

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490428** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.04.11

(22) Дата подачи заявки
2022.08.12

(51) Int. Cl. *A61K 8/25* (2006.01)
A61K 8/92 (2006.01)
A61K 8/99 (2017.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/44 (2017.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(54) **РАСПЫЛЯЕМЫЙ СОСТАВ, СОДЕРЖАЩИЙ ЖИЗНЕСПОСОБНЫЕ И/ИЛИ СТАБИЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ**

(31) **BE2021/5643**

(32) **2021.08.12**

(33) **BE**

(86) **PST/EP2022/072628**

(87) **WO 2023/017141 2023.02.16**

(88) **2023.04.20**

(71) Заявитель:

**ЙЮН НВ; УНИВЕРСИТЕЙТ
АНТВЕРПЕН (BE)**

(72) Изобретатель:

**Хенкенс Тим, Клас Ингмар, Симонс
Аликс, Гамгами Имани, Лебер Сара,
Де Боек Ильке, Спасова Ирина (BE)**

(74) Представитель:

Кузнецова С.А. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к распыляемому составу, содержащему живые и/или стабильные бактерии, и способам изготовления такого распыляемого состава, в частности в форме жидкого спрея. Настоящее изобретение дополнительно относится к применению этого распыляемого состава в медицине или ветеринарии, а также к применению этого распыляемого состава для предупреждения и/или лечения респираторных заболеваний. В настоящем изобретении дополнительно представлены способы предупреждения и/или лечения респираторных заболеваний.

A1

202490428

202490428

A1

РАСПЫЛЯЕМЫЙ СОСТАВ, СОДЕРЖАЩИЙ ЖИЗНЕСПОСОБНЫЕ И/ИЛИ СТАБИЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к распыляемому составу, содержащему живые и/или стабильные бактерии, и способам изготовления такого распыляемого состава, в частности, в форме жидкого спрея. Настоящее изобретение дополнительно относится к применению этого распыляемого состава в медицине или ветеринарии, а также к применению этого распыляемого состава для предупреждения и/или лечения респираторных заболеваний. В настоящем изобретении дополнительно представлены способы предупреждения и/или лечения респираторных заболеваний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Респираторные вирусные инфекции (вызываемые вирусами гриппа, респираторно-синцитиальным вирусом (RSV), коронавирусами) связаны со значительным бременем для общественного здоровья и экономики, о чем свидетельствует пандемия тяжелого острого респираторного синдрома, вызываемого коронавирусом 2 (SARS-CoV-2). Инфекции респираторного тракта обычно возникают при попадании вдыхаемых вирусов, инфицирующих слизистые оболочки верхних дыхательных путей (URT), которые включают носовую полость, носоглотку и ротоглотку. Вирусные инфекции начинаются с того, что вирионы связывают специфический рецептор клетки-хозяина и затем проникают в эпителиальные клетки или клетки врожденного иммунитета, в зависимости от тропизма ткани. Последующая репликация вируса и повреждение клетки-хозяина запускают активацию сначала врожденной, а впоследствии и адаптивной иммунной системы. Типичными транскрипционными молекулярными маркерами активации противовирусного врожденного иммунитета являются регуляторные факторы интерферона (IRF) и ядерный фактор κB (NF- κB), которые активируют пути, ведущие к выработке интерферонов I и III типов, а также рекрутингу и активации лейкоцитов, таких как естественные клетки-киллеры и нейтрофилы, посредством выработки хемокинов. Чрезмерная или несбалансированная иммунная активация ассоциирована с разрушением тканей дыхательных путей и тяжелым

воспалением, как описано для коронавирусной болезни 2019 (COVID-19). Она характеризуется снижением выработки интерферонов I и III типов, сопровождающимся избыточной выработкой провоспалительных медиаторов, таких как IL-. Чрезмерная иммунная реакция с избыточным высвобождением провоспалительных цитокинов, называемая цитокиновым штормом, также возникает и при других респираторных вирусных заболеваниях, таких как грипп.

Микробиом, присутствующий на этих слизистых оболочках, выполняет важные многофакторные функции «привратника», блокируя входящие патогены и поддерживая барьерную функцию эпителия и иммунный гомеостаз. После первичного инфицирования URT некоторые вирусы могут запускать последующую пневмонию, такие как вирусы гриппа, RSV, вирус парагриппа человека (HPIV) и некоторые коронавирусы, такие как эндемичные коронавирусы человека (например, HCoV-229E) и недавно возникший SARS-CoV-2 и ассоциированные сопутствующие инфекции. Патобионты, в том числе *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* и *Moraxella catarrhalis*, потенциально могут получать пользу от индуцированного вирусом повреждения и иммунной дисфункции. Предыдущие исследования позволяют предположить, что стабильность основного микробиома URT нарушается во время респираторной вирусной инфекции, например, вызванной вирусами гриппа, что может открыть путь для избыточного роста патобионтов. Однако до сих пор хорошо не изучено, может ли микробиом у значительной части тяжелобольных пациентов быть недостаточно защищенным от сопутствующих инфекций или развития тяжелого воспаления.

Хотя предполагается, что респираторный микробиом выполняет важную функцию «привратника» в дыхательных путях, до сих пор лишь немногие испытания рассматривали модуляцию респираторного микробиома в качестве стратегии борьбы с респираторными вирусными инфекциями.

Поскольку пробиотики легко составлять в сухих форматах, таких как порошки, капсулы и таблетки, пероральный прием терапевтических препаратов для восстановления микробиома на сегодняшний день остается наиболее распространенным путем введения. Такие пероральные пути применения могут привести к системным противовирусным и противовоспалительным эффектам при попадании в кишечник через ось кишечник-легкие. Тем не менее, местное введение

микробиомной терапии в URT все чаще рассматривается как безопасная и более целевая альтернатива пероральному пути. Терапевтические средства для восстановления микробиома, вводимые в URT, могут напрямую блокировать или подавлять респираторные вирусы (профилактика), а также обеспечивать эффективную и прямую иммунную модуляцию в месте инфекции и воспаления. Действительно, целевая локальная иммунная стимуляция слизистой оболочки в пределах респираторной иммунной системы может иметь особые преимущества по сравнению с осью кишечник-легкие, например, за счет более прямого и эффективного контакта со специфическими клетками иммунной системы URT, например, более эффективной индукции подмножеств регуляторных Т-клеток.

Целевое применение и доставка этих составов сопряжены с рядом сложных технических и биотехнологических проблем. Одна из них заключается в том, что отобранные штаммы должны быть достаточно стойкими, чтобы выдержать стадии биопереработки: ферментацию для получения биомассы, концентрирование биомассы и сушку, при этом каждая стадия должна быть оптимизирована, чтобы обеспечить достаточный выход и сделать процесс в промышленных масштабах экономически целесообразным без потери качества. Для получения стабильного, долговечного и качественного пробиотического продукта можно использовать различные технологии и процессы сушки, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки, которые необходимо учитывать. При получении определенного штамма важно учитывать тип процесса, например, периодический или непрерывный, стоимость изготовления, а также условия обработки и нагрузки.

Однако наиболее важным конечным параметром является применимость высушенных пробиотиков и такие характеристики эффективности, как распределение частиц по размерам, плотность, сыпучесть порошка и поверхностные свойства. Эти свойства определяют дальнейшую обработку в составы для целевого применения в URT. В частности, целевое применение в горле может быть достигнуто с помощью пастилок или тающей таблетки с биоадгезивами или мукоадгезивами, такими как гидроксипропилцеллюлоза (HPC), карбоксиметилцеллюлоза (CMC), хитозан и различные набухающие полимеры для увеличения времени удержания в горле. Эти составы могут быть получены с относительной легкостью благодаря обширным исследованиям в области сухих и порошкообразных составов пробиотиков, таких как порошки, капсулы, таблетки и подобные производные. Существенный недостаток этих

составов заключается в том, что они являются сухими, и для микроорганизмов, находящиеся в них, необходима жидкость и определенном времени удержания для восстановления и повторной активации их метаболизма при попадании в целевую область горла или ротоглотки. При этом сухие порошковые составы обладают склонностью оказывать раздражающее действие на горло и ротоглотку.

Однако проблема заключается в том, что сухие составы не способны целенаправленно воздействовать на URT для обеспечения защиты и/или лечения респираторных заболеваний. При этом сухие порошковые составы обладают склонностью оказывать раздражающее действие на горло и ротоглотку.

Следовательно, целью настоящего изобретения является обеспечение состава, позволяющего доставлять микроорганизмы в целевую область горла или ротоглотки с высокой степенью дисперсности и временем удержания.

Было неожиданно обнаружено, что распыляемый состав, содержащий порошкообразные частицы жизнеспособных и/или стабильных бактерий, суспендированные в безводном носителе, где по меньшей мере 90% порошкообразных частиц бактерий характеризуются размером частиц, составляющим менее 400 мкм, где распыляемый состав не находится под давлением, обеспечивает решение вышеупомянутых проблем. В частности, было обнаружено, что такой распыляемый состав является простым в применении и однородно осаждается в горле, в отличие от сухих составов. Кроме того, поскольку по меньшей мере 90 % порошкообразных бактерий характеризуются размером частиц, составляющим менее 400 мкм, состав, содержащий порошкообразные бактерии, является распыляемым. Более того, размер частиц порошкообразных бактерий также обеспечивает то, что бактерии широко распределяются при введении распыляемого состава по настоящему изобретению. Указанный размер частиц порошкообразных бактерий считается относительно небольшим, и, следовательно, это приводит к тому, что частицы имеют большую поверхность контакта по сравнению с частицами, имеющими большой размер частиц. При этом благодаря указанному размеру частиц, на один объем приходится больше частиц по сравнению с частицами большего размера в том же объеме, поэтому больше порошкообразных бактерий осаждается в URT и меньше частиц удаляется из URT при глотании.

Кроме того, если по меньшей мере 90% порошкообразных бактерий характеризуются размером частиц, составляющим менее 400 мкм, в суспензии образуется меньше осадка. Таким образом, порошкообразные бактерии распределяются в суспензии однородно.

Дополнительно обнаружено, что распыляемый состав по настоящему изобретению усиливает естественную защитную функцию микробиома ротоносоглотки при респираторном вирусном заболевании. В частности, штаммы микробиома, принадлежащие к семейству *Lactobacillaceae*, демонстрируют многофакторное действие против различных фаз вирусных инфекций URT.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте настоящего изобретения представлен распыляемый состав, содержащий порошкообразные частицы жизнеспособных и/или стабильных бактерий, суспендированные в безводном носителе, где по меньшей мере 90% порошкообразных частиц бактерий характеризуются размером частиц, составляющим менее 400 мкм, где распыляемый состав не находится под давлением.

В частности, в настоящем изобретении представлен распыляемый состав, содержащий порошкообразные частицы жизнеспособных неспорообразующих бактерий, суспендированные в нелетучем безводном жидком носителе, где по меньшей мере 90% порошкообразных частиц бактерий характеризуются размером частиц, составляющим менее 400 мкм, где распыляемый состав находится под давлением окружающей среды; в частности, где распыляемый состав находится в форме жидкого спрея.

В дополнительном варианте осуществления распыляемый состав не содержит газа-пропеллента, в частности углеводородного газа-пропеллента.

В другом варианте осуществления распыляемый состав при распылении диспергируется в капли.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения безводный носитель (в частности, нелетучий безводный жидкий носитель) распыляемого состава имеет растительное происхождение, животное происхождение или минеральное происхождение, где предпочтительно безводный носитель (в частности, нелетучий безводный жидкий носитель) представляет собой масляный жидкий носитель, более

предпочтительно содержащий жирные кислоты, триглицериды, насыщенные или ненасыщенные жиры, производные стероидов или сложные масла, состоящие из фосфолипидов, сфинголипидов, гликолипидов или сульфоллипидов.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере 90% порошкообразных частиц бактерий характеризуются размером частиц, составляющим менее 400 мкм, предпочтительно от 1 до 250 мкм, более предпочтительно от 2 до 100 мкм, еще более предпочтительно от 5 до 50 мкм, наиболее предпочтительно от 5 до 10 мкм.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация порошкообразных частиц бактерий в суспензии составляет 0,1-20 вес.%, предпочтительно 1-10 вес.%, наиболее предпочтительно 3-7 вес.% от общего веса распыляемого состава.

В другом конкретном варианте осуществления распыляемый состав дополнительно содержит средство против осаждения, и в еще одном дополнительном конкретном варианте осуществления средство против осаждения представляет собой диоксид кремния и его производные.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация средства против осаждения составляет 0,01-10 вес.%, предпочтительно 0,1-5 вес.%, более предпочтительно 0,5-3 вес.% и наиболее предпочтительно 1-2,5 вес.% от общего веса распыляемого состава.

