

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202193284 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.22(22) Дата подачи заявки
2021.03.09(51) Int. Cl. A61K 31/57 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

(54) ПРОГЕСТОГЕН ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ СИНДРОМА ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЦИТОКИНОВ

(31) 202011497541.1

(32) 2020.12.17

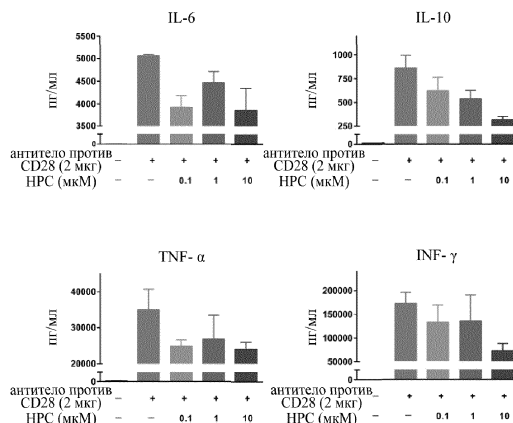
(33) CN

(86) PCT/CN2021/079775

(87) WO 2022/126869 2022.06.23

(71) Заявитель:
ШЭНЬЧЖЭНЬ ЭВЕРГРИН
ТЕРАПЬЮТИКС КО., ЛТД. (CN)(72) Изобретатель:
Ху Тао, Ду Тао Том, Ду Синь (CN)(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(57) Раскрыто применение гидроксипрогестерона капроата в изготовлении лекарственного средства для ингибирования цитокинового шторма, в частности высвобождения цитокинов из PBMC, индуцируемого антителом против CD28 и/или антителом против CD3. Результаты показывают, что гидроксипрогестерона капроат мог бы ингибировать высвобождение разных цитокинов из PBMC, индуцируемое антителом против CD28 и/или антителом против CD3 зависимым от концентрации образом, и мог бы представлять собой возможное лекарственное средство для лечения цитокинового шторма.



202193284

A1

A1

202193284

ПРОГЕСТОГЕН ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ СИНДРОМА ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЦИТОКИНОВ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области лечения заболеваний иммунной системы и инфекционных заболеваний, и, в частности, согласно настоящему изобретению предложено применение гидроксипрогестерона капроата в изготовлении лекарственного средства для ингибирования цитокинового шторма, а именно высвобождения цитокинов из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC - от англ. peripheral blood mononuclear cell).

Предшествующий уровень техники

Синдром высвобождения цитокинов (CRS – от англ. cytokine release syndrome) представляет собой группу клинических синдромов, включающую активацию и растворение лимфоцитов, и высвобождение большого количества цитокинов, запускаемое инфекциями или терапиями с использованием моноклональных антител или цитокинов. Данное явление было впервые открыто в начале 1990-х годов, когда моноклональное антитело Муромонаб-CD3 (ОКТ3) использовали против отторжения трансплантатов. В марте 2006 года в Соединенном Королевстве Великобритании и Северной Ирландии на фазе I клинического испытания моноклонального антитела TGN1412 шесть здоровых человек в экспериментальной группе испытывали полиорганную недостаточность, из которых у двух человек развивалась глубокая кома, которая, как было позднее подтверждено, была связана с индукцией CRS. Данный случай заставил научное сообщество и агентства по регулированию лекарственных средств повторно проводить доклиническое исследование, главным образом CRS, моноклональных антител и предлагать соответствующие руководства по клиническим исследованиям. Ранние клинические проявления CRS легко путают с инфузионными реакциями. Типичные симптомы обычно являются слабо выраженными - умеренными, и общие симптомы включают лихорадку, слабость, боль в мышцах и боль в суставах. Симптомы могут относиться к коже, дыханию, сосудам, желудочно-кишечному тракту, свертыванию и нервным системам и т.д., как например, кожная сыпь, затруднение дыхания, тахикардия, гипотензия, рвота, диарея, кровотечение, умственные расстройства, судороги или спазмы. Некоторые симптомы обусловлены освобождением иммунных комплексов антиген-антитело ретикулоэндотелиальной системой в легких, печени и селезенке. У некоторых пациентов могут возникать серьезные реакции и даже

внезапная смерть. CRS представляет собой одну из основных причин смерти у пациентов с трансплантацией органов, пневмонией, вызываемой новой коронавирусной инфекцией, лечением CAR-T (от англ. chimeric antigen receptor T-cell - Т-клетка с химерным антигенным рецептором) и высокомолекулярными лекарственными средствами. Сообщают, что вплоть до 93% пациентов, проходящих лечение CAR-T, и 20% пациентов с пневмонией, вызванной новой коронавирусной инфекцией, будут иметь варьирующие степени CRS.

