, одной биологической ткани объекта и/или интернализацию микробного патогена; в котором, по меньшей мере, одна биологическая ткань содержит эпителий, такой как полость рта, полость носа, дыхательные пути, горло, уши, офтальмологическая область, мочеполовой тракт, кожа, кожа волосистой части головы, волосы, ногти и их комбинации;

- микробный патоген представляет собой бактериальный патоген и введение

выделенного ЭПС или композиции объекту ослабляет вирулентность бактериальной патогенной инфекции за счет снижения или ингибирования образования ранней бактериальной биопленки и/или разрушения ранней бактериальной биопленки и/или

- микробный патоген представляет собой вирусный патоген и введение выделенного ЭПС или композиции объекту ослабляет вирулентность вирусной патогенной инфекции за счет снижения смертности клеток объекта, инокулированных вирусным патогеном, по сравнению с эквивалентными необработанными клетками, предотвращая или снижая высвобождение вирионов из инокулированных клеток объекта и/или предотвращая или снижая инфицирование неинокулированных соседних клеток объекта.

22. Система назальной доставки по п.15, применение по п.16, выделенный ЭПС или композиция для применения по любому одному из пп.17, 18 или 21 или способ по любому одному из пп.19-21, в котором микробный патоген представляет собой, по меньшей мере, один из:

- бактериального патогена, необязательно выбранного из родов *Cutibacterium*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* и/или *Streptococcus*; предпочтительно бактериальный патоген представляет собой виды *Cutibacterium acnes*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catharalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и/или *Streptococcus mutans*;

- вирусного патогена, необязательно выбранного из гриппа А, гриппа А подтипа H1N1/2009/pdm09, гриппа А подтипа H1, гриппа А подтипа H3, гриппа В (ортомиксовируса), коронавируса 229Е, коронавируса HKU1, коронавируса NL63, коронавируса OC43, SARS-CoV-2 (коронавируса), вируса парагриппа 1, вируса парагриппа 2, вируса парагриппа 3, вируса парагриппа 4, респираторно-синцитиального вируса А/В, метапневмовируса человека А/В (парамиксовируса), аденовируса и/или риновируса/энтеровируса (пикорнавируса) или

- грибкового патогена.

23. Система назальной доставки, применение, выделенный ЭПС для применения, композиция для применения или способ по п.22, в котором микробный патоген представляет собой бактериальный патоген, выбранный из видов *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и/или *Streptococcus mutans*.

24. Система назальной доставки, применение, выделенный ЭПС для применения, композиция для применения или способ по п.22, в котором микробный патоген представляет собой вирусный патоген, выбранный из коронавируса OC43, аденовируса и/или риновируса/энтеровируса (пикорнавируса).

25. Композиция по п.12 или 13, применение по п.16, композиция для применения по любому одному из пп.17, 18 и 21-24 или способ по любому одному из пп.19-24, в котором количество, по меньшей мере, одного выделенного ЭПС в композиции в пересчете на общую массу композиции находится в диапазоне 0,00005-0,5% масс./масс., предпочтительно 0,0001-0,1% масс./масс. или более предпочтительно 0,0005-0,05%

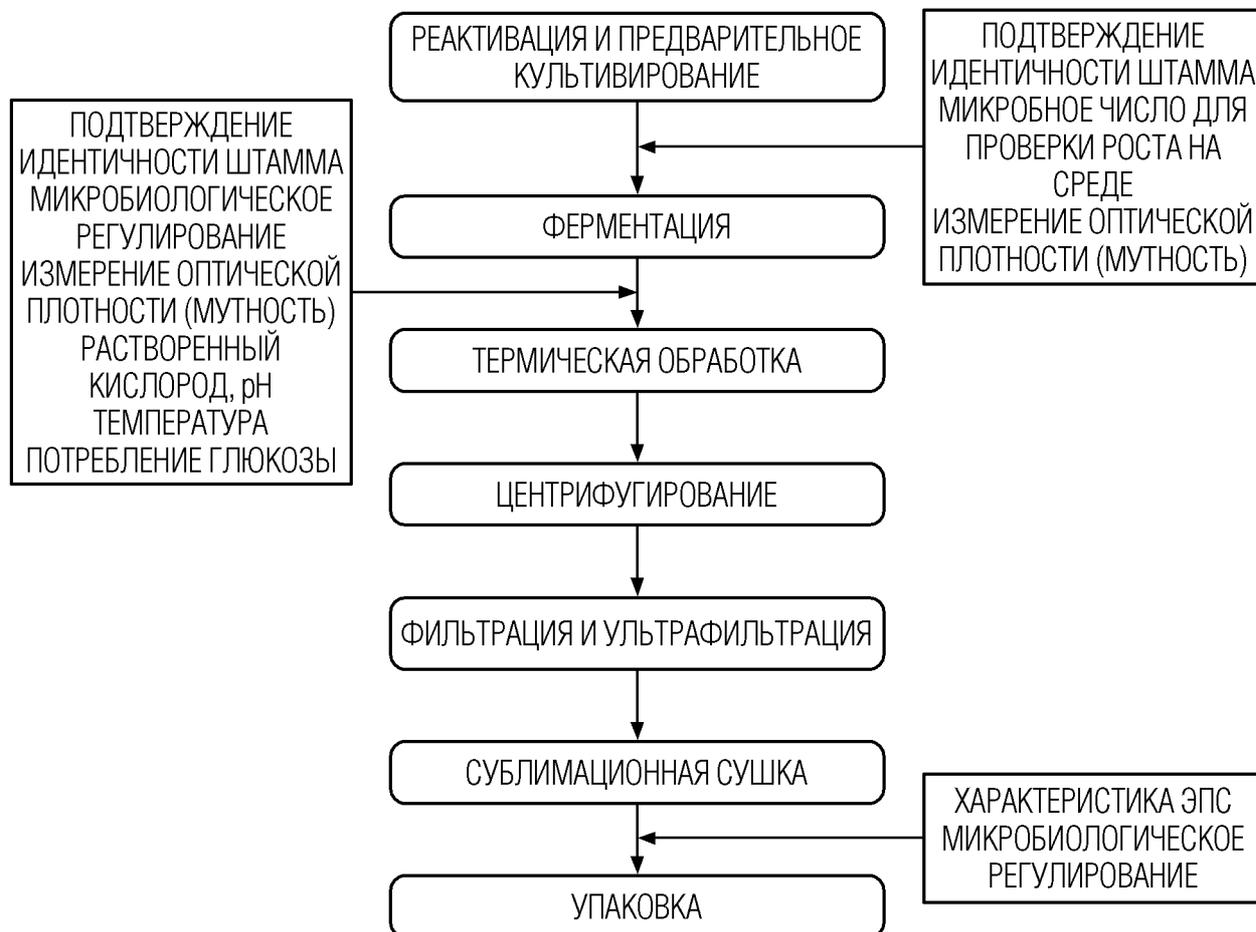
масс./масс.