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения распыляемый состав содержит 50-99 вес.% безводного носителя, предпочтительно 70-98 вес.%, более предпочтительно 85-97 вес.%, наиболее предпочтительно 90-95 вес.% от общего веса распыляемого состава.

В еще одном дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения распыляемый состав содержит 50-99 вес.% нелетучего безводного жидкого носителя, предпочтительно 70-98 вес.%, более предпочтительно 85-97 вес.%, наиболее предпочтительно 90-95 вес.% от общего веса распыляемого состава.

В специальном варианте осуществления настоящего изобретения распыляемый состав дополнительно содержит реологическую добавку.

В дополнительном специальном варианте осуществления настоящего изобретения распыляемый состав дополнительно содержит антиоксиданты, в частности, выбранные из витамина D3 и E.

В другом специальном варианте осуществления настоящего изобретения распыляемый состав дополнительно содержит поверхностно-активные вещества, и/или эмульгаторы, и/или увлажняющие вещества.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения распыляемый состав дополнительно содержит биоадгезивы и/или мукоадгезивы.

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения распыляемый состав по настоящему изобретению дополнительно содержит подсластители и/или ароматизаторы.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения распыляемый состав по настоящему изобретению дополнительно содержит стабилизаторы состава, в частности, выбранные из группы, состоящей из эпикатехинов, хинонов, креатина, гидрокситирозола, пиридоксамина, цистеина, гомоцистеина, глутатиона или других веществ, улавливающих альфа-карбонилы.

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения жизнеспособные и/или стабильные бактерии в распыляемом составе по настоящему изобретению представляют собой пробиотические бактерии, в частности молочнокислые бактерии или виды *Staphylococcus*, в частности виды *Lactobacillus*.

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения молочнокислые бактерии в распыляемом составе по настоящему изобретению представляют собой виды *Streptococcus* или *Lactobacillus*, такие как *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. rhamnosus* и/или *L. casei*.

В другом специальном варианте осуществления настоящего изобретения распыляемый состав представляет собой ороназофарингеальный спрей.

В дополнительном специальном варианте осуществления настоящего изобретения распыляемый состав по настоящему изобретению представляет собой дерматологический спрей для местного применения.

В дополнительном конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к распыляемому составу по настоящему изобретению для применения в медицине или ветеринарии.

В другом конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к распыляемому составу по настоящему изобретению для применения в усилении естественной защитной функции микробиома ротоносоглотки.

В дополнительном конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к распыляемому составу по настоящему изобретению для применения в предупреждении и/или лечении вирусных, бактериальных и/или грибковых респираторных заболеваний.

В другом конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к распыляемому составу по настоящему изобретению для применения в предупреждении и/или лечении коронавирусных заболеваний.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения представлен способ получения распыляемого состава по настоящему изобретению, включающий стадию суспендирования порошкообразных частиц бактерий в безводном носителе, более конкретно, в нелетучем безводном жидком носителе.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу усиления естественной защитной функции микробиома ротоносоглотки, включающему стадию нанесения распыляемого состава по настоящему изобретению.

В еще одном дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения представлен способ предупреждения и/или лечения вирусных, бактериальных и/или грибковых респираторных заболеваний, включающий стадию нанесения распыляемого состава по настоящему изобретению.

В дополнительном конкретном варианте осуществления в настоящем изобретении представлен способ предупреждения и/или лечения коронавирусных заболеваний, включающий стадию нанесения распыляемого состава по настоящему изобретению.

В другом конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению распыляемого состава по настоящему изобретению для местного дерматологического нанесения.

В другом конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению распыляемого состава по настоящему изобретению для очистки поверхностей.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Теперь на конкретном примере фигур подчеркивается, что показанные конкретные детали приведены лишь в качестве примера и для целей иллюстративного обсуждения различных вариантов осуществления настоящего изобретения. Они приведены с целью предоставления того, что можно полагать наиболее практичным и легко доступным описанием принципов и концептуальных аспектов настоящего изобретения. В связи с этим не предпринимается попытка показать структурные детали настоящего изобретения подробнее, чем это необходимо для понимания принципов настоящего изобретения. Описание, взятое совместно с графическими материалами, делает очевидным для специалистов в данной области то, как можно реализовать на практике несколько форм настоящего изобретения.

Фиг. 1. Эксперимент по изучению временной динамики жизнеспособности бактерий при различных концентрациях в масле с 2% диоксида кремния, выраженных в КОЕ/г масляной суспензии, при 15°C. Контролем служит смесь пробиотиков *L. rhamnosus* и *L. plantarum*, которая выражена в КОЕ/грамм порошка (чистый штамм, не разбавленный в масле-носителе).

Фиг. 2. Эксперимент по изучению временной динамики жизнеспособности бактерий при различных концентрациях в масле с 2% диоксида кремния, выраженных в КОЕ/г масляной суспензии, при 25°C. Контролем служит смесь пробиотиков *L. rhamnosus* и *L. plantarum*, которая выражена в КОЕ/грамм порошка (чистый штамм, не разбавленный в масле-носителе).

Фиг. 3. Удерживание лактобактерий в горле через 30 мин, 2 и 4 часа после нанесения. Присутствие лактобактерий в горле тестируют на 3 разных людях, обозначенных как

P1 - P2 - P3, путем взятия мазка с мягкого нёба и задней части языка (поверхность составляет $\pm 2,5 \text{ см}^2$).

Фиг. 4. Данные о жизнеспособности бактерий при различных концентрациях в масле с 2% диоксида кремния при 4°C.

Фиг. 5. Жизнеспособность отдельных и объединенных *L. casei* AMBR2, *L. plantarum* WCFS1 и *L. rhamnosus* GG в порошке (A-B) или составе спрея для горла (C); иммуностимулирующая активность порошков (D-E), а также плацебо и исследуемого состава спрея без лактобактерий или с лактобактериями соответственно (F-G). Жизнеспособность комбинации штаммов оценивали при различных температурах хранения с течением времени: 4°C, 15°C и 25°C. КОЕ: колониеобразующие единицы. Условия среды представляют клетки как таковые и служат в качестве исходного уровня, поли(I:C) с концентрацией 50 мкг/мл с липофектаминам (Poly(I:C)50/Lipo) служат в качестве контрольного индуктора IRF, а LPS с концентрацией 20 нг/мл (LPS20) служит в качестве контрольного индуктора NF-κB. Данные изображены как среднее \pm SD для каждого условия. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ и **** $p < 0,0001$, как определено с помощью однофакторного теста ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Даннетта по сравнению с условиями среды (пунктирная линия).

Фиг. 6. Оценка удержания лактобактерий в пределах микробиома горла у здоровых добровольцев после нанесения спрея. (A) схема исследования; (B) относительное содержание лактобактерий в мазках из горла по результатам анализа микробиома с помощью секвенирования ампликонов 16S рРНК; (C) относительное содержание введенных лактобактерий в мазках из горла на основе анализа с помощью qPCR. Мазки из горла брали в исходном состоянии (T0), а также через 30 минут (T1) и 2 часа (T2) после применения спрея для горла. Присутствие *L. casei* AMBR2, *L. rhamnosus* GG и *L. plantarum* WCFS1 оценивали с помощью секвенирования ампликонов 16S рРНК (относительное содержание) в панели B. Через 30 минут и 2 часа использовали qPCR с видоспецифичными праймерами для оценки количества КОЕ/мл в группе исследуемого препарата в панели D. Согласно оценке на основании стандартной кривой предел обнаружения составляет 103 КОЕ/мл.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Как уже подробно описано в данном документе выше, в настоящем изобретении представлен распыляемый состав, содержащий порошкообразные частицы жизнеспособных и/или стабильных бактерий, суспендированные в безводном носителе, более конкретно, в нелетучем безводном жидком носителе.

В частности в настоящем изобретении представлен распыляемый состав, содержащий порошкообразные частицы жизнеспособных и/или стабильных бактерий, суспендированные в безводном носителе, где по меньшей мере 90% порошкообразных частиц бактерий характеризуются размером частиц, составляющим менее 400 мкм, где распыляемый состав не находится под давлением.

В другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлен распыляемый состав, содержащий порошкообразные частицы жизнеспособных неспорообразующих бактерий, суспендированные в нелетучем безводном жидком носителе, где по меньшей мере 90% порошкообразных частиц бактерий характеризуются размером частиц, составляющим менее 400 мкм, где распыляемый состав находится под давлением окружающей среды; и где распыляемый состав находится в форме жидкого спрея.

В дополнительном варианте осуществления распыляемый состав не содержит газа-пропеллента, в частности углеводородного газа-пропеллента.

В другом варианте осуществления распыляемый состав при распылении диспергируется в капли.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения безводный носитель (более конкретно, нелетучий безводный жидкий носитель) распыляемого состава имеет растительное происхождение, животное происхождение или минеральное происхождение, где предпочтительно безводный носитель (в частности, нелетучий безводный жидкий носитель) представляет собой масляный жидкий носитель, где более предпочтительно нелетучий безводный жидкий носитель содержит жирные кислоты, триглицериды, насыщенные или ненасыщенные жиры, производные стероидов или сложные масла, состоящие из фосфолипидов, сфинголипидов, гликолипидов или сульфолипидов.

В дополнительном конкретном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере 90% порошкообразных частиц бактерий характеризуются размером частиц от 1 до 250 мкм, более предпочтительно от 2 до 100 мкм, наиболее предпочтительно от 5 до 50 мкм.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере 90% порошкообразных бактерий характеризуются размером частиц, составляющим менее 400 мкм, предпочтительно от 1 до 250 мкм, более предпочтительно от 2 до 100 мкм, еще более предпочтительно от 5 до 50 мкм, наиболее предпочтительно от 5 до 10 мкм.

В конкретном варианте осуществления изобретения по меньшей мере 99% порошкообразных бактерий характеризуются размером частиц, составляющим менее 50 мкм, и/или по меньшей мере 80% порошкообразных бактерий характеризуются размером частиц, составляющим менее по меньшей мере 30 мкм, и/или 35% порошкообразных бактерий характеризуются размером частиц, составляющим менее 10 мкм.

В контексте настоящего изобретения термин «распыляемый» состав следует истолковывать как комбинацию компонентов, способных перемещаться в массе диспергированных капель. Дополнительно распыляемый состав может представлять собой не находящийся под давлением состав или находящийся под давлением состав, такой как аэрозольный распыляемый состав или распыляемый состав, подходящий для системы «клапанный мешок».

Соответственно, если в настоящей заявке упоминается «распыляемый состав», подразумевается, что он представляет собой «жидкий спрей», т.е. жидкую композицию, которая наносится путем распыления указанной композиции. Используемый в данном документе «жидкий спрей» представляет собой жидкий состав или композицию, которая переносится или движется по воздуху или вытесняется из хранилища в виде тумана или мелких капелек или капель.

В контексте настоящего изобретения термин «микроорганизм» относится к частицам «жизнеспособных» бактерий, что означает, что бактерии являются живыми, и не подразумевает их фрагменты, супернатанты культур, ферментированные формы или убитые формы. Указанные частицы жизнеспособных бактерий предпочтительно

подвергнуты сублимационной или распылительной сушке для повышения их сохранности.

В контексте настоящего изобретения термин «порошкообразные» бактерии означает, что частицы бактерий представляют собой мелкие сухие частицы, такие как в виде порошка или мелкой пыли.

Кроме того, в контексте настоящего изобретения термин «микрорганализм» относится к «стабильным» частицам бактерий, что означает, что частицы, содержащие жизнеспособные бактерии, являются стабильными, когда они суспендированы в безводном носителе (в частности, в нелетучем безводном жидком носителе). В частности, микроорганизмы по настоящему изобретению предпочтительно находятся в покоящемся состоянии, так что они не реплицируются/размножаются в распыляемом составе самом по себе. Под «стабильными» бактериями подразумевается, что микроорганизмы остаются в «покоящемся» состоянии и активируются только после нанесения распыляемого состава.

При этом в контексте настоящего изобретения термин «размер частиц» относится к среднему сечению или диаметру всех частиц бактерий. В частности, это означает, что большинство частиц в составе характеризуются диаметром в пределах указанных диапазонов. В частности, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% частиц в составе характеризуются диаметром в пределах указанных диапазонов.

Порошкообразные частицы жизнеспособных и/или стабильных бактерий могут содержать пробиотические бактерии. В контексте настоящего изобретения термин «пробиотик» подразумевает включение бактерий, которые обеспечивают пользу для здоровья при использовании в отношении людей или в области ветеринарии. Составы по настоящему изобретению очень подходят для состава, содержащего любые известные пробиотические микроорганизмы, такие как, без ограничения, лактобактерии, более конкретно *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* и/или *Lactobacillus casei*. Очевидно, что составы по настоящему изобретению могут содержать только один вид пробиотических микроорганизмов, или их комбинации, в зависимости от предполагаемого применения.