Механизм начала CRS еще полностью неясен. Обычно полагают, что CRS вызван активацией специфичных клеток воспаления, главным образом моноцитов, макрофагов, Т-клеток и В-клеток. Известные в настоящее время возможные механизмы CRS включают следующее: 1) связывание растворимых антител с соответствующими антигенами на поверхности клеток посредством антиген-специфичных детерминант антител активирует эффекторные клетки с высвобождением большого количества цитокинов; 2) Fc-фрагменты антител связываются с Fc-рецепторами клеток, не являющихся эффекторными, с получением похожего эффекта «свидетеля», который активирует соответствующие связывающие клетки с высвобождением цитокинов; 3) мышиные фрагменты моноклональных антител продуцируют «антитело против антитела», которое активирует иммунные ответы и высвобождает цитокины. Существующие клинические наблюдения показали, что возникновение CRS у пациентов имеет явно выраженную связь с повышенными уровнями по меньшей мере семи цитокинов в сыворотке. Данные семь цитокинов включают: интерлейкин-5 (IL – от англ. interleukin), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-10 (IL-10), интерферон- γ (IFN- γ - от англ. interferon- γ), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF - от англ. granulocyte-macrophage colony stimulating factor), фрактальный хемокин (фракталкин) и лиганд человеческой FMS-связанной тирозинкиназы 3 (Flt-3L). Кроме того, поскольку человеческая иммунная система представляет собой очень сложную систему, существуют перекрестные реакции и активации разных механизмов. На возникновение CRS может оказывать влияние аффинность антител, эпитоп антител, характеристики антигенов, связывание Fc-фрагментов антител с Fc-рецепторами и даже активация последовательности передачи сигнала во внутриклеточной части трансмембранного белка, таким образом, CRS может иметь разные клинические проявления.

Современное клиническое лечение CRS главным образом основано на симптоматическом лечении. Общие показатели лечения включают следующее: 1) поддержание жизнедеятельности: поддержание температуры тела и питания через

кишечник и наружного питания и энергообеспечения; 2) поддержка дыхания: включая общую кислородную терапию, механическую вентиляцию и подачу поверхностно-активных веществ; 3) поддержка кровообращения: осуществление регуляции входных и выходных характеристик для поддержания кислотно-щелочного равновесия вода-электролит, с использованием соответствующим образом коллоидов, кристаллов, вазоактивных лекарственных средств и гепарина для распространения внутрисосудистого свертывания; 4) профилактическое применение кортикостероидов, ацетаминофена и антигистаминов, таких как дифенгидрамин и т.д., или их повторное применение при поражении заболеванием; 5) другое, включая гемофильтрацию и постоянную заместительную почечную терапию и т.д. До сих пор, все еще существует нехватка клинически безопасных и эффективных лекарственных средств, направленных на патогенез CRS. Например, лечение CRS, вызванного CAR-T, Тоцилизумабом, который является антагонистом рецептора IL-6, могло увеличивать частоту встречаемости и тяжесть нейротоксичности. Когда Тоцилизумаб не является эффективным в отношении CAR-T-пациентов, для лечения приходится использовать глюкокортикоиды с побочными эффектами. Ввиду вышесказанного, в данной области все еще существует большая потребность в лекарственных средствах, направленных на патогенез CRS.

В настоящее время, модель мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) является наиболее чувствительной моделью CRS, которая может быть установлена посредством стимулирования PBMC *in vitro* специфичными антителами. Человеческие PBMC состоят из лимфоцитов, включая Т-клетки, В-клетки и NK-клетки, а также моноцитов и небольшого количества дендритных клеток. Лимфоциты составляют примерно 70-90% PBMC, и CD3+ Т-клетки составляют самый большой процент, примерно 45-70%. Известно, что лимфоциты активируются и растворяются после стимуляции организма и высвобождают большое количество цитокинов, которое представляет собой главный патогенез CRS. Таким образом, в настоящем исследовании модель стимуляции человеческих PBMC используют для скрининга возможных лекарственных средств, которые ингибируют высвобождение цитокинов.