26. Способ получения назальной композиции для ослабления вирулентности микробной патогенной инфекции путем ингибирования или снижения колонизации микробным патогеном в носовой полости, в котором способ включает стадию смешивания, по меньшей мере, одного выделенного экзополисахарида (ЭПС), происходящего из морских бактерий, с физиологическим раствором и необязательно подходящим носителем для получения назальной композиции, содержащей соль в концентрации от 0,1% до 10% масс./масс., предпочтительно от 0,5% до 5% масс./масс., более предпочтительно от 0,7% до 3% масс./масс.

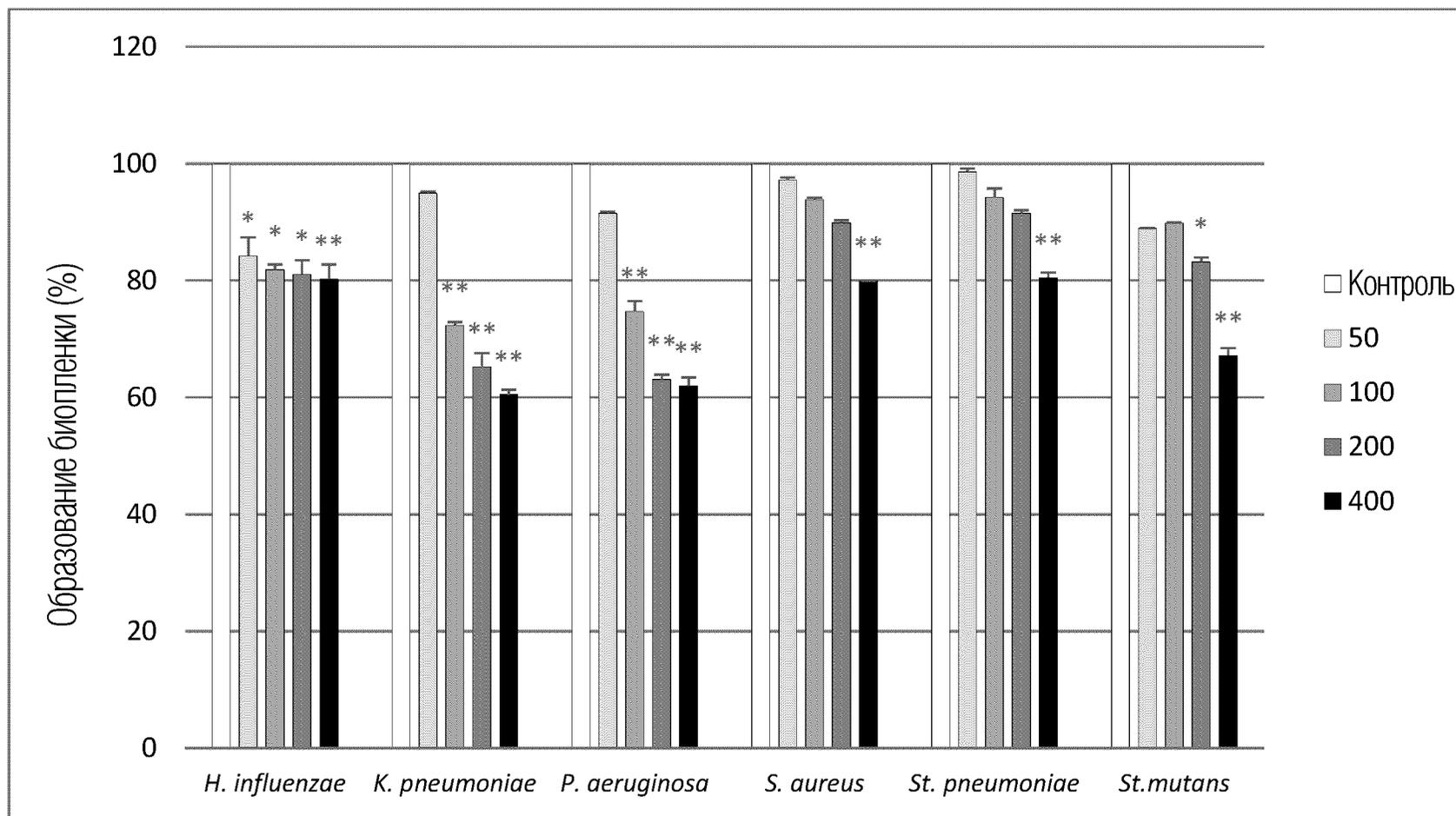
27. Способ по п.26, в котором, по меньшей мере, один выделенный ЭПС представляет собой, как определено по любому одному из пп.1-8.

28. Способ по п.27 или 28, в котором концентрация соли составляет приблизительно 0,9% масс./масс., приблизительно 2,2% масс./масс. или приблизительно 2,7% масс./масс.