В конкретном варианте осуществления в настоящем изобретении представлен распыляемый состав, указанный в данном документе, где концентрация порошкообразных частиц бактерий в суспензии составляет от 0,1 до 20 вес.%, предпочтительно от 1 до 10 вес.%, наиболее предпочтительно от 3 до 7 вес.% по отношению к общей массе распыляемого состава.

Более конкретно, в настоящем изобретении представлен распыляемый состав, указанный в данном документе, где состав дополнительно содержит средство против осаждения. Такими средствами против осаждения могут быть диоксид кремния и его производные. Кроме того, средство против осаждения может быть гидрофильным или гидрофобным. В дополнение, средство против осаждения может представлять собой бентонит или средства против осаждения на основе электролитов. Средства против осаждения добавляют для предупреждения осаждения порошкообразных частиц бактерий, суспендированных в безводном носителе (в частности, в нелетучем безводном жидком носителе).

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрено, что средство против осаждения присутствует в количестве 0,01-10 вес.%, предпочтительно 0,1-5 вес.%, более предпочтительно 0,5-3 вес.% и наиболее предпочтительно 1-2,5 вес.% от общего веса распыляемого состава. В частности, если в распыляемом составе, указанном в данном документе, присутствовало 1-2,5% диоксида кремния через 3 месяца не заметно осаждения порошкообразных частиц бактерий, суспендированных в безводном носителе (в частности, в нелетучем безводном жидком носителе).

В дополнительном конкретном варианте осуществления настоящего изобретения распыляемый состав содержит 50-99 вес.% безводного носителя (в частности, нелетучего безводного жидкого носителя), предпочтительно 70-98 вес.%, более предпочтительно 85-97 вес.%, наиболее предпочтительно 90-95 вес.% от общего веса распыляемого состава.

В контексте настоящего изобретения термин «безводный» носитель означает жидкость, которая по существу не содержит воду, т.е. по существу свободна от воды. В частности, безводный носитель (в частности, нелетучий безводный жидкий носитель) может содержать максимальное количество воды, составляющее менее 5 вес.%, в частности, менее 4 вес.%, менее 3 вес.%, менее 1 вес.%, менее 0,5 вес.% воды от общего

веса распыляемого состава. Стабильная суспензия может быть получена, когда порошкообразные частицы жизнеспособных и/или стабильных бактерий суспендированы в безводном носителе (в частности, в нелетучем безводном жидком носителе).

В настоящем изобретении также представлен распыляемый состав, указанный в данном документе, дополнительно содержащий реологическую добавку. Реологические добавки могут присутствовать для изменения вязкости распыляемого состава. Типичными реологическими добавками, которые могут присутствовать в распыляемом составе по настоящему изобретению, являются полисахариды, например, производные целлюлозы, ксантановая камедь, пектин и производные кремния.

При этом в настоящем изобретении представлен распыляемый состав, указанный в данном документе, дополнительно содержащий антиоксиданты, в частности, выбранные из витамина D3 и E. Витамины или другие антиоксиданты могут присутствовать в распыляемом составе по настоящему изобретению для обеспечения антиоксидантного эффекта. Пероксиды оказывают негативный эффект на функциональность распыляемого состава, указанного в данном документе. Кроме того, для предупреждения прогоркания состава и ухудшения его вкусовых качеств с течением времени необходимо контролировать окисление, вызываемое пероксидами. Антиоксидантный эффект нейтрализует пероксид, усиливая функциональность распыляемого состава. Дополнительными антиоксидантами могут быть, например, аскорбиновая кислота, бисульфит натрия, тиосульфат натрия, аскорбилпальмитат, бутилгидроксианизол, бутилгидрокситолуол, пропилгаллат, альфа-токоферол, динатриевая соль EDTA.

Кроме того, в настоящем изобретении представлен распыляемый состав, указанный в данном документе, где распыляемый состав дополнительно содержит поверхностно-активные вещества, и/или эмульгаторы, и/или увлажняющие вещества. Типичные поверхностно-активные вещества/эмульгаторы/увлажняющие вещества представляют собой, например, глицерин, полиолы, эфиры жирных кислот.

В настоящем изобретении дополнительно представлен распыляемый состав, указанный в данном документе, где распыляемый состав дополнительно содержит биоадгезивы и/или мукоадгезивы. Такие адгезивы могут присутствовать в распыляемом составе по

настоящему изобретению для увеличения времени удержания в горле. Биоадгезивы и/или мукоадгезивы могут представлять собой, например, производные целлюлозы, подобные гидроксипропилцеллюлозе (НРС), карбоксиметилцеллюлозе (СМС), хитозан и/или различные набухающие полимеры, подобные полиакриловой кислоте.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения представлен распыляемый состав, указанный в данном документе, дополнительно содержащий подсластители и/или ароматизаторы. Ароматизаторы и подсластители, которые могут присутствовать в распыляемом составе по настоящему изобретению, как правило, представляют собой апельсин А, апельсин В, лимон, зубную пасту, мяту, перечную мяту, корицу, ирис, карамель, кофе, грейпфрут, клубнику/банан, ежевику, вишню, ваниль, малину, банан, клубнику.

В настоящем изобретении также представлен распыляемый состав, указанный в данном документе, где состав дополнительно содержит стабилизаторы состава, в частности, выбранные из группы, состоящей из эпикатехинов, хинонов, креатина, гидрокситирозола, пиридоксамина, цистеина, гомоцистеина, глутатиона или других веществ, улавливающих альфа-карбонилы. Стабилизаторы могут присутствовать в распыляемом составе по настоящему изобретению для уменьшения реакции Майяра. Реакция Майяра может представлять собой химическую реакцию между восстанавливающими сахарами и аминокислотами, которые обязательно присутствуют в микроорганизмах. Эта реакция будет оказывать влияние на стабильность запаха и цвета состава. Стабилизаторы состава уменьшают вероятность возникновения реакции Майяра и тем самым обеспечивают стабилизацию цвета и запаха распыляемого состава, указанного в данном документе.

В конкретном варианте осуществления жизнеспособные и/или стабильные бактерии в распыляемом составе по настоящему изобретению представляют собой пробиотические бактерии, в частности молочнокислые бактерии или виды *Staphylococcus*. Распыляемый состав, указанный в данном документе, может содержать пробиотические молочнокислые бактерии (в частности, виды *Lactobacillus*), и применение этого распыляемого состава позволяет модулировать микробиом дыхательных путей. Таким образом, пробиотическая активность молочнокислых бактерий в распыляемом составе, указанном в данном документе, заключается в предупреждении и/или лечении респираторных заболеваний.

Более конкретно, в распыляемом составе по настоящему изобретению могут присутствовать виды *Streptococcus* и/или *Lactobacillus*. Эти виды способны обеспечить предупреждение и/или лечение респираторных заболеваний. Еще более конкретно, распыляемый состав по настоящему изобретению может включать виды *Lactobacillus*, такие как *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. rhamnosus* и/или *L. casei*. Живые *L. casei*, *L. rhamnosus* и *L. plantarum* значимо активируют пути ядерного фактора (NF)-κB и регуляторного фактора интерферона (IRF) в моноцитах человека THP-1Dual. *L. casei* и *L. plantarum* специфически индуцировали экспрессию интерферона-β (IFN-β), интерферона I типа, необходимого для противовирусных ответов, в первичных эпителиальных клетках дыхательных путей человека. Инактивированные ультрафиолетом *L. rhamnosus* и *L. plantarum* сохраняли свою способность активировать пути NF-κB и IRF в моноцитах человека THP-1 Dual. Комбинация *L. casei*, *L. rhamnosus* и *L. plantarum* обеспечивала превосходную индукцию путей NF-κB и IRF в моноцитах человека THP-1 Dual.

В конкретном варианте осуществления *L. plantarum*, которая может присутствовать в распыляемом составе по настоящему изобретению, представляет собой штамм *L. plantarum*, характеризующийся по меньшей мере 97% сходством последовательности с SEQ ID NO:4 в его гене 16S рPHК.

В другом конкретном варианте осуществления *L. pentosus*, которая может присутствовать в распыляемом составе по настоящему изобретению, представляет собой штамм *L. pentosus*, характеризующийся по меньшей мере 97% сходством последовательности с SEQ ID NO:1 в его гене 16S рPHК.

При этом в другом конкретном варианте осуществления *L. rhamnosus*, которая может присутствовать в распыляемом составе по настоящему изобретению, представляет собой штамм *L. rhamnosus*, характеризующийся по меньшей мере 97% сходством последовательности с SEQ ID NO:5 в его гене 16S рPHК.

В частности, в настоящем изобретении дополнительно представлен распыляемый состав, указанный в данном документе, где штамм *Lactobacillus* выбран из перечня, содержащего *L. pentosus* YUN-V1.0, депонированный под номером доступа LMG P-29455 (депонирован в ВССМ 09 марта 2016 года); *L. plantarum* YUN-V2.0, депонированный под номером доступа LMG P-29456 (депонирован в ВССМ 09 марта

2016 года); и *L. rhamnosus* YUN-S1.0, депонированный под номером доступа LMG P-29611 (депонирован в ВССМ 12 мая 2016 года).

Упомянутые в данном документе микробиологические депозиты были внесены в коллекцию бактерий ВССМ/LMG («Бельгийские координированные коллекции микроорганизмов») с адресом для корреспонденции: Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, K.L. Ledeganckstraat 35 – 9000 Gent, Belgium

Lactobacillus pentosus YUN-V1.0 представляет собой изолят единичной колонии, полученный в нашей лаборатории после субкультивирования штамма, который первоначально был изолятом из влагалища здоровой женщины. Последовательность гена 16S рРНК (SEQ ID NO:1) для штамма *L. pentosus* YUN-V1.0 определили с помощью ПЦР с использованием праймеров 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' – SEQ ID NO:2) и 1525R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' – SEQ ID NO:3).

YUN-V2.0 представляет собой изолят единичной колонии, полученный в нашей лаборатории после субкультивирования штамма *Lactobacillus plantarum*, который был первоначально выделен из слюны человека. Последовательность гена 16S рРНК (SEQ ID NO:4) для штамма *L. plantarum* YUN-V2.0 определили с помощью ПЦР с использованием праймеров 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' – SEQ ID NO:2) и 1525R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' – SEQ ID NO:3).

YUN-S1.0 представляет собой изолят единичной колонии, полученный в нашей лаборатории после субкультивирования штамма *Lactobacillus rhamnosus*, который был первоначально выделен от здорового человека. Последовательность гена 16S рРНК (SEQ ID NO:5) для штамма *L. rhamnosus* YUN-S1.0 определили с помощью ПЦР с использованием праймеров 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' – SEQ ID NO:2) и 1525R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' – SEQ ID NO:3).

Эти конкретные штаммы «YUN» можно использовать как таковые или предпочтительно составлять в композицию, содержащую такие штаммы, в частности, распыляемый состав в виде жидкого спрея.

При введении распыляемый состав по настоящему изобретению усиливает естественную защитную функцию микробиома ротоносоглотки при респираторных вирусных заболеваниях. Таким образом, в настоящем изобретении дополнительно

представлен распыляемый состав, указанный в данном документе, где распыляемый состав представляет собой ороназофарингеальный спрей.

Другой аспект настоящего изобретения заключается в том, что распыляемый состав может представлять собой дерматологический спрей для местного применения. Распыляемый состав по настоящему изобретению можно наносить местно на кожу для восстановления микробиоты кожи. В частности, распыляемый состав можно применять для лечения симптомов кожных нарушений, связанных с избыточным ростом патобионтов, например, стафилококков, *Malassezia spp.*, *Trichophyton spp.* Кроме того, распыляемый состав по настоящему изобретению можно применять для уменьшения выработки неприятного запаха специфическими бактериями кожи, производящими неприятный запах.

При этом в настоящем изобретении раскрывается, что распыляемый состав также может представлять собой масляную суспензию. Эту масляную суспензию можно наносить как дерматологическое масло для местного применения. В качестве альтернативы эту масляную суспензию можно наносить для предупреждения и/или лечения заболеваний наружного слухового прохода, таких как наружный отит.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения заключается в том, что распыляемый состав, указанный в данном документе, можно применять в медицине и/или ветеринарии. Таким образом, распыляемый состав по настоящему изобретению можно применять в качестве лекарственного препарата. В частности, распыляемый состав по настоящему изобретению можно применять в качестве лекарственного препарата, в частности для усиления естественной защитной функции микробиома ротоносоглотки.