Краткое изложение сущности изобретения

Для подавления цитокиновых штормов и лечения родственных заболеваний, а также для *in vitro* научного исследования, осуществляют скрининг большого числа лекарственных средств-кандидатов, где гидроксипрогестерона капроат на стадии разработки является возможным лекарственным средством-кандидатом с высокой эффективностью и слабо выраженными побочными эффектами. Результаты

тестирования показывают, что гидроксипрогестерона капроат мог бы ингибировать высвобождение цитокинов из PBMC, вызываемое разными антителами или стимулирующими веществами зависимым от концентрации образом, таким образом, он является возможным лекарственным средством или агентом для лечения цитокинового шторма или ингибирования высвобождения цитокинов.

В первом аспекте в данном документе раскрыто применение прогестогена в изготовлении лекарственного средства для лечения синдрома цитокинового шторма.

Во втором аспекте в данном документе раскрыт способ ингибирования цитокинового шторма у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту прогестогена.

В третьем аспекте в данном документе раскрыта фармацевтическая композиция для ингибирования синдрома цитокинового шторма, содержащая прогестоген.

В некоторых воплощениях прогестоген представляет собой гидроксипрогестерона капроат, медроксипрогестерона ацетат и/или прогестерон, предпочтительно гидроксипрогестерона капроат.

В некоторых воплощениях цитокиновый шторм в способе представляет собой высвобождение цитокинов из PBMC. Высвобождение цитокинов может происходить *in vivo* или *in vitro*.

В некоторых воплощениях цитокин, высвобождаемый из PBMC, включает один или более, выбранных из IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α (от англ. tumor necrosis factor alfa - фактор некроза опухоли альфа) и IFN- γ .

В некоторых воплощениях синдром высвобождения цитокинов запускается инфекцией, терапией на основе антител, трансплантацией органов или терапией Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR-T); предпочтительно синдром высвобождения цитокинов запускается терапией на основе антител, трансплантацией органов или CAR-T-терапией.

В некоторых воплощениях терапия на основе антител включает применение антитела против CD28 и/или антитела против CD3; или CAR-T-терапия включает применение CAR, выбранных из антитела против CD28 и/или антитела против CD3 или его активного фрагмента.

В некоторых воплощениях антитело против CD28 представляет собой ANC28.1/5D10, и антитело против CD3 представляет собой OKT3.

В том виде, в котором он используется в данном документе, термин «антитело» включает разные антитела в отношении определенного антигена в предшествующем уровне техники, включая моноклональные антитела,

поликлональные антитела, одноцепочечные антитела, нанотела и т.д., но, не ограничиваясь ими, и активные части или фрагменты данных антител могут быть при необходимости отделены специалистами в данной области.

В том виде, в котором он используется в данном документе, термин «гидроксипрогестерона капроат» также известен, как 17- α гидроксипрогестерона капроат, 17-НРС или 17-гидроксипрогестерона капроат, и имеет номер CAS: 630-56-8. Термин «гидроксипрогестерона капроат» сокращен как НРС в разделе Воплощения и Графические материалы.

В некоторых воплощениях лекарственное средство в данной заявке может находиться в любой клинически приемлемой дозированной лекарственной форме и может быть введен в любой клинически приемлемой дозированной лекарственной форме в терапии. Конкретные дозированные лекарственные формы включают таблетки, капсулы, пероральные жидкости, инъекции, порошки для приготовления инъекций и тому подобное, но, не ограничиваются ими.

В некоторых воплощениях лекарственное средство, полученное посредством настоящей заявки, может также содержать другие известные и неизвестные лекарственные средства для лечения родственных заболеваний. Способ терапии по настоящей заявке может также включать применение других известных и неизвестных лекарственных средств для лечения родственных заболеваний. Данные лекарственные средства включают лекарственные средства для лечения аутоиммунных заболеваний, такие как иммунодепрессанты, агонисты рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами, агонисты сфингозин-1-фосфатных рецепторов, ингибиторы циклооксигеназы, антиоксиданты, терапия на основе ингибиторов фактора некроза опухоли, внутривенного иммуноглобулина и другие терапии; лекарственные средства для лечения инфекций, такие как антибиотики, противогрибковые средства, ингибиторы репликации вируса, ингибиторы инвазии вируса, и лекарственные средства, известные и неизвестные, для лечения симптомов, таких как лихорадка, рвота и проблемы кожи при родственных заболеваниях, но не ограничиваются ими.

