

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192680 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.28

(22) Дата подачи заявки
2021.10.12

(51) Int. Cl. A61K 35/30 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ КОРТЕКСИНА ПРИ ЦИТОКИНОВОМ ШТОРМЕ

(96) 2021000109 (RU) 2021.10.12

(71) Заявитель:
ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ТЕРОФАРМ" (RU)

(72) Изобретатель:

Драй Роман Васильевич, Макаренко
Игорь Евгеньевич, Калатанова Анна
Вячеславовна, Магрук Максим
Андреевич (RU)

(57) Изобретение относится к области медицины и фармации, в частности к применению известного лекарственного препарата Кортесин® при цитокиновом шторме в качестве ингибитора фактора некроза опухоли-альфа и интерлейкина-6. В *in vitro* исследовании на модели цитокинового шторма на клеточной линии макрофагов мыши RAW 264.7 показано, что исследуемый препарат Кортесин® проявил тенденцию к дозозависимости терапевтического эффекта в отношении уровня TNFα в культуральной среде. В *in vivo* эксперименте на модели септического шока у самцов мышей показано, что эффективность препарата Кортесин® в дозах 1,7 и 17 мг/кг превосходит эффективность препарата сравнения левилимаб (блокатора рецепторов IL-6).

A1

202192680

202192680

A1

ПРИМЕНЕНИЕ КОРТЕКСИНА ПРИ ЦИТОКИНОВОМ ШТОРМЕ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области медицины и фармации, в частности к применению известного лекарственного средства Кортексин[®], представляющего собой комплекс низкомолекулярных водорастворимых полипептидных фракций, выделенных из коры головного мозга скота, в терапии «цитокинового шторма» различного патогенеза, в частности в качестве ингибитора фактора некроза опухоли-альфа и интерлейкина-6.

Уровень техники

Цитокины представляют собой низкомолекулярные белки, которые вырабатываются преимущественно эффекторными клетками крови и являются универсальными регуляторами, контролирующими важнейшие процессы клеточного гомеостаза. К цитокинам относятся интерфероны, интерлейкины, ростовые и колониестимулирующие факторы, хемокины, медиаторы из группы фактора некроза опухолей, трансформирующие ростовые факторы и некоторые другие молекулы [1]

Уровень цитокинов в периферической крови может быть повышен при многих заболеваниях. Однако в ряде случаев может наблюдаться патологический сдвиг в работе иммунной системы, характеризующийся неконтролируемым высвобождением большого количества цитокинов, приводящих к гиперактивации иммунных клеток (Т-лимфоцитов, макрофагов, натуральных киллеров и др.) и развитию системной гипервоспалительной реакции. Такое состояние в литературе получило название «цитокиновый шторм» (гиперцитокинемия) [2–4].

Клинические проявления «цитокинового шторма» зависят от тяжести заболевания. Основным симптом – лихорадка, среди других симптомов возможно общее недомогание, усталость, тошнота, анорексия, головная боль, боль в суставах, боль в мышцах, тахикардия, гипотония, отек, неврологические нарушения, в тяжелых случаях диссеминированное внутрисосудистое свёртывание, коагулопатия, окклюзия сосудов, кровотечения, наиболее распространенными являются респираторные симптомы (кашель, одышка) с прогрессированием до острого респираторного дистресс-синдрома и гипоксии. Тяжелое течение заболевания может привести к полиорганной недостаточности и смерти.

Наиболее часто «цитокиновый шторм» является осложнением инфекционных заболеваний, в большинстве случаев вирусных. Другими причинами «цитокинового шторма» могут быть лекарственная терапия, аутоиммунные расстройства, онкологические, гематологические, генетические и др. заболевания [3].

«Цитокиновый шторм» является одним из ведущих механизмов прогрессирования заболевания до полиорганной недостаточности и летального исхода при новой коронавирусной инфекции COVID-19, этиологическим фактором которой является вирус SARS-CoV-2 [5].