В дополнительном конкретном варианте осуществления распыляемый состав по настоящему изобретению можно применять для предупреждения и/или лечения вирусных, бактериальных и/или грибковых респираторных заболеваний. В более конкретном варианте осуществления распыляемый состав по настоящему изобретению можно применять для предупреждения и/или лечения коронавирусных заболеваний. В частности, распыляемый состав по настоящему изобретению применяется для предупреждения и/или лечения COVID-19.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения распыляемого состава, указанного в данном документе, включающему стадию суспендирования порошкообразных частиц бактерий в безводном носителе (в частности, в нелетучем безводном жидком носителе).

Кроме того и в дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу усиления естественной защитной функции микробиома ротоносоглотки, включающему стадию нанесения распыляемого состава, указанного в данном документе.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к способу предупреждения и/или лечения вирусных, бактериальных и/или грибковых респираторных заболеваний, включающему стадию нанесения распыляемого состава, указанного в данном документе.

При этом, в частности, настоящее изобретение относится к способу предупреждения и/или лечения коронавирусных заболеваний, включающему стадию нанесения распыляемого состава, указанного в данном документе. В частности, этот способ применяется для предупреждения и/или лечения COVID-19.

Более того, в дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к применению распыляемого состава, указанного в данном документе, для местного дерматологического нанесения.

Настоящее изобретение также относится к применению распыляемого состава, указанного в данном документе, для очистки поверхностей.

Теперь настоящее изобретение будет проиллюстрировано с помощью следующих синтетических и биологических примеров, которые никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Размер частиц и осаждение

Таблица 1. Процентная доля осаждения бактериального порошка (*L. rhamnosus*) с различным размером частиц в масляных суспензиях. Оценку производят при комнатной температуре.

	<u>Крупнозернистый порошок</u> 97% частиц размером менее 400 мкм, при этом по меньшей мере 25% менее 50 мкм	<u>Мелкозернистый порошок</u> 100% частиц размером менее 400 мкм, при этом по меньшей мере 90% менее 50 мкм	<u>Очень мелкозернистый порошок</u> 100% частиц размером менее 400 мкм, при этом по меньшей мере 99% менее 50 мкм
15 мин	10%	0%	0%
30 мин	16%	8%	4%
45 мин	20%	12%	4%
1 час	20%	12%	4%
1 час 30 мин	20%	15%	8%

Осаждение 20% означает, что бактериальный порошок полностью осажден. Крупнозернистый порошок осаждается быстрее, чем мелкозернистый и очень мелкозернистый. Применение мелкозернистого или очень мелкозернистого порошка в масляной суспензии является предпочтительным вариантом для получения суспензии, стабильной с течением времени.

Пример 2. Эффект диоксида кремния в качестве средства против осаждения

Этот способ демонстрирует эффект увеличения концентрации (1-1,5-2-2,5-3% мас./мас.) средства против осаждения (диоксида кремния) в масляной суспензии растительного происхождения (87-98% мас./мас.) с пробиотиком (1-2,5-5-10% мас./мас.). Оценивают скорость осаждения, агломерацию (визуальный контроль) и жизнеспособность пробиотиков. Смесь пробиотиков представляет собой комбинацию *L. rhamnosus* YUN-S1.0 и *L. plantarum* YUN-V2.0.

Таблица 2. Система кодирования для обозначения концентрации бактерий и диоксида кремния в масляной суспензии. Цифра обозначает концентрацию бактерий, а буква - концентрацию диоксида кремния.

		Диоксид кремния				
		1%	1,50%	2%	2,50%	3%
бактерии	1%	1a	1b	1c	1d	1e
	2,50%	2,5a	2,5b	2,5c	2,5d	2,5e
	5%	5a	5b	5c	5d	5e
	10%	10a	10b	10c	10d	10e

Осаждение и агломерацию измеряют в градуированных пробирках в начальный период времени, T3d, T1w, T2w, T1m, T2m, T3m, T6m, T12m, T18m, T24m, T36m. Жизнеспособность пробиотиков будут измерять в T0, T3m, T6m, T9m, T12m, T18m, T24m, T36m при 4°C - 15°C и 25°C путем посева с распределением и подсчета колоний.

Вязкость (в мПа.с) суспензий измеряли с использованием вискозиметра Брукфильда DV1 при температуре 22 +/- 2°C.

Таблица 3. Вязкость суспензий

		Диоксид кремния				
		1%	1,50%	2%	2,50%	3%
бактерии	1%	85,6	86	90,8	97,6	106,8
	2,50%	96	90,8	96,4	99,2	107,2
	5%	96,8	92	98	108,4	120
	10%	95	102	114,4	131,2	144

Таблица 4. Данные по осаждению при 4°C."

Время	1a	1b	1c	1d	1e	2,5a	2,5b	2,5c	2,5d	2,5e
3 дня	+	+	+	+	0	++	++	+	0	0
1 неделя	+	+	+	+	0	++	++	+	0	0
2 недели	+	+	+	+	0	++	++	+	0	0
1 месяц	+	+	+	+	0	++	++	+	0	0
2 месяца	+	+	+	+	0	++	++	+	+	0
3 месяца	++	+	+	+	0	++	++	+	0	0
6 месяцев	++	+	+	+	0	++	++	++	0	0
12 месяцев	++	++	+	+	0	+++	+++	++	0	0
18 месяцев	++	++	+	+	0	+++	+++	++	0	0

Время	5a	5b	5c	5d	5e	10a	10b	10c	10d	10e
3 дня	++	++	+	0	0	+	0	0	0	0
1 неделя	++	++	+	0	0	+	+	0	0	0
2 недели	++	++	+	0	0	+	+	0	0	0
1 месяц	++	++	++	+	+	++	+	+	0	0
2 месяца	++	++	++	+	0	+++	+	+	0	0
3 месяца	++	++	++	0	0	+++	++	0	0	0
6 месяцев	+++	+++	++	0	0	+++	+++	++	0	0
12 месяцев	+++	+++	+++	0	0	+++	+++	0	0	0
18 месяцев	+++	+++	+++	0	0	+++	+++	0	0	0

«0» = отсутствие осаднения, «+» = осаднение от 0 до 5%, «++» = осаднение от 5 до 10%, «+++» = осаднение >10%

Таблица 5. Данные по осаднению при 25°C.

Время	1a	1b	1c	1d	1e	2,5a	2,5b	2,5c	2,5d	2,5e
3 дня	+	+	+	0	0	+	+	+	0	0
1 неделя	+	+	+	0	0	+	+++	+	0	0
2 недели	+	+	+	+	0	+	+++	+	0	0
1 месяц	+	+	+	+	0	+	+++	+	0	0
2 месяца	+	+	+	0	0	++	+++	+	0	0
3 месяца	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6 месяцев	++	++	+	+	0	++	++	+	0	0
12 месяцев	++	++	+	0	0	+++	++	+	0	0
18 месяцев	++	++	+	0	0	++	++	+	0	0

Время	5a	5b	5c	5d	5e	10a	10b	10c	10d	10e
3 дня	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 неделя	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 недели	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 месяц	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 месяца	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3 месяца	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6 месяцев	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12 месяцев	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18 месяцев	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0

«0» = отсутствие осаднения, «+» = осаднение от 0 до 5%, «++» = осаднение от 5 до 10%, «+++» = осаднение >10%

Удивительным образом обнаружили, что при 25°C осаднение происходит в меньшей степени, чем при 4°C. Поскольку при более низких температурах вязкость увеличивается, можно было ожидать, что скорость осаднения суспендированных частиц порошка будет ниже. Также обнаружили (при 25°C), что более низкие

концентрации пробиотиков (1 и 2,5% мас./мас.) демонстрируют больше осаждения, чем более высокие концентрации, составляющие 5 и 10%, в то время как при 4°C наблюдалась обратная картина.

Для получения суспензии, стабильной при комнатной температуре, с данным типом диоксида кремния и выбранным порошком пробиотика предпочтительной является концентрация пробиотика, составляющая 5%, с по меньшей мере 1,5% диоксида кремния.

При 4°C и 25°C осаждение не отмечено для 2,5 и 3% диоксида кремния, в то время как при 2% диоксида кремния обнаружили небольшую зону осаждения.

2% гидрофобного модифицированного диоксида кремния данного типа, по-видимому, являются предпочтительными для получения суспензии, стабильной с течением времени, но необходимо учитывать характеристики распыления при этих более высоких концентрациях вследствие увеличения вязкости.

Пример 3. Жизнеспособность

Жизнеспособность различных бактерий тестировали в масле с 2% диоксида кремния при 15°C и 25°C, где бактерии присутствуют в частицах бактериального порошка, из которых по меньшей мере 90% характеризуются размером частиц, составляющим менее 400 мкм.

Как показано на фиг. 1, при хранении при 15°C жизнеспособность сохранялась для всех составов. При 25°C (фиг. 2) наблюдали более быстрое снижение количества жизнеспособных бактерий для более низких начальных концентраций пробиотических бактерий. Следовательно, концентрация, составляющая 5% (или больше) частиц бактериального порошка в распыляемом составе, по-видимому, является предпочтительной, так как позволяет получить долговременный стабильный и жизнеспособный продукт.

Пример 4. Удержание в горле

Тестируемый распыляемый состав (в виде жидкого спрея):

- 3 штамма пробиотиков в количестве 5% мас./мас.: *L. plantarum* YUN-V2.0, *L. casei* Ambr2, *L. rhamnosus* YUN-S1.0;
- Антиоксидант: в количестве 0,1% мас./мас.
- Витамин D3 в количестве 0,01% мас./мас.: 100 МЕ/грамм
- Гидрофильный диоксид кремния в количестве 1,5% мас./мас.
- Растительное масло-носитель в количестве 93,4% мас./мас.: смесь триглицеридов и жирных кислот

В этом исследовании принимали участие три человека.

Перед применением спрея для горла у каждого испытуемого брали холостой мазок (Копан) для оценки присутствия лактобактерий. Мазковую пробу брали с задней части мягкого нёба и задней части языка, растирая мазок в течение примерно 5 секунд на площади, составляющей около 2,5 см².

Кончики тампонов для мазков помещают в 1 мл 0,1 М буфера PBS. Получают серию 10-кратных серийных разведений для определения количества КОЕ на MRS посредством метода посева с распределением. Испытуемым распыляли \pm 500 микролитров распыляемого состава с использованием подходящей распылительной помпы с горловым аппликатором. Образцы собирали через 30 - 120 - 240 минут после применения спрея для горла. На протяжении этого времени запрещалось пить и есть.

На фиг. 3 показано, что количество обнаруженных лактобактерий в холостой пробе (до применения спрея для горла) составляет $5E01 \pm 2E01$ КОЕ/2,5 см² для всех испытуемых и образцов вместе взятых. Это указывает на то, что лактобактерии присутствуют в нормальном микробиоме полости рта. Среднее число удерживаемых бактерий через 30 мин после нанесения состава спрея для горла на основе пробиотиков составило $4E+05-8E05$ КОЕ/2,5 см², что было получено для всех образцов у всех испытуемых. Это количество постепенно снижалось до $3E03-4E03$ КОЕ/2,5 см² через 2 часа и до $7E02-9E02$ через 4 часа. Присутствие лактобактерий в 5 из 6 образцов в количестве, превышающем $1E03$ КОЕ/2,5 см², является успешным результатом. При частоте нанесения от 3 до 5 раз в день с помощью распыляемого состава можно получить защитный барьер из лактобактерий на срок от 12 до 24 часов.

Еще одним успешным результатом стало то, что после пребывания в полости рта в течение 4 часов извлеченные лактобактерии показали четкую зону ингибирования по отношению к другим присутствующим эндогенным микроорганизмам. Это указывает на то, что надежность выбранных штаммов является важным параметром, который необходимо учитывать.

Пример 5. Спрей для горла для ингибирования респираторного вируса и индукции пути интерферона.

Материалы и методы

Индукция NF-κB и IRF в моноцитах THP1-Dual

Моноциты THP1-Dual (Invivogen) содержали в среде RPMI 1640 (ThermoFisher Scientific) с 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS), 25 мМ HEPES и 2 мМ L-глутамин при 37°C, 5% CO₂. Для экспериментов с бактериями клетки THP1-Dual высевали в 96-луночный планшет в концентрации 10⁵ клеток/луночка. Бактерии добавляли к клеткам в количестве 10⁶ КОЕ/луночка для живых бактерий из культур, 10⁷ КОЕ/луночка для инактивированных ультрафиолетом бактерий из культур и 10⁸ КОЕ/луночка для порошкообразных бактерий. Спрей добавляли в разведении 1:20. Планшет инкубировали в течение 24 часов при 37°C и 5% CO₂. Индукцию NF-κB оценивали на основании активности SEAP-репортера при 405 нм с помощью планшет-ридера Synergy HTX (BioTek) после добавления пара-нитрофенилфосфатного (pNPP) буфера. Индукцию IRF оценивали на основании активности люминесценции люциферазного репортера с помощью планшет-ридера Synergy HTX (BioTek) после добавления буфера QUANTI-Luc™ (InvivoGen). Поли(I:C) с липофектаминоном 2000 (Invitrogen) в концентрации 50 мкг/мл для индукции IRF или липополисахарида (LPS) из *E. coli* (Sigma) в концентрации 20 нг/мл для индукции NF-κB использовали в качестве положительных контролей.