В некоторых воплощениях в соответствии с полученными/вводимыми дозированными лекарственными формами, в лекарственном средстве могут быть использованы разные фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, включая вещества покрытия, растворители, солюбилизаторы, связующие вещества, стабилизаторы, антиоксиданты, регуляторы pH и корригенты, но, не ограничиваясь ими. Специалисты в данной области могут осуществлять выбор среди данных вспомогательных веществ в соответствии с общим знанием в фармации.

Краткое описание графических материалов

На Фиг. 1 показано ингибирование под действием НРС высвобождения IL-6, IL-10, TNF- α и IFN- γ в мононуклеарных клетках периферической крови человека, запускаемого антителом против CD28 (средние значения $\pm$ стандартное отклонение, n=3);

На Фиг. 2 показано ингибирование под действием НРС высвобождения IL-6, IL-10 и IFN- γ в мононуклеарных клетках периферической крови человека, запускаемого ОКТ3 (средние значения $\pm$ стандартное отклонение, n=3);

На Фиг. 3 показано ингибирование под действием НРС высвобождения IL-2, IL-6, IL-10 и TNF- α в мононуклеарных клетках периферической крови человека, запускаемого PHA (средние значения $\pm$ стандартное отклонение, n=3).

Подробное описание

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC), используемые в следующих экспериментах, получены из Eurofins Discovery (St Charles, MO, США) и представляют собой смесь PBMC от трех здоровых субъектов - людей (Lot# 98, 99, 101).

Пример 1. Ингибирование высвобождения цитокинов в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC) под действием гидроксипрогестерона капроата (НРС)

1) Протокол анализа ингибирования Т-клеточного воспаления с использованием суперагонистов - антител против CD28

Первые сутки

Планшеты с высокой степенью связывания, меченные ферментом, покрывают суперагонистами – антителами против CD28 (клон ANC28.1/5D10, 2 мкг/лунка), растворенными в PBS 1 $\times$ (от англ. phosphate buffered saline - фосфатно-солевой буферный раствор), и инкубировали в течение ночи в боксе биологической безопасности с открытой крышкой и иммобилизовали посредством сушки на воздухе. Кριοконсервированные PBMC полностью размораживают, объединяют и разводят до соответствующей плотности и затем инокулируют в 96-луночный планшет из полипропилена с U-образным дном (1,2 $\times$ 10⁵ клеток на лунку) с 228 мкл/лунка культуральной среды (RPMI 1640, содержащая 10%-ную инактивированную нагреванием фетальную телячью сыворотку, 1%-ный пенициллин/стрептомицин, 2 мМ L-глутамин). Клетки инкубируют в условиях 5% CO₂ при 37°C в течение 1 часа перед добавлением НРС. НРС растворяют в 50%-ном

этаноле и PBS, и дополнительно разбавляют до 20× средой для культивирования клеток. Затем, НРС добавляют к PBMC в объемах 12 мкл (1×) в техкратной повторности и инкубируют в условиях 5% CO₂ при 37°C в течение 16 часов.

Вторые сутки

Спустя 16 часов инкубации, 200 мкл клеток (1×10^5), обработанных НРС или контрольным реагентом, переносят в меченные ферментом планшеты, покрытые антителом против CD28, и инкубируют в условиях 5% CO₂ при 37°C в течение 48 часов. Для групп отрицательного контроля 200 мкл клеток (1×10^5) переносят в планшет, меченный ферментом, покрытый антителом против CD28 или изотипом IgG1. Спустя 48 часов инкубации, планшеты, меченные ферментом, центрифугируют при 200×g в течение 10 минут. Супернатанты клеточных культур собирают и хранят при -80°C до использования в анализе.