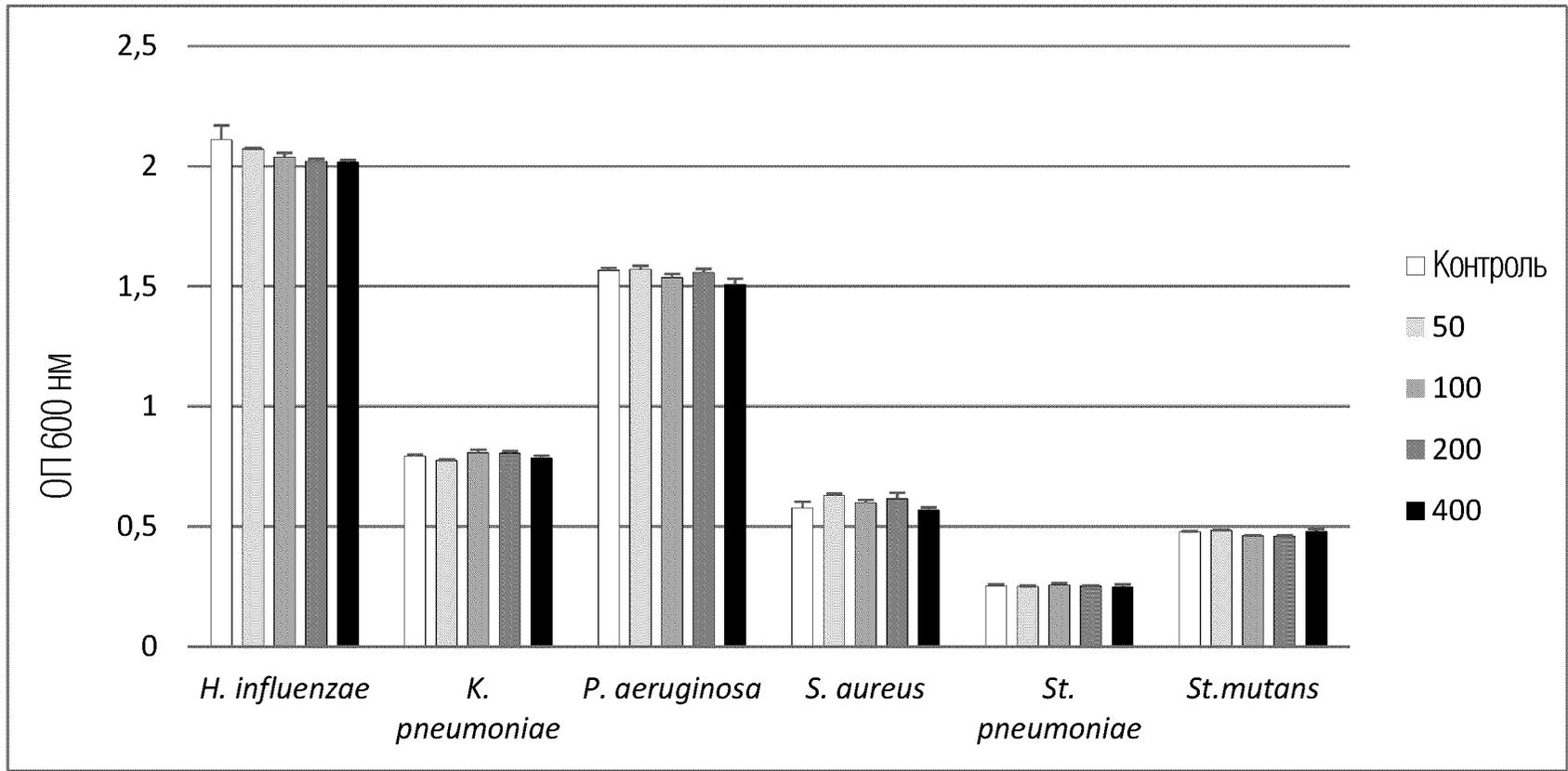
По доверенности



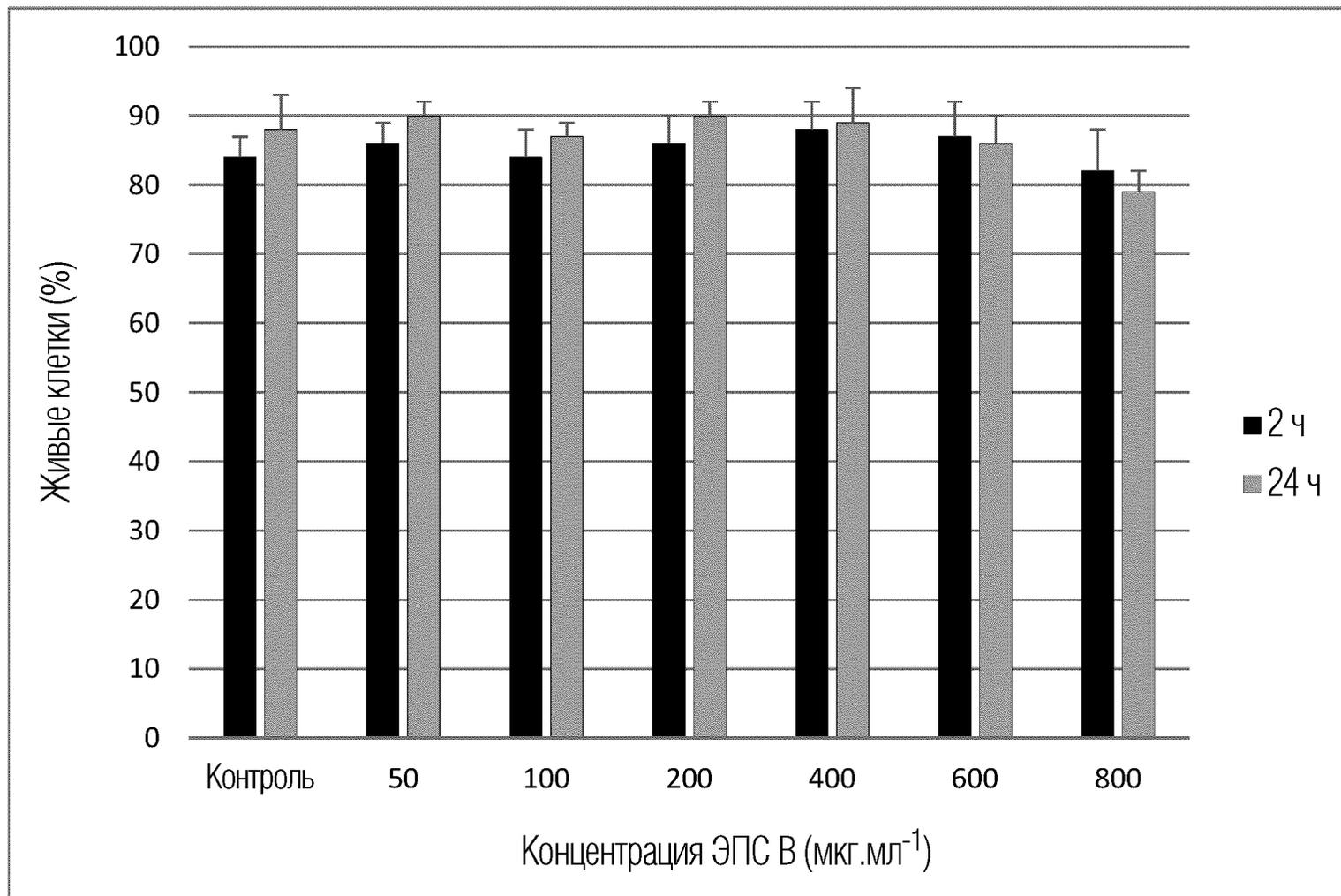