Состав спрея и оценка жизнеспособности бактерий

L. casei AMBR2, *L. rhamnosus* GG и *L. plantarum* WCFS1 составляли в спрей для целенаправленного воздействия в ротовой полости/глотке на основе комбинации бактериальных порошков в суспензии подсолнечного масла с Aerosil. Микробиомный

спрей состоял из высушенных сублимацией *L. casei* AMBR2, *L. plantarum* WCFS1 и *L. rhamnosus* GG в соотношении 50%, 33,3% и 16,7% соответственно.

Жизнеспособность порошков отдельных штаммов оценивали при 4°C и 25°C каждые 4 недели на протяжении периода времени, составляющего 6 месяцев, путем ресуспендирования порошков в PBS и посева серийных разведений на MRS-агар. Количество КОЕ/г порошка оценивали по сравнению с начальной концентрацией. Для смеси порошков или конечного состава спрея жизнеспособность оценивали при 4°C, 15°C и 25°C на протяжении периода, составляющего 6 месяцев. Каждые 4 недели порошки (после суспендирования в PBS) или спреи высевали в серийных разведениях на MRS-агар для измерения количества КОЕ/г порошка или спрея.

Оценка удерживания лактобактерий в горле здоровых участников исследования

Чтобы оценить, способны ли бактерии, содержащиеся в спрее, временно колонизировать горло, 12 участников исследования, представляющих собой здоровых взрослых мужчин и женщин, попросили применить спрей и сдать мазки из горла в начале, через 30 минут и через 2 часа после введения спрея.

В каждый момент времени с помощью тампонов для мазков eNAT™ собирали по 2 мазка из горла для выделения ДНК микроорганизмов с использованием набора для выделения ДНК PowerFecal (Qiagen) и помещения в PBS для культивирования лактобактерий на MRS-агаре. Секвенирование парных концов с двойным индексированием образцов из горла проводили в области V4 гена 16S рРНК на настольном секвенаторе MiSeq (M00984, Illumina), как описано ранее (De Boeck et al. 2017, 2019).

Для анализа с помощью qPCR разработали видоспецифичные праймеры для *L. casei* AMBR2, *L. plantarum* 381 WCFS1 и *L. rhamnosus* GG. Первоначально для каждого вида получали стандартную кривую для оценки соотношения Ct~CFU. Экспрессию генов количественно определяли с помощью RT-qPCR на системе для ПЦР в реальном времени StepOne Plus (v.2.0; Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США). Каждый образец ДНК амплифицировали с помощью мастер-микса для ПЦР PowerSYBR® Green (Applied Biosystems) в общем объеме 20 мкл с 0,15 мкМ каждого праймера, 40 нг кДНК и водой без нуклеаз. Мазки из горла собирали путем взятия мазка вдоль задней стенки горла и обеих миндалин и культивировали после

ресуспендирования в 1 мл PBS и посева серийных разведений на MRS-агар. Планшеты инкубировали в течение 2 дней при 37°C.

Результаты

Хотя в настоящее время большинство спреев на основе пробиотиков для URT состоят из бактериальной суспензии в физиологическом растворе или PBS, масло (в качестве нелетучего безводного носителя) выбирали для увеличения удерживания бактерий в горле и обеспечения достаточной дозировки количества КОЕ жизнеспособных пробиотиков. Во-первых, жизнеспособность каждого штамма бактерий в форме высушенного сублимацией порошка оценивали при 4°C и 25°C (фиг. 5А). Для всех трех штаммов жизнеспособность при 4°C оставалась стабильной с течением времени. Для *L. casei* AMBR2 и *L. plantarum* WCFS1 не наблюдали log-уменьшения количества, при этом оно уменьшилось от $2,79 \times 10^{10}$ КОЕ/г порошка и $3,56 \times 10^{11}$ для AMBR2 и WCFS1 соответственно в начале исследования до $2,21 \times 10^{10}$ КОЕ/г порошка и $3,15 \times 10^{11}$ КОЕ/г порошка через 26 недель. Для *L. rhamnosus* GG жизнеспособность снижалась от $1,18 \times 10^{11}$ КОЕ/г порошка до $7,15 \times 10^{10}$ КОЕ/г. При комнатной температуре (25°C) наиболее стабильным оказался *L. plantarum* WCFS1 с уменьшением на 1 log на 26 неделе ($5,84 \times 10^{10}$), в то время как этот показатель составил $8,57 \times 10^9$ для *L. rhamnosus* GG и $2,02 \times 10^7$ для *L. casei* AMBR2.

Далее авторы настоящего изобретения оценивали различные концентрации штаммов в смеси. Обнаружили, что оптимальное соотношение после длительного хранения при комнатной температуре, что соответствовало предполагаемым условиям хранения, составляет *L. casei* AMBR2 в количестве 50%, *L. plantarum* WCFS1 в количестве 33,3% и *L. rhamnosus* GG в количестве 16,7%. Затем проводили оценку жизнеспособности объединенных штаммов бактерий в форме порошка (фиг. 5В) и в составе спрея для горла (фиг. 5С) при 4°C, 15°C и 25°C. Для смешанных порошков (фиг. 5В) жизнеспособность немного снизилась от $2,09 \times 10^{11}$ КОЕ/г в начале исследования до $1,11 \times 10^{11}$, $4,51 \times 10^{10}$ и $8,01 \times 10^9$ КОЕ/г через 26 недель хранения при 4°C, 15°C и 25°C соответственно. Для состава спрея (фиг. 5С) жизнеспособность, составляющая в начале исследования $3,78 \times 10^9$ КОЕ/г спрея, оставалась стабильной при 4°C и 15°C в течение 26 недель. При температуре 25°C наблюдалось уменьшение на 2 log ($3,3 \times 10^7$ КОЕ/г) через 26 недель.

Впоследствии авторы настоящего изобретения подтвердили сохранение иммуностимулирующей активности в моноцитах человека для штаммов и их комбинации в форме порошка (фиг. 5D-E), а также в составе спрея в масле (фиг. 5F-G). Все отдельные штаммы в форме порошка и их комбинация по-прежнему были способны к значительной индукции IRF и NF-κB (фиг. 5D-E) при дозе, составляющей 10^8 КОЕ/мл, что соответствует концентрации *L. casei* AMBR2 на впрыскивание, ранее тестированного на здоровых добровольцах. Иммуностимулирующее действие состава спрея для горла с тремя штаммами в масляной суспензии также сравнивали с масляным составом плацебо без лактобактерий. Состав спрея для горла с *L. casei* AMBR2 в количестве 50%, *L. plantarum* WCFS1 в количестве 33,3% и *L. rhamnosus* GG в количестве 16,7% в масле в значительной степени индуцировал IRF и NF-κB в моноцитах человека (фиг. 5F-G). Несмотря на то, что состав плацебо также индуцировал NF-κB, хотя и в меньшей степени по сравнению с составом спрея с лактобактериями, он не оказывал существенного влияния на IRF.

Наконец, используя лонгитюдную плацебо-контролируемую схему сбора образцов, авторы настоящего изобретения оценили удержание лактобактерий, введенных в составленном спрее, в горле 12 здоровых добровольцев. Присутствие живых бактерий оценивали с помощью культивирования и количественной полимеразной цепной реакции (qPCR), а общее удержание лактобактерий определяли количественно с помощью секвенирования ампликона 16S рНК на уровне ДНК (фиг. 6A). В начале исследования добровольцы использовали исследуемый спрей, выполняя два распыления, содержащие примерно $9,5 \times 10^8$ КОЕ лактобактерий, или спрей-плацебо, не содержащий лактобактерий, и мазки из горла собирали на исходном уровне, через 30 мин и через 2 часа (фиг. 6A). Анализ микробиома мазков из горла показал, что доминирующие роды бактерий в горле принадлежат к каноническим комменсалам горла, таким как *Prevotella*, *Veillonella* и *Streptococcus*. График анализа главных координат (PCoA), построенный на основе данных микробиома по всем моментам времени, не выявил четкой кластеризации по группе лечения ни в одном из протестированных моментов времени (данные не показаны). Между группами плацебо и исследуемого спрея наблюдали четкую разницу в относительном содержании вариантов последовательностей ампликона (ASV) *Lactobacillaceae*, особенно через 30 минут после применения спрея (фиг. 6B). Через 30 минут после применения спрея в группе исследуемого препарата обнаружили три ASV *Lactobacillus*, соответствующие

введенным штаммам. ASV 1 *Lactobacillus* (*L. rhamnosus*) обнаружили у всех 6 участников группы исследуемого препарата, в то время как ASV 3 *Lactobacillus* (*L. casei*) и ASV 7 *Lactobacillus* (*L. plantarum*) обнаружили у 5 из 6 участников. В группе плацебо эти ASV *Lactobacillus* не обнаружили, за исключением одного участника исследования, который характеризовался низким относительным содержанием эндогенного ASV *Lactobacillus casei* через 30 минут. Через 2 часа у 5 из 6 участников исследования в группы исследуемого препарата все еще обнаруживались ASV *Lactobacillus*.

Чтобы подтвердить и количественно оценить высокое содержание введенных штаммов, наблюдаемое при секвенировании ДНК, полученной из образцов в группе исследуемого препарата после введения бактерий, авторы настоящего изобретения попытались оценить количество КОЕ/мл на основе целевой qPCR (фиг. 6С). В соответствии с данными секвенирования через 30 минут расчетное количество КОЕ для *L. rhamnosus* GG в группе исследуемого препарата составляло $1,26 \times 10^4$ - $9,24 \times 10^5$ КОЕ/мл. Для *L. casei* AMBR2 расчетное количество КОЕ/мл находилось в диапазоне от $1,72 \times 10^5$ до $1,8 \times 10^7$ КОЕ/мл, а для *L. plantarum* WCFS1 в диапазоне от $4,63 \times 10^4$ КОЕ до $3,36 \times 10^6$ КОЕ. Через 2 часа количество обнаруженных лактобактерий уменьшилось. За исключением одного участника исследования *L. rhamnosus* GG и *L. plantarum* WCFS1 больше не обнаруживали. С другой стороны, *L. casei* AMBR2, который вводили в спрей в самом высоком соотношении 50%, все еще обнаруживали у 5 из 6 участников при среднем количестве КОЕ/мл, составляющем 4×10^3 КОЕ/мл.

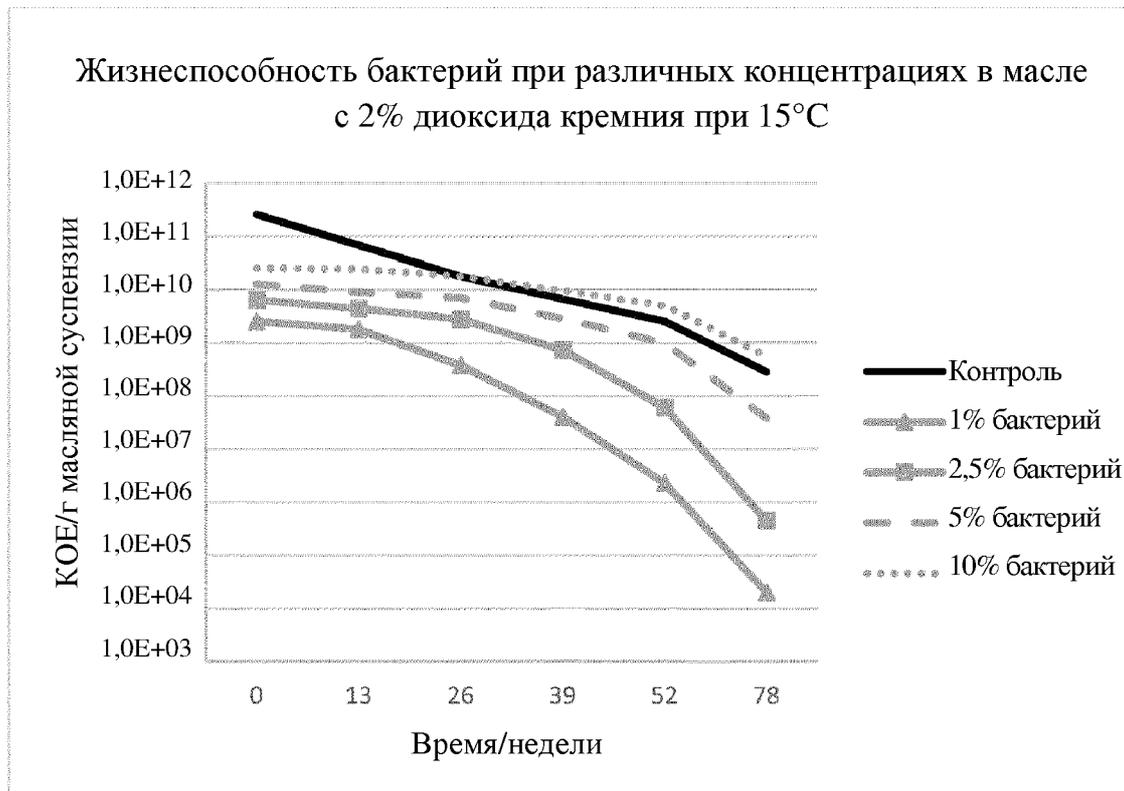
Помимо анализа ДНК бактерий авторы настоящего изобретения также культивировали мазки из горла, чтобы определить, были ли жизнеспособными введенные лактобактерии. Культивируемые мазки из горла группы исследуемого препарата продемонстрировали морфологию колоний, типичную для трех введенных штаммов *Lactobacilaceae*, а видовую принадлежность подтвердили с помощью ПЦР колоний и секвенирования гена 16S рРНК, что подтверждает, что виды, соответствующие введенным с помощью спрея, обнаруживают в горле с помощью их ДНК, и они могут оставаться жизнеспособными.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