2) Протокол анализа ингибирования Т-клеточного воспаления с использованием антитела против CD3 (ОКТ3) или РНА

Первые сутки

Криоконсервированные PBMC полностью размораживают, объединяют и разводят до соответствующей плотности и затем инокулируют в 96-луночный планшет из полипропилена (2×10^5 клеток на лунку) с 150 мкл/лунка культуральной среды (RPMI 1640, содержащая 10%-ную инактивированную нагреванием фетальную телячью сыворотку, 1%-ный пенициллин/стрептомицин, 2 мМ L-глутамин). Клетки инкубируют в условиях 5% CO₂ при 37°C в течение 1 часа перед добавлением НРС. НРС растворяют в 50%-ном этаноле и PBS, и дополнительно разбавляют до 20× средой для культивирования клеток. Затем, НРС добавляют к PBMC в объемах 10 мкл (1×) в техкратной повторности и инкубируют в условиях 5% CO₂ при 37°C в течение 16 часов.

Вторые сутки

После инкубации в течение 16 часов, 40 мкл антитела против CD3 (ОКТ3, 3 мкг/лунка или 15 мкг/мл) или РНА (10 мкг/мл) добавляют в лунки в соответствии со схемой планшета. Клетки инкубируют в условиях 5% CO₂ при 37°C в течение 48 часов. Затем, планшеты центрифугируют при 200×g в течение 10 минут. Супернатанты клеточных культур собирают и хранят при -80°C до использования в анализе.

Измеряемые цитокины

Уровень цитокинов каждого образца определяют с использованием методологии Lumiplex и проводят в соответствии с протоколом изготовителя. Уровни

цитокинов в супернатантах клеточных культур определяют в соответствии с протоколом изготовителя, используя панель магнитных шариков для определения человеческих цитокинов/хемокинов от Millipore Sigma (кат. № HCYTOMAG-60K) с диапазоном стандартов 3,2, 16, 80, 400, 2000, 10000 пг/мл.

Измеряют следующие цитокины: IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-10 и TNF- α .

Результаты экспериментов

1. Антитело против CD28 успешно стимулирует высвобождение конкретных цитокинов из мононуклеарных клеток периферической крови человека, но высвобождение IL-6, IL-10, TNF- α и IFN- γ значимо ингибируется HPC, и ингибирующее действие на высвобождение IL-10 и IFN- γ зависит от концентрации.

2. ОКТ3 успешно стимулирует высвобождение конкретных цитокинов из мононуклеарных клеток периферической крови человека, но высвобождение IL-6, IL-10 и IFN- γ значимо ингибируется HPC, и ингибирующее действие на высвобождение IL-6 и IL-10 зависит от концентрации.

3. PHA успешно стимулирует высвобождение конкретных цитокинов из мононуклеарных клеток периферической крови человека, но высвобождение IL-2, IL-6, IL-10 и TNF- α значимо ингибируется HPC зависимым от концентрации образом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение прогестогена в изготовлении лекарственного средства для лечения синдрома высвобождения цитокинов.

2. Применение по п. 1, где прогестоген представляет собой гидроксипрогестерона капроат, медроксипрогестерона ацетат и/или прогестерон, предпочтительно гидроксипрогестерона капроат.

3. Применение по п. 1 или п. 2, где синдром высвобождения цитокинов запускается инфекцией, терапией на основе антител, трансплантацией органов или терапией Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR-T); и предпочтительно, синдром высвобождения цитокинов запускается терапией на основе антител, трансплантацией органов или CAR-T-терапией.

4. Применение по п. 3, где терапия на основе антител включает применение антитела против CD28 и/или антитела против CD3; или где CAR-T-терапия включает применение CAR, выбранного из антитела против CD28 и/или антитела против CD3 или его активного фрагмента.

5. Применение по п. 4, где антитело против CD28 представляет собой ANC28.1/5D10, и антитело против CD3 представляет собой ОКТ3.

6. Применение по любому из п.п. 1-5, где цитокин высвобождается из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

7. Применение по п. 6, где цитокин, высвобождаемый из PBMC, включает один или более, выбранных из IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α и IFN- γ .

8. Способ ингибирования высвобождения цитокинов у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту прогестогена.

9. Способ по п. 8, в котором прогестоген представляет собой гидроксипрогестерона капроат, медроксипрогестерона ацетат и/или прогестерон, предпочтительно гидроксипрогестерона капроат.