ФИГ. 1



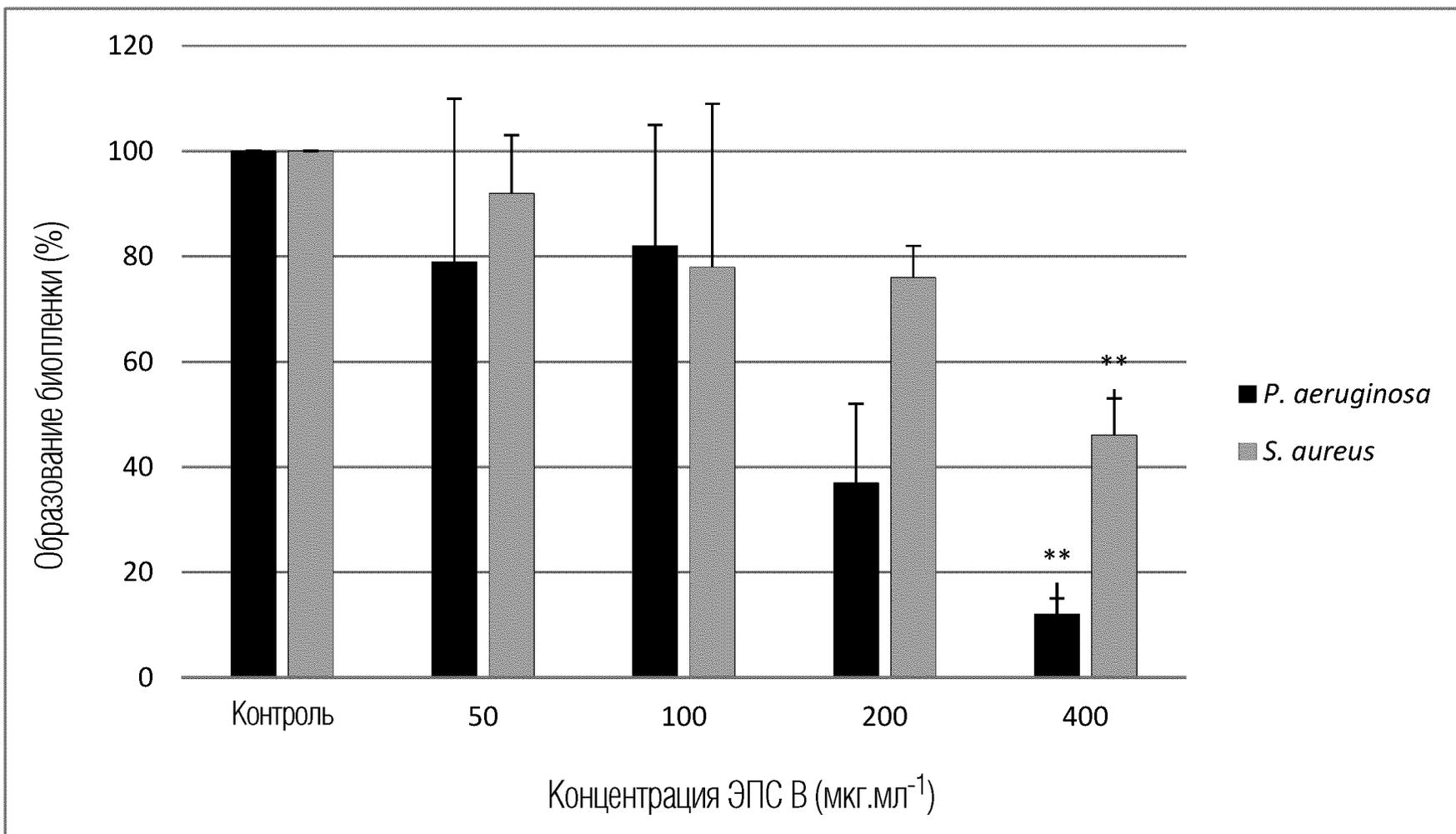
ФИГ. 2



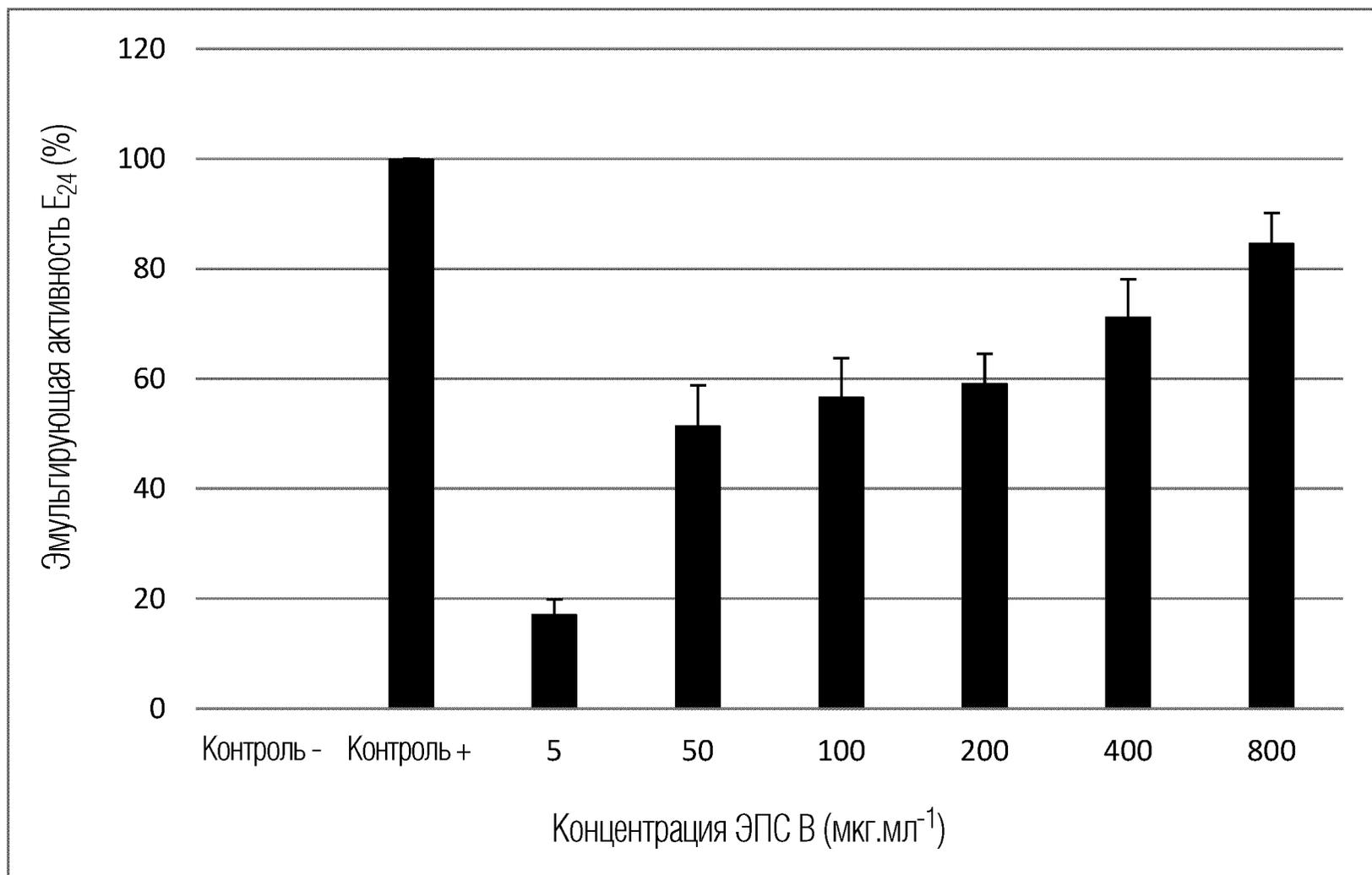
ФИГ. 3