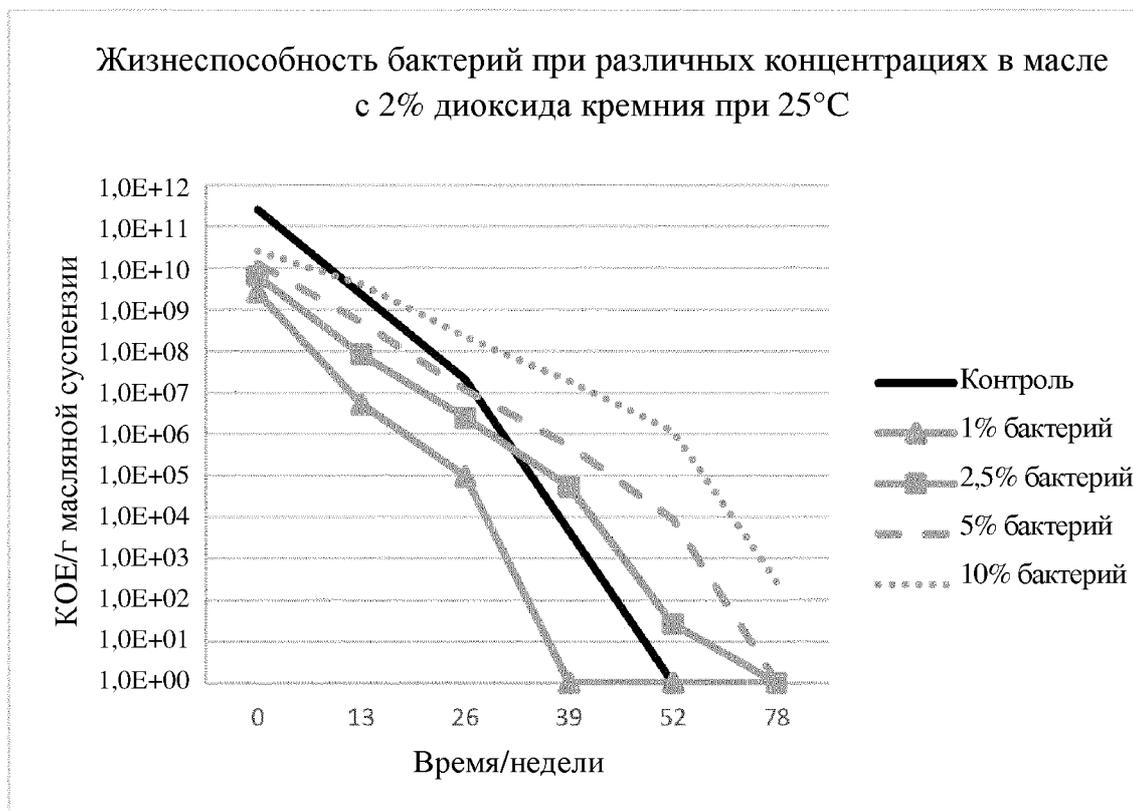
1. Распыляемый состав, содержащий порошкообразные частицы жизнеспособных неспорообразующих бактерий, суспендированные в нелетучем безводном жидком носителе, где по меньшей мере 90% порошкообразных частиц бактерий характеризуются размером частиц, составляющим менее 400 мкм, где распыляемый состав находится под давлением окружающей среды; и где указанный распыляемый состав находится в форме жидкого спрея.
2. Распыляемый состав по п. 1, где распыляемый состав не содержит газ-пропеллент, в частности углеводородный газ-пропеллент.
3. Распыляемый состав по п. 1 или п. 2, где распыляемый состав, представляющий собой распыляемый жидкий состав, диспергируется в капли при распылении.
4. Распыляемый состав по п. 1, где нелетучий безводный жидкий носитель имеет растительное происхождение, животное происхождение или минеральное происхождение, где предпочтительно нелетучий безводный жидкий носитель представляет собой масляный жидкий носитель, где более предпочтительно нелетучий безводный жидкий носитель содержит жирные кислоты, триглицериды, насыщенные или ненасыщенные жиры, производные стероидов или сложные масла, состоящие из фосфолипидов, сфинголипидов, гликолипидов или сульфолипидов.
5. Распыляемый состав по любому из пп. 1-4, где по меньшей мере 90% порошкообразных частиц бактерий характеризуются размером частиц, составляющим от 1 мкм до 250 мкм, предпочтительно от 2 мкм до 100 мкм, более предпочтительно от 5 до 50 мкм, наиболее предпочтительно от 5 мкм до 10 мкм.
6. Распыляемый состав по любому из пп. 1-5, где концентрация порошкообразных частиц бактерий в суспензии составляет 0,1-20 вес.%, предпочтительно 1-10 вес.%, наиболее предпочтительно 3-7 вес.% от общего веса распыляемого состава.
7. Распыляемый состав по любому из пп. 1-6, где состав дополнительно содержит средство против осаждения.
8. Распыляемый состав по п. 7, где средство против осаждения представляет собой диоксид кремния или его производные.

9. Распыляемый состав по п. 7 или п. 8, где концентрация средства против осаждения составляет 0,01-10 вес.%, предпочтительно 0,1-5 вес.%, более предпочтительно 0,5-3 вес.% и наиболее предпочтительно 1-2,5 вес.% от общего веса распыляемого состава.
10. Распыляемый состав по любому из пп. 1-9, где распыляемый состав содержит 50-99 вес.% нелетучего безводного жидкого носителя, предпочтительно 70-98 вес.%, более предпочтительно 85-97 вес.%, наиболее предпочтительно 90-95 вес.% от общего веса распыляемого состава.
11. Распыляемый состав по любому из пп. 1-10, где распыляемый состав дополнительно содержит реологическую добавку.
12. Распыляемый состав по любому из пп. 1-11, где распыляемый состав дополнительно содержит антиоксиданты и/или витамины, в частности, выбранные из витамина D3 и E.
13. Распыляемый состав по любому из пп. 1-12, где состав дополнительно содержит поверхностно-активные вещества, и/или эмульгаторы, и/или увлажняющие вещества.
14. Распыляемый состав по любому из пп. 1-13, где состав дополнительно содержит биоадгезивы и/или мукоадгезивы.
15. Распыляемый состав по любому из пп. 1-14, где состав дополнительно содержит подсластители и/или ароматизаторы.
16. Распыляемый состав по любому из пп. 1-15, где состав дополнительно содержит стабилизаторы состава, в частности, выбранные из группы, состоящей из эпикатехинов, хинонов, креатина, гидрокситирозола, пиридоксамина, цистеина, гомоцистеина, глутатиона или других веществ, улавливающих альфа-карбонилы.
17. Распыляемый состав по любому из пп. 1-16, где жизнеспособные и/или стабильные бактерии представляют собой пробиотические бактерии, в частности виды *Lactobacillus* или виды *Staphylococcus*.
18. Распыляемый состав по п. 17, где виды *Lactobacillus* представляют собой *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. rhamnosus* и/или *L. casei*.

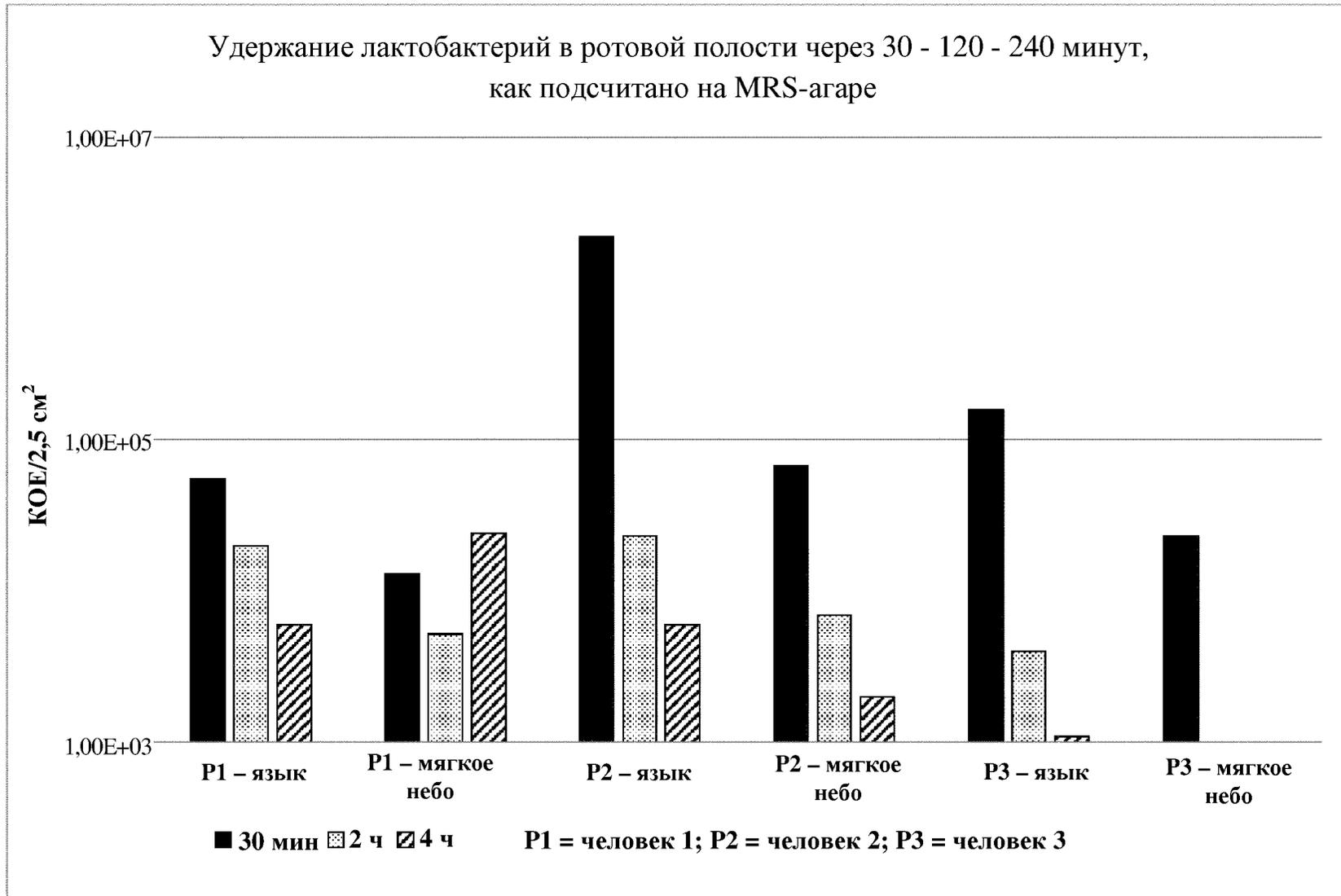
19. Распыляемый состав по любому из пп. 1-18, где распыляемый состав представляет собой ороназофарингеальный спрей.
20. Распыляемый состав по любому из пп. 1-18, где распыляемый состав представляет собой дерматологический спрей для местного применения.
21. Распыляемый состав по любому из пп. 1-19 для применения в медицине или ветеринарии.
22. Распыляемый состав по любому из пп. 1-21 для применения в предупреждении и/или лечении вирусных, бактериальных и/или грибковых респираторных заболеваний.
23. Распыляемый состав по любому из пп. 1-21 для применения в предупреждении и/или лечении коронавирусных заболеваний.
24. Способ получения распыляемого состава по любому из пп. 1-23, включающий стадию суспендирования порошкообразных частиц бактерий в безводном носителе.
25. Способ усиления естественной защитной функции микробиома ротоносоглотки, включающий стадию нанесения распыляемого состава по любому из пп. 1-23.
26. Способ предупреждения и/или лечения вирусных, бактериальных и/или грибковых респираторных заболеваний, включающий стадию нанесения распыляемого состава по любому из пп. 1-23.
27. Способ предупреждения и/или лечения коронавирусных заболеваний, включающий стадию нанесения распыляемого состава по любому из пп. 1-23.
28. Применение распыляемого состава по любому из пп. 1-23 для местного дерматологического нанесения.
29. Применение распыляемого состава по любому из пп. 1-23 для очистки поверхностей.