10. Способ по п. 8 или п. 9, в котором синдром высвобождения цитокинов запускается инфекцией, терапией на основе антител, трансплантацией органов или терапией Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR-T); и предпочтительно, синдром высвобождения цитокинов запускается терапией на основе антител, трансплантацией органов или CAR-T-терапией.

11. Способ по п. 10, в котором терапия на основе антител включает применение антитела против CD28 и/или антитела против CD3; или в котором CAR-T-терапия включает применение CAR, выбранного из антитела против CD28 и/или антитела против CD3 или его активного фрагмента.

12. Способ по п. 11, в котором антитело против CD28 представляет собой ANC28.1/5D10, и антитело против CD3 представляет собой OKT3.

13. Способ по любому из п.п. 8-11, в котором цитокин высвобождается из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

14. Способ по п. 13, в котором цитокин, высвобождаемый из PBMC, включает один или более, выбранных из IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α и IFN- γ .

15. Способ по п. 13 или п. 14, в котором высвобождение цитокинов запускается антителом против CD28 и/или антителом против CD3 или его активным фрагментом.

16. Фармацевтическая композиция для ингибирования синдрома высвобождения цитокинов, содержащая прогестоген.

17. Фармацевтическая композиция по п. 16, в которой прогестоген представляет собой гироксипрогестерона капроат.

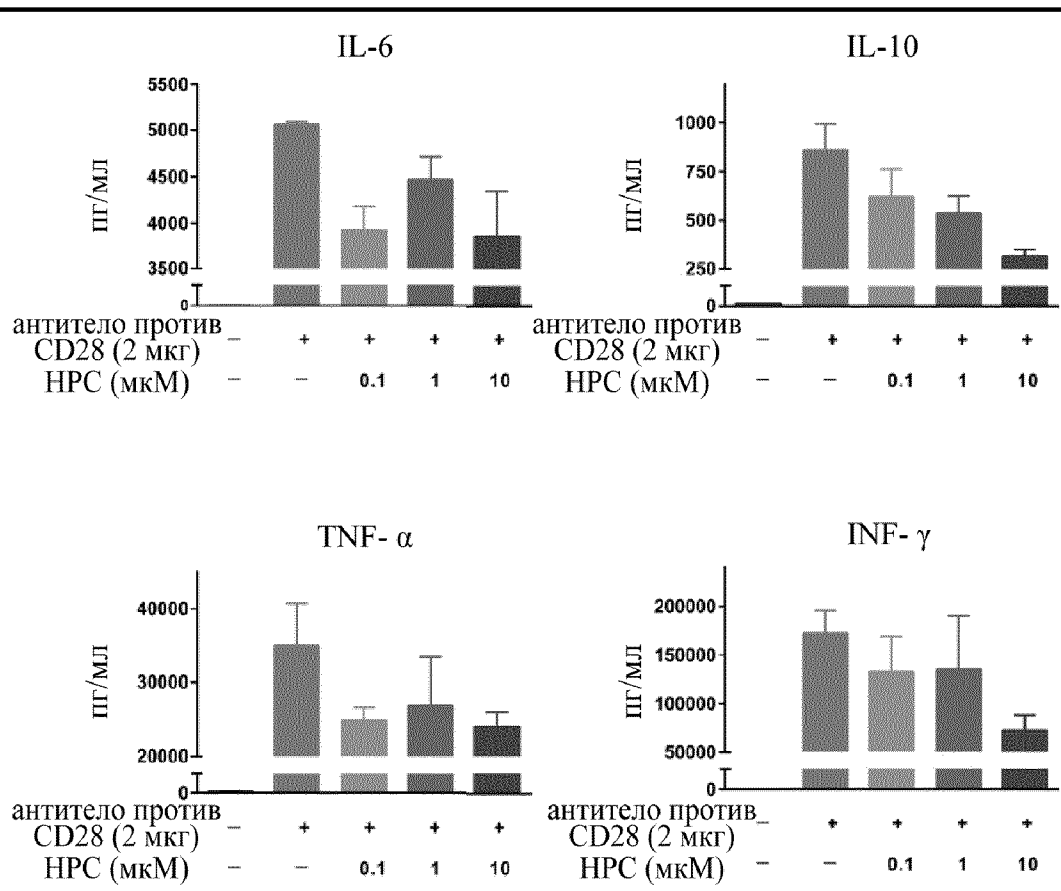
18. Фармацевтическая композиция по п. 16 или п. 17, где синдром высвобождения цитокинов запускается инфекцией, терапией на основе антител, трансплантацией органов или терапией Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR-T); и предпочтительно, синдром высвобождения цитокинов запускается терапией на основе антител, трансплантацией органов или CAR-T-терапией.