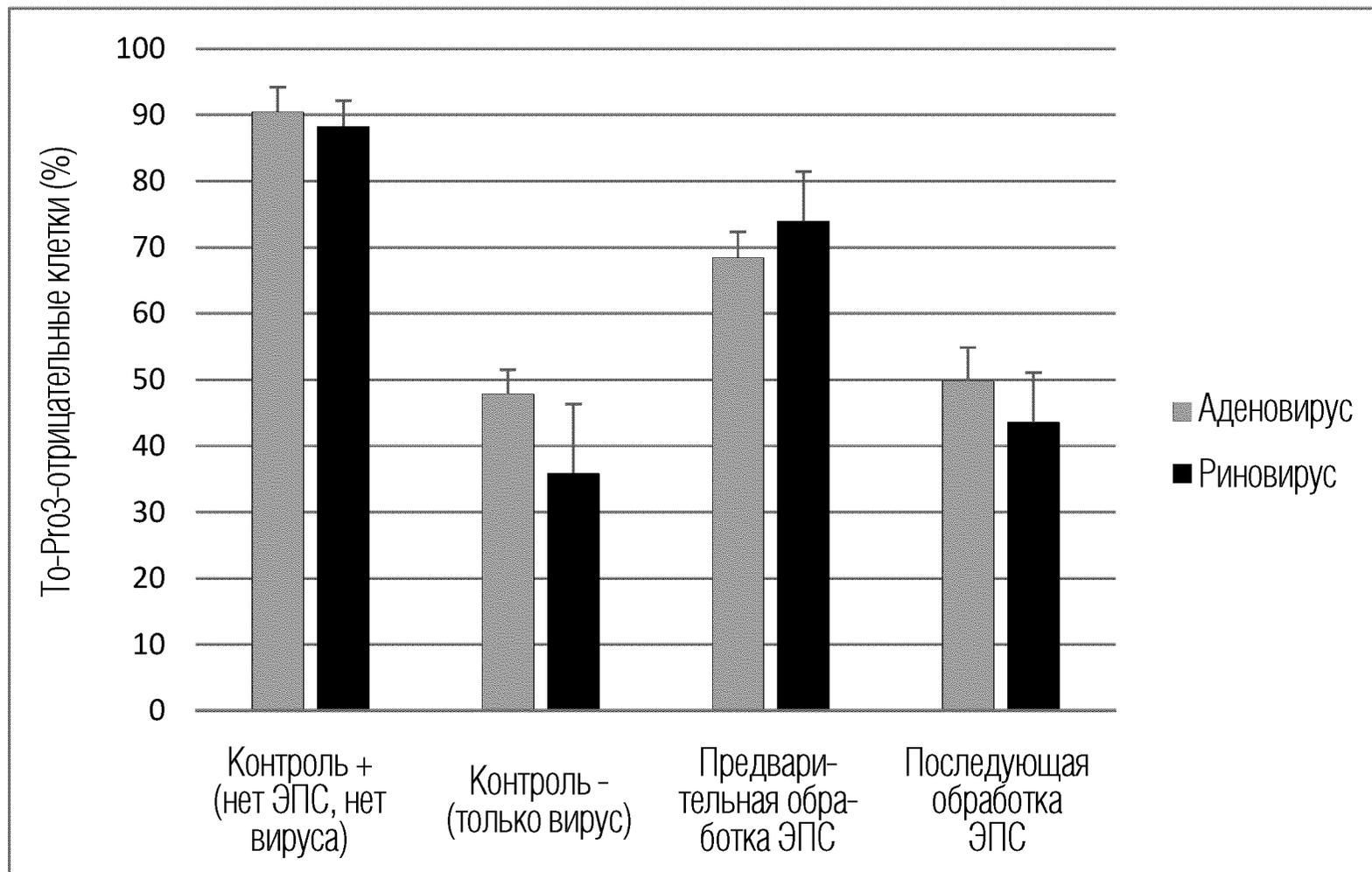
ФИГ. 4



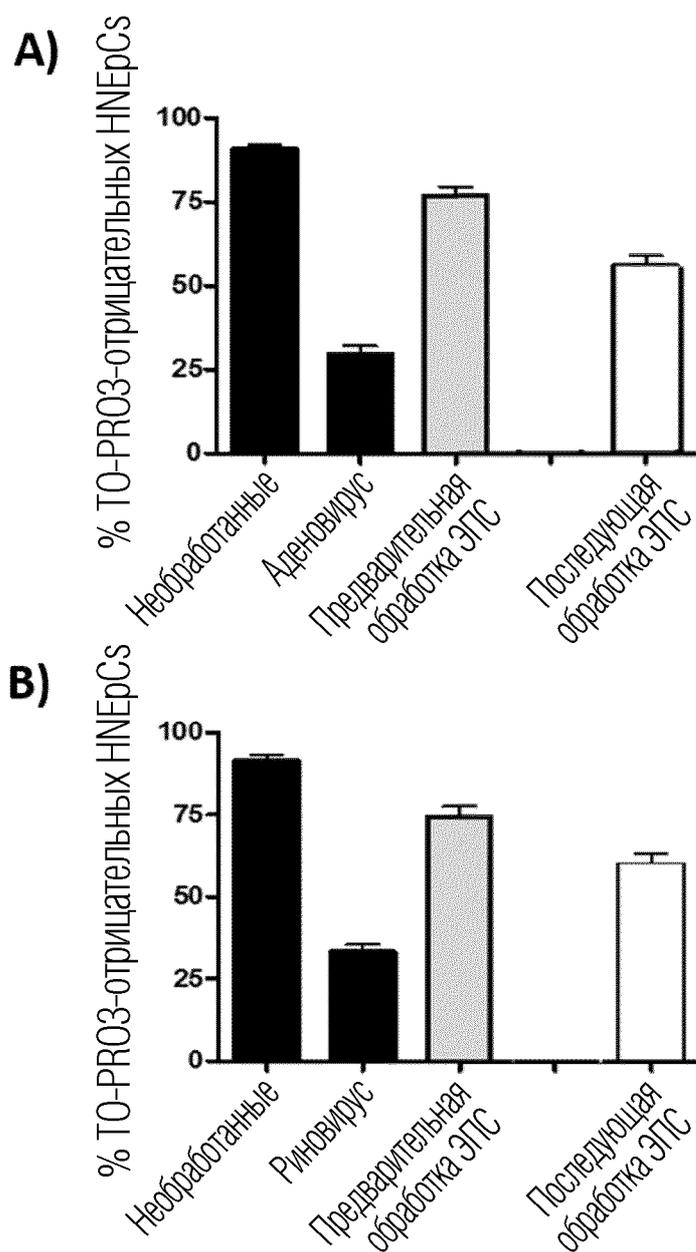
ФИГ. 5