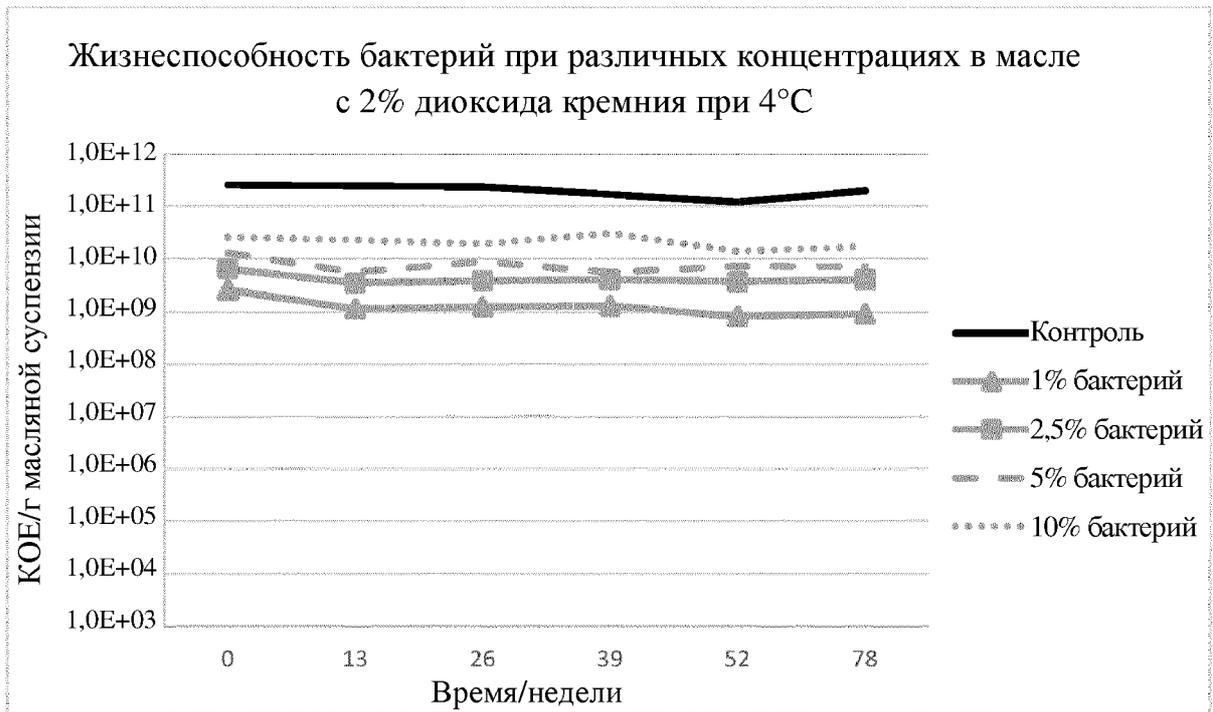
Фиг. 1



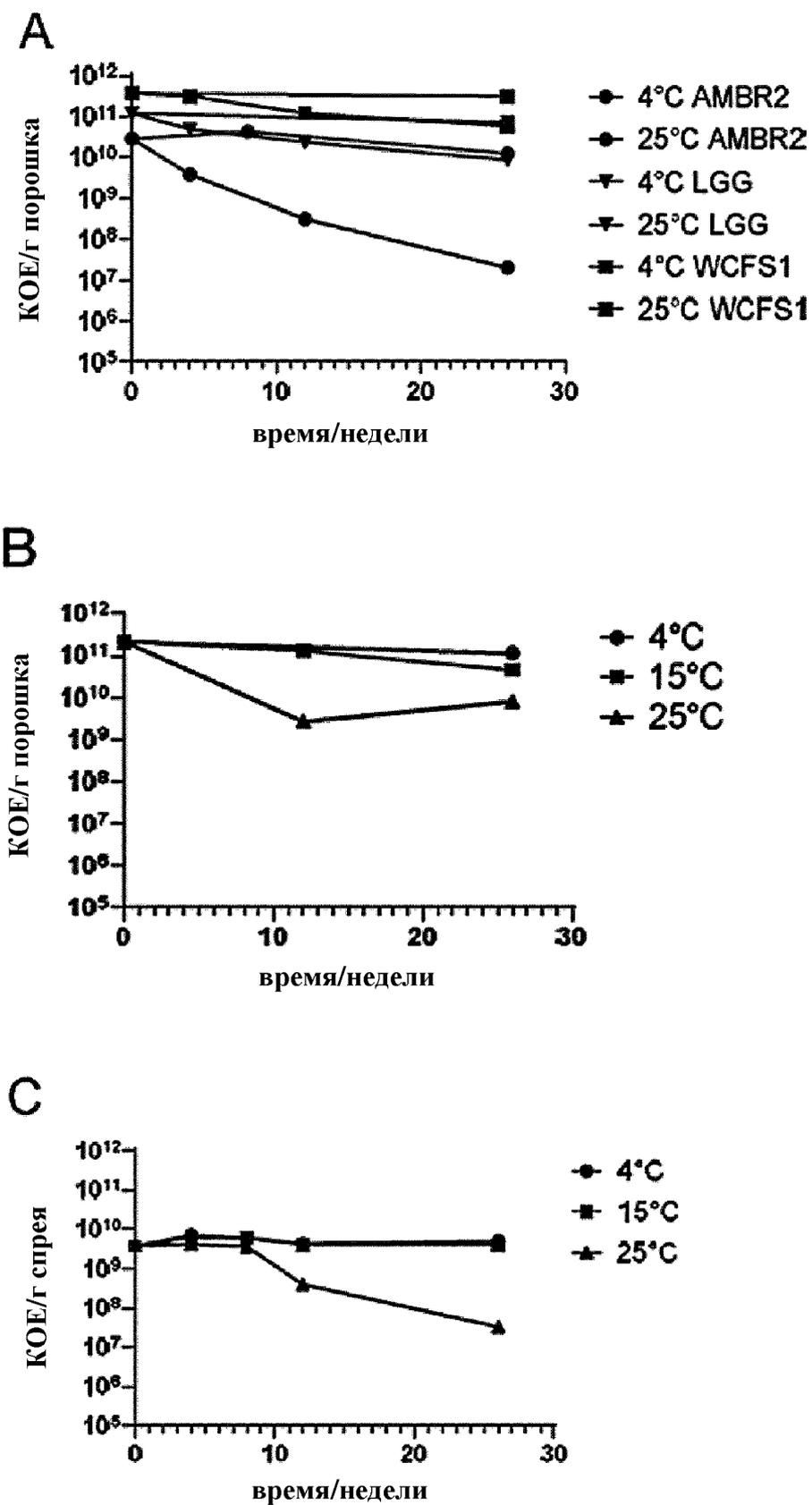
Фиг. 2



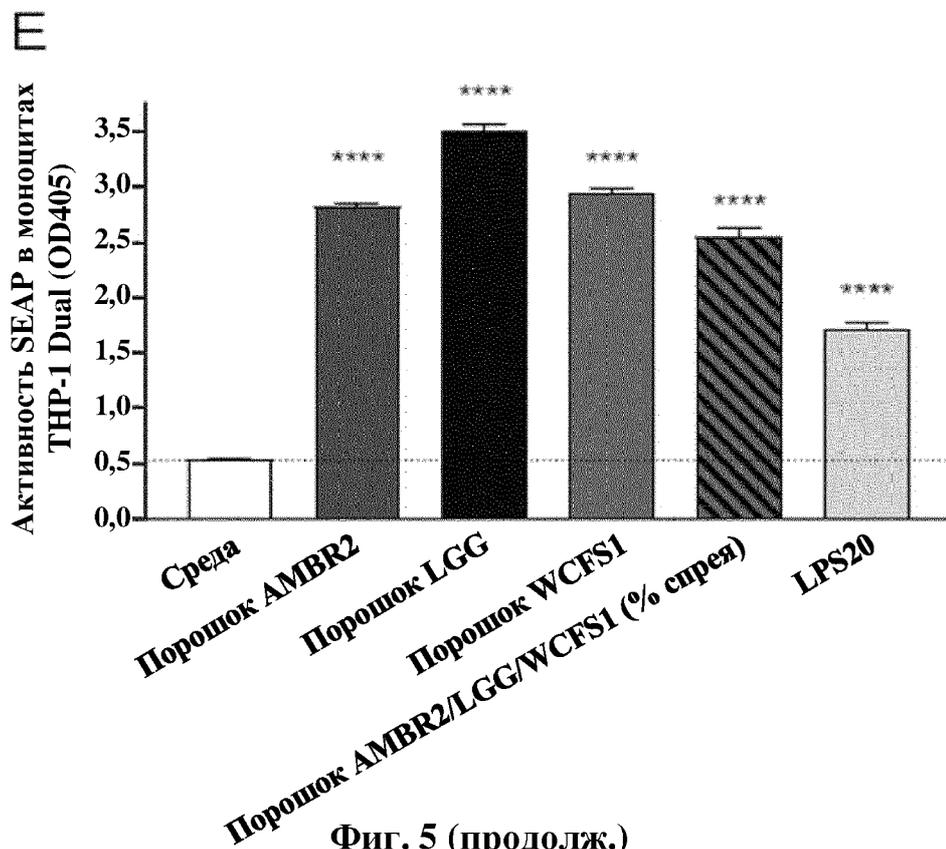
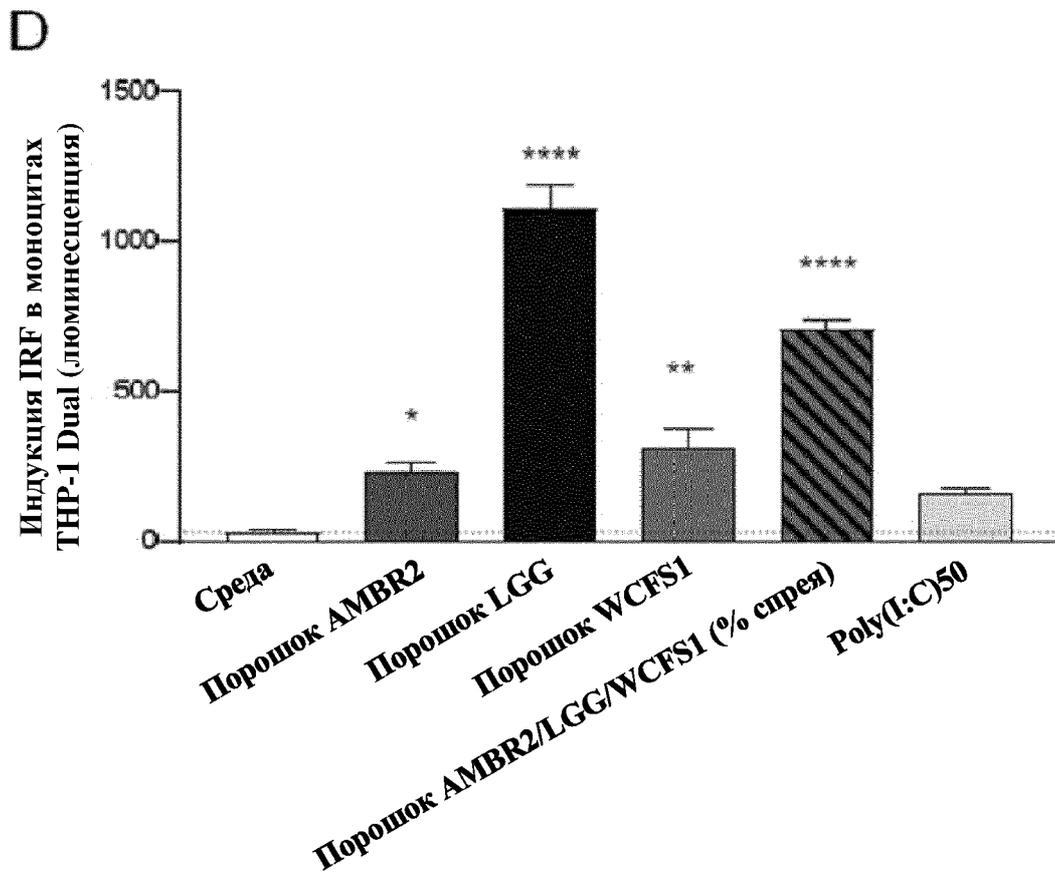
Фиг. 3