19. Фармацевтическая композиция по п. 18, где терапия на основе антител включает применение антитела против CD28 и/или антитела против CD3; или где CAR-T-терапия включает применение CAR, выбранного из антитела против CD28 и/или антитела против CD3 или его активного фрагмента.

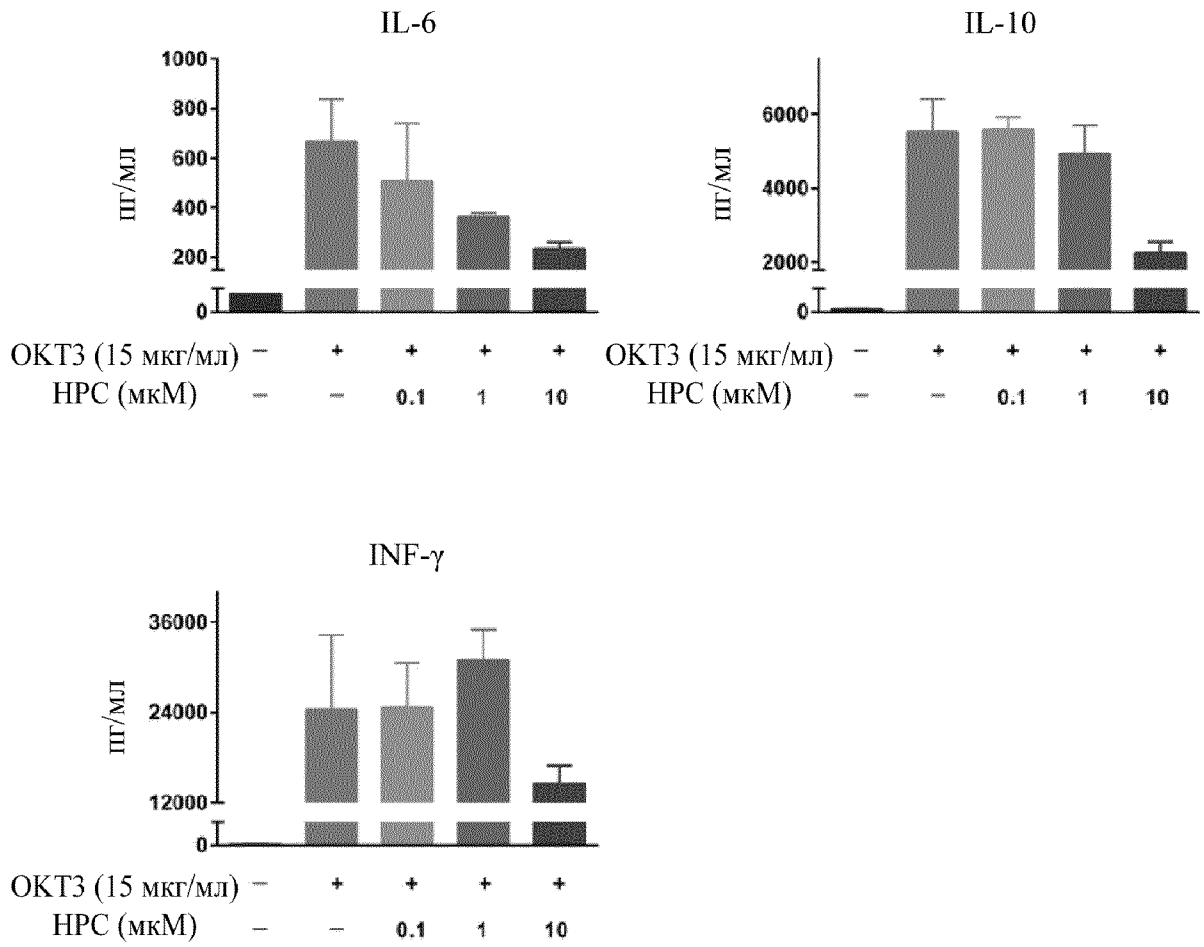
20. Фармацевтическая композиция по п. 19, где антитело против CD28 представляет собой ANC28.1/5D10, и антитело против CD3 представляет собой ОКТ3.

21. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 16-20, где цитокин высвобождается из моноклеарных клеток периферической крови (PBMC).

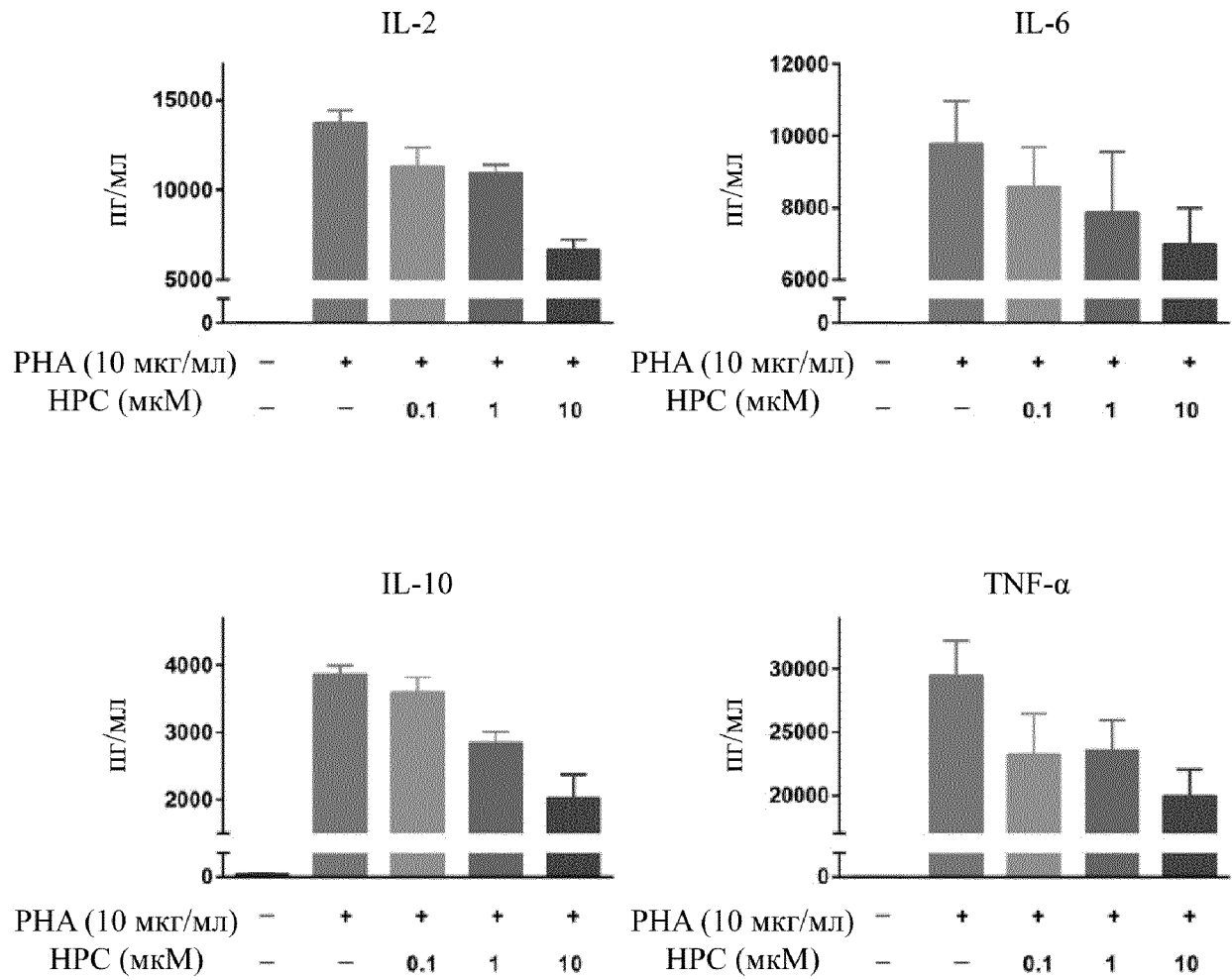
22. Фармацевтическая композиция по п. 21, где цитокин, высвобождаемый из PBMC, включает один или более, выбранных из IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α и IFN- γ .



ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3