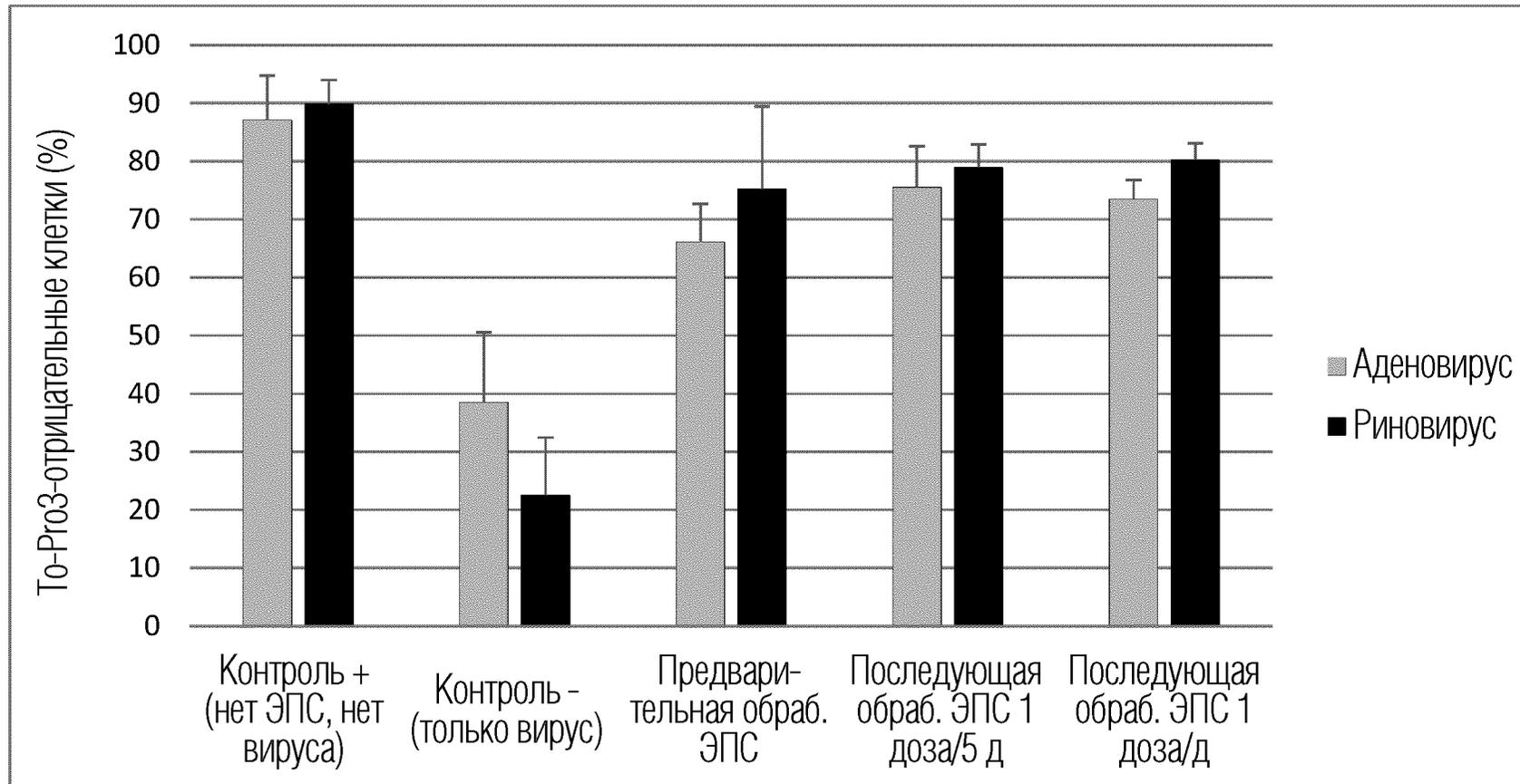
ФИГ. 6



ФИГ. 7

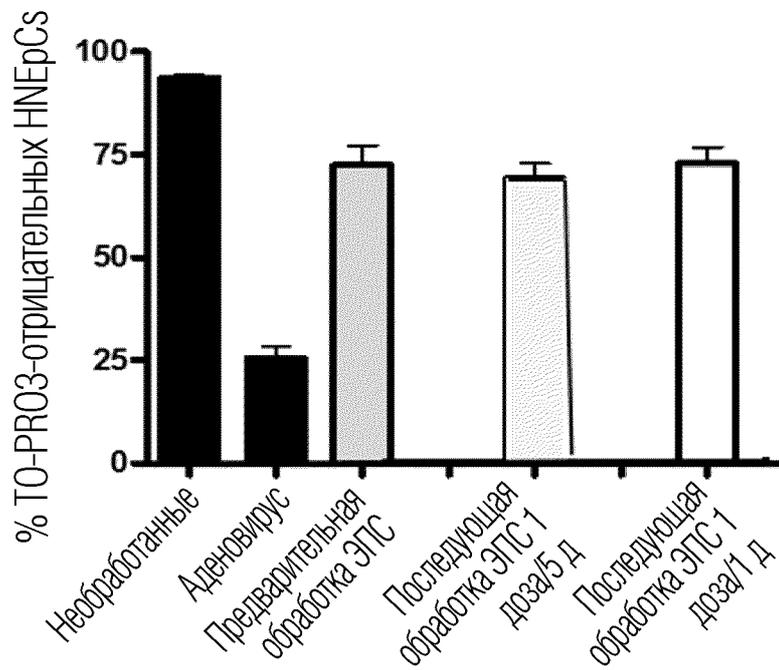


ФИГ. 8