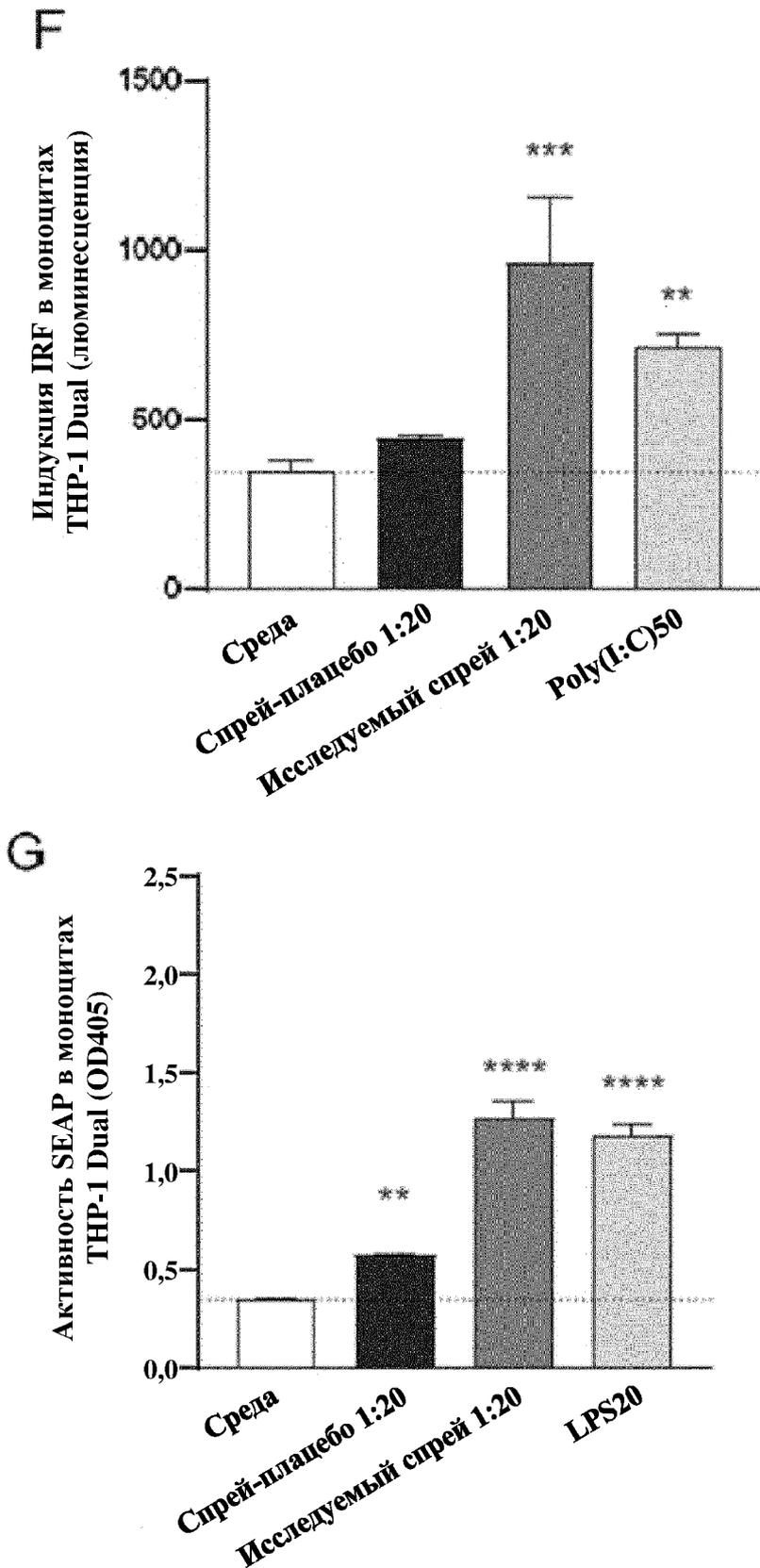
Фиг. 4



Фиг. 5

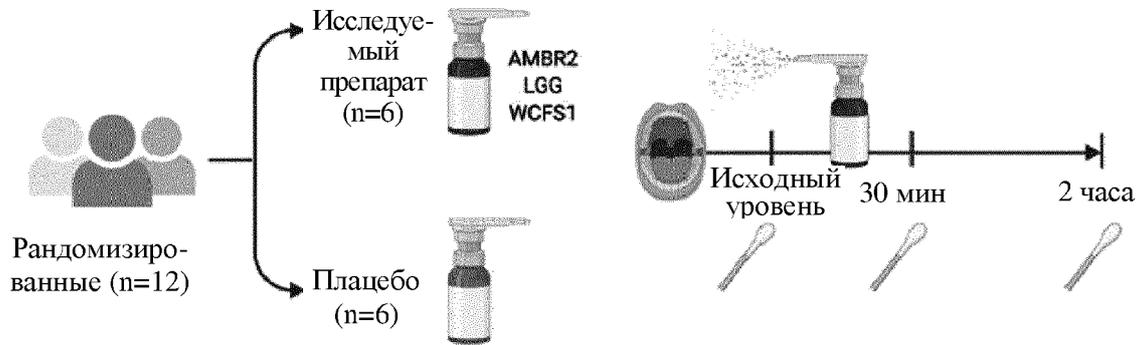


Фиг. 5 (продолж.)

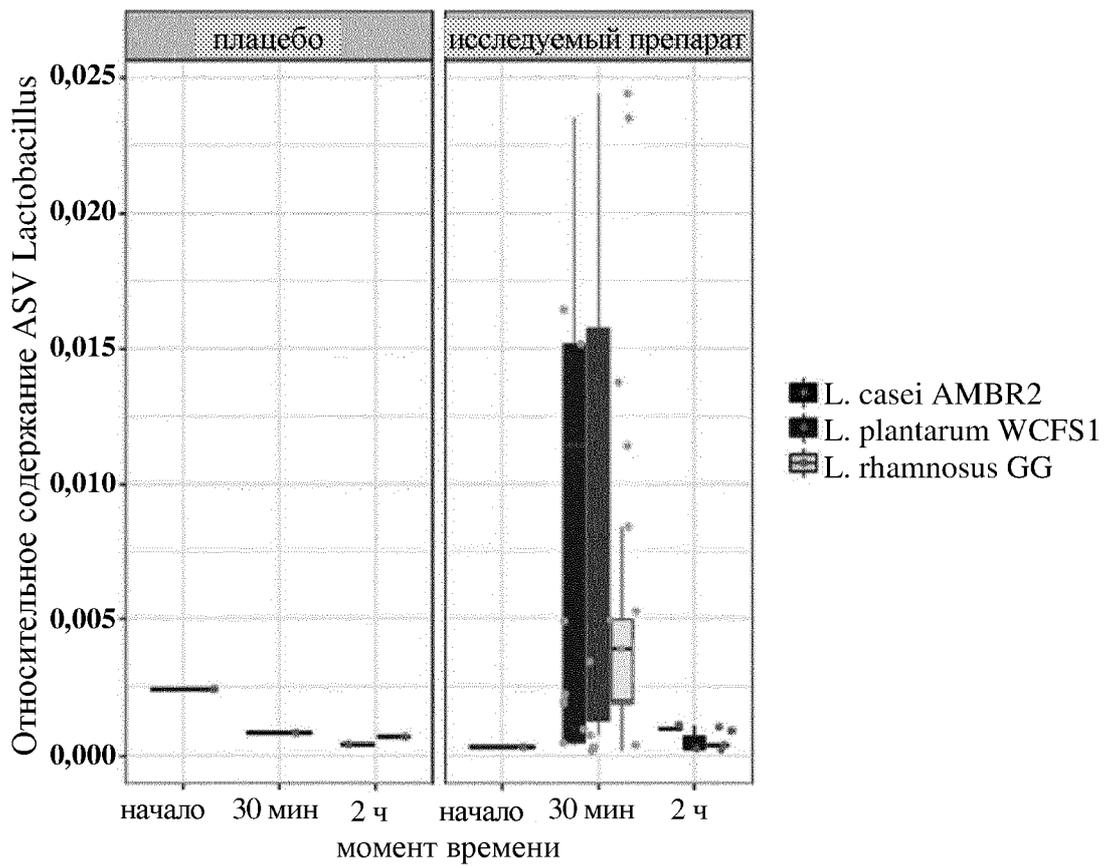


Фиг. 5 (продолж.)

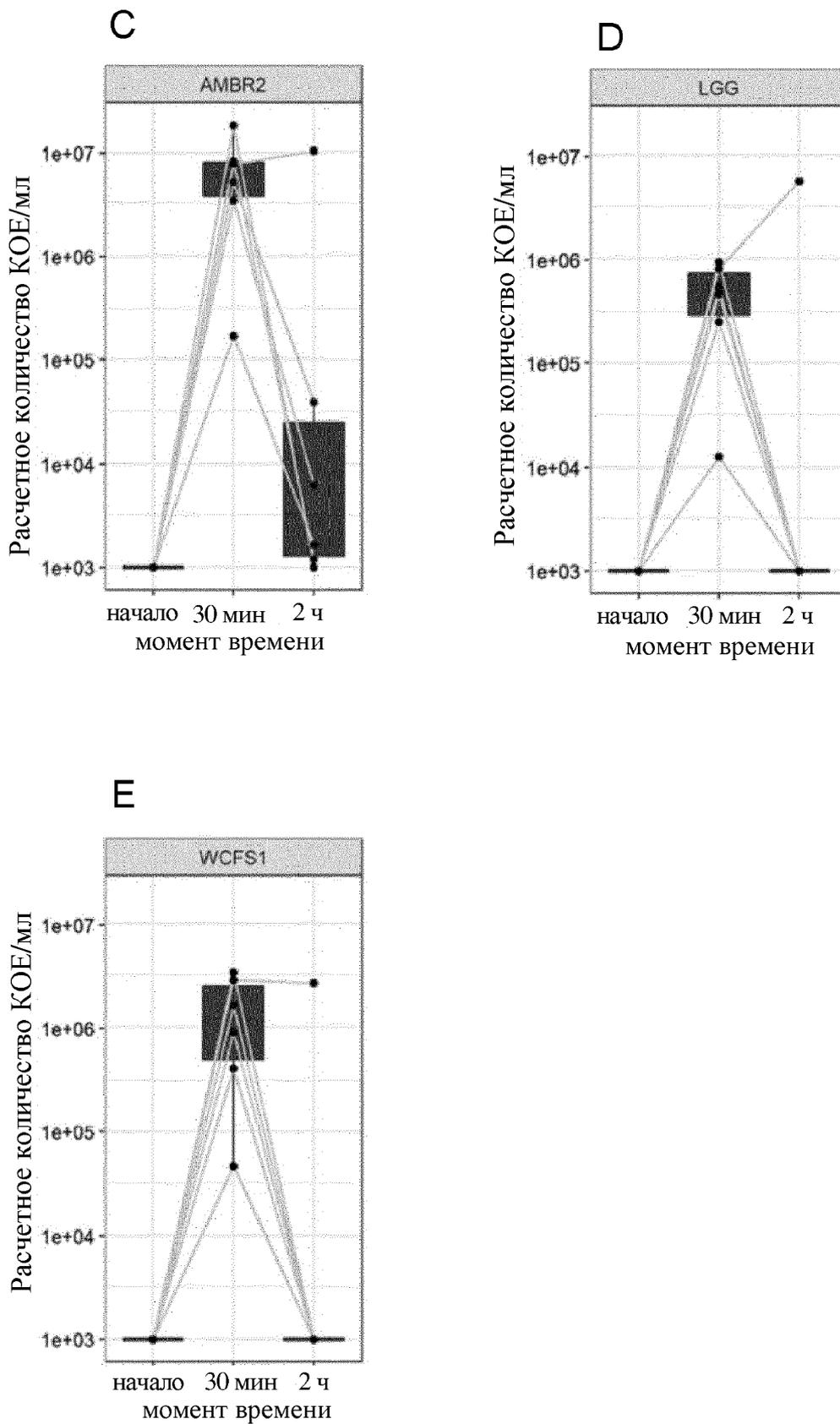
A



B



Фиг. 6



Фиг. 6 (продолж.)