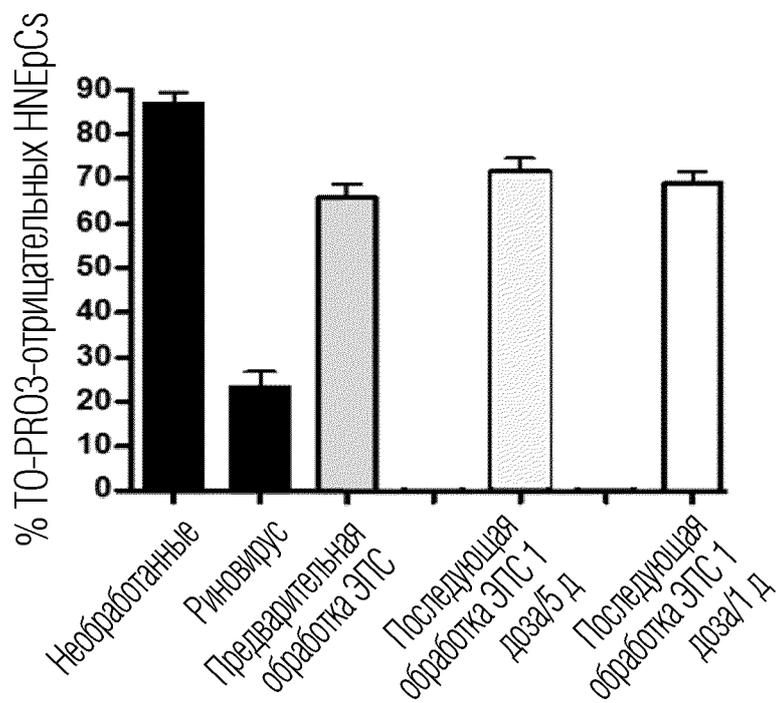


ФИГ. 9

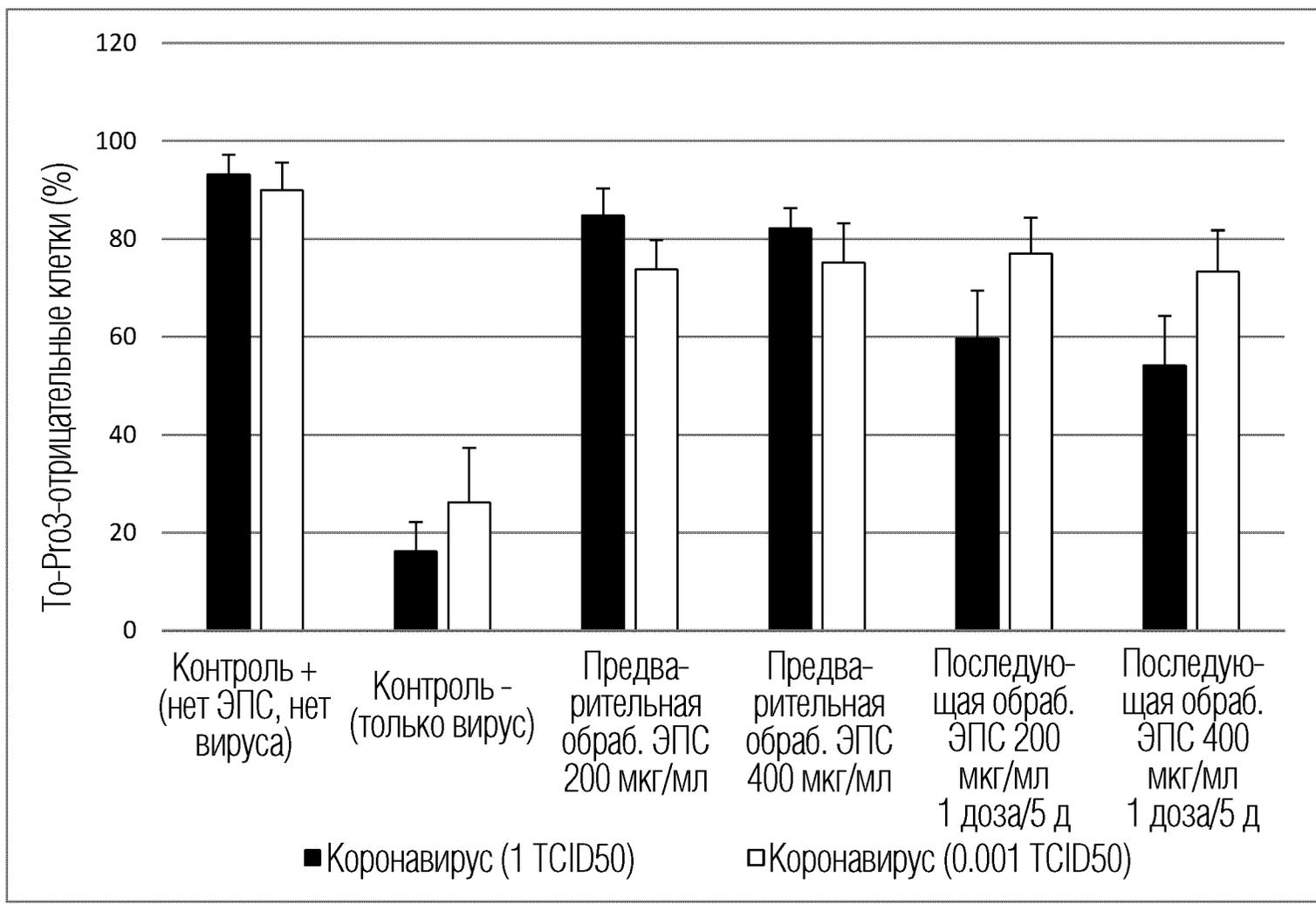
A)



B)

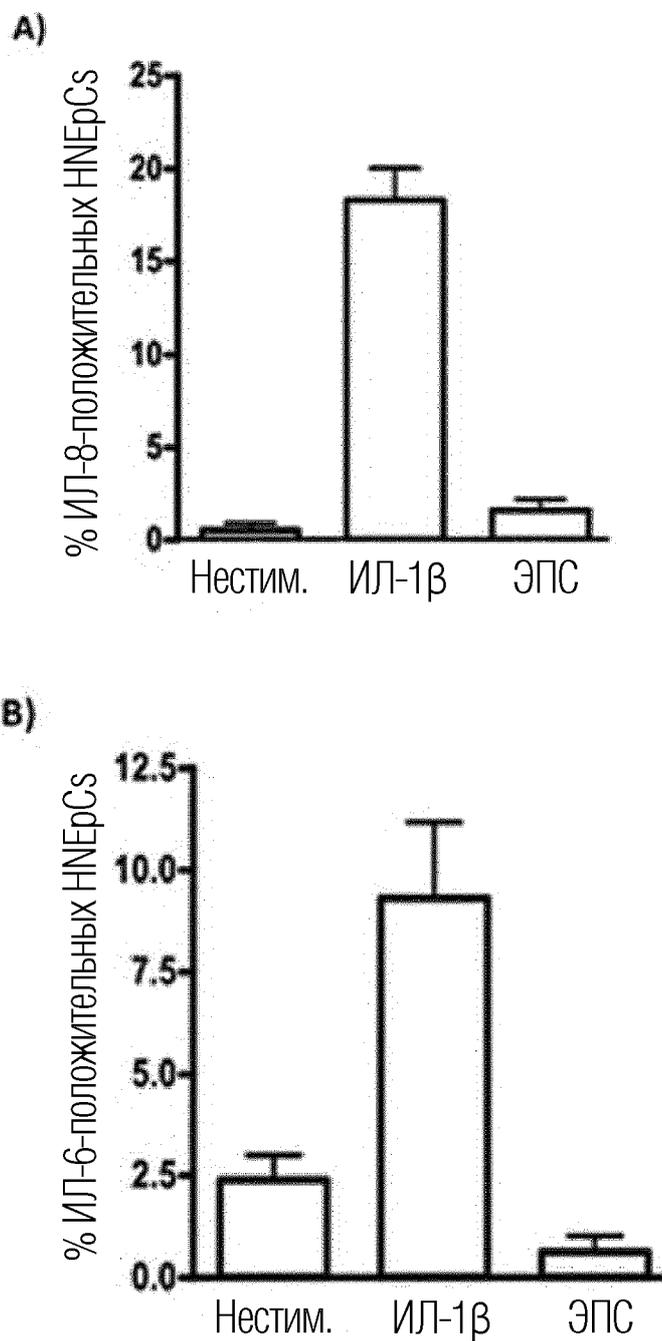


ФИГ. 10

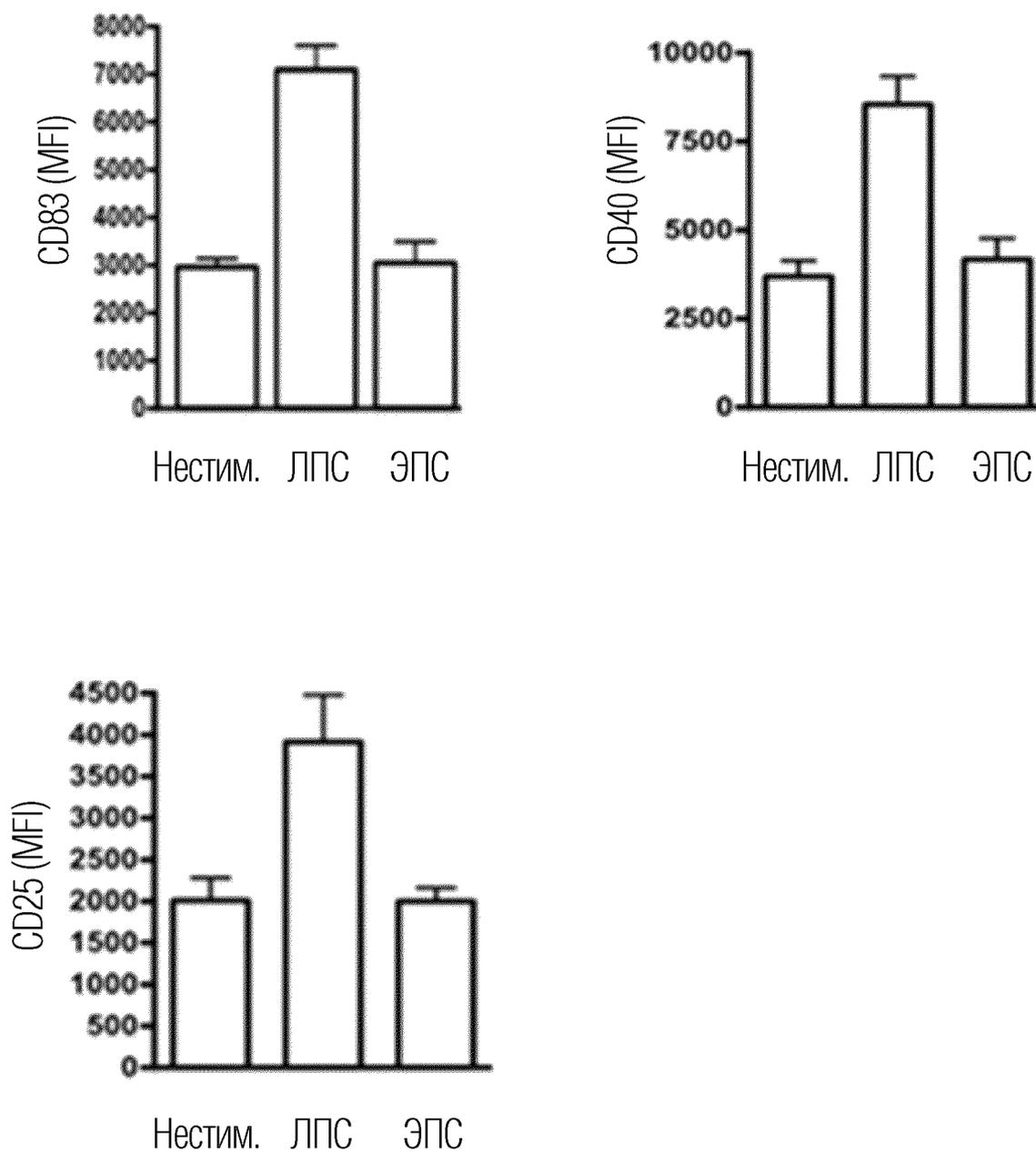


11/14

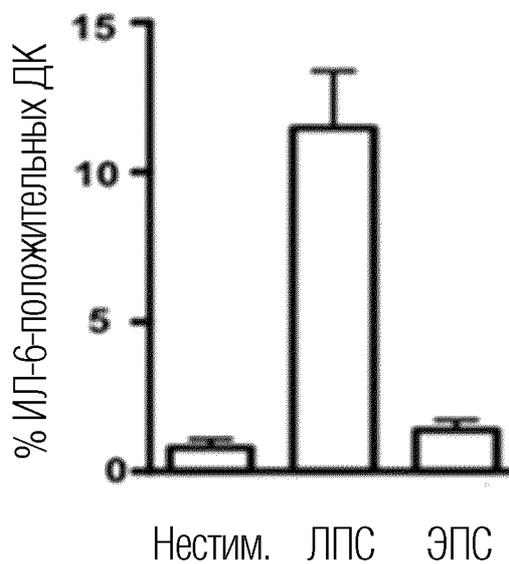
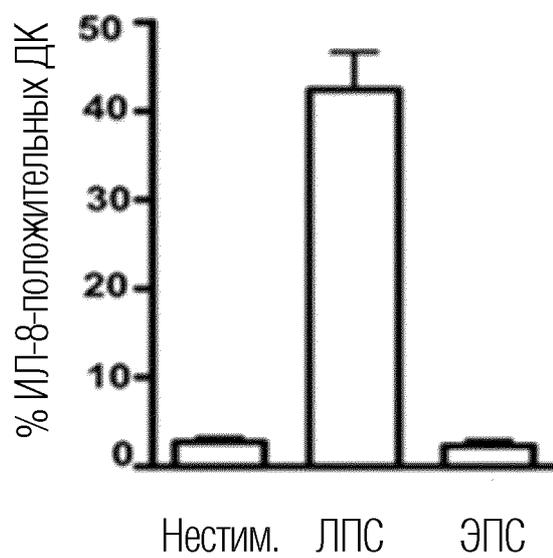
ФИГ. 11



ФИГ. 12



ФИГ. 13А



ФИГ. 13В