Первое сообщение о синдроме цитокинового шторма при сепсисе появилось еще в 1904 г. в книге Уильяма Ослера «The Evolution of Modern Medicine», однако впервые термин «цитокиновый шторм» был использован в 1993 г в статье о реакции «трансплантат против хозяина» при характеристике прямого цитопатического действия цитокинов IL-1 и TNF- α [6].

Под понятием цитокинового шторма понимается группа синдромов, которые характеризуются системным воспалением, нестабильностью гемодинамики и полиорганной недостаточностью. К патогенетическим вариантам цитокинового шторма относят синдром высвобождения цитокинов, первичный и вторичный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (гемофагоцитарный синдром (ГФС)), синдром активации макрофагов [7,8].

Термин «синдром высвобождения цитокинов» обычно используется применительно к реакции организма на терапию различными лекарственными препаратами, при которой происходит чрезмерная активация иммунной системы. Впервые использован в 1989 г для описания клинических проявлений «цитокинового шторма» после инфузии муромонаба-CD3 (ОКТ3) в качестве иммуносупрессивного лечения при трансплантации внутренних органов [9]. В последующем этот термин закрепился в литературе при описании осложнений, связанных с противоопухолевой терапией модифицированными Т-клетками с химерным антигенным рецептором к CD19 (Chimeric Antigen Receptor T-Cell, CAR-T) и моноклональными антителами [10,11].

Первичный ГФС обычно развивается у детей первых лет жизни, в основе лежит врожденный дефект цитотоксической функции NK и К-клеток, наследующийся по аутосомно-рецессивному механизму. Вторичный ГФС ассоциируется с приобретенным дефектом клеточного звена иммунитета и встречается во всех возрастных категориях. Вторичный ГФС развивается на фоне инфекционного, опухолевого или аутоиммунного процесса. В литературе описано развитие вторичного ГФС у пациентов с вирусными, бактериальными и грибковыми инфекциями, но наиболее часто вторичный ГФС развивается на фоне вирусных инфекций: Эпштейна-Барра, цитомегаловируса, простого

герпеса, гриппа, гепатита, иммунодефицита человека, парвовирусной, аденовирусной, коронавирусной и др. инфекций [12–17].

Синдром активации макрофагов описан в литературе как осложнение ревматических заболеваний: при ювенильном идиопатическом артрите, при болезни Стилла, системной красной волчанке, болезни Кавасаки, спондилоартрите, ювенильном дерматомиозите, часто имеющих аутовоспалительный генез [18–19].

В спектре цитокинов, принимающих участие в патогенезе синдрома цитокинового шторма, большое значение придается TNF α , интерлейкину-6 (IL-6), интерлейкину-1 β , интерферону- γ и другим цитокинам [2, 4, 20, 38].

При сепсисе синдром высвобождения цитокинов развивается в ответ на инфекцию, однако было показано, что гиперцитокинемия IL-1 β , IL-6, TNF α , но не наличие бактерий и их токсинов прямо коррелировала со смертностью больных [21]. Антитела против TNF α , введенные перед летальной дозой *E. coli*, защищали лабораторных животных от септического шока, полиорганной недостаточности и смертельного исхода [22].

Высокие уровни IL-6 в сыворотке крови были обнаружены при цитокиновом шторме, индуцированном Т-клеточной терапией CAR [23]. Роль повышения уровней TNF α , IL-6, IL-1 β , ИФН- α , ИФН- γ в развитии иммунопатологии при вирусных инфекциях головного мозга и внутренних органов описал B. Rouse [24].

Уровни TNF α , IL-6, ИФН- γ , были значительно повышены у пациентов с генетически обусловленным первичным гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом, при синдроме активации макрофагов при ревматических заболеваниях [4].

Гипервоспалительные реакции при COVID-19 характеризуются повышением в сыворотке крови концентраций многих цитокинов, наиболее часто в литературе описаны IL-6, TNF α , IL-1 β , IL-8, IL-2, IL-4, IL-10. Установлено, что в большей степени с тяжелой формой заболевания и высокой смертностью связан IL-6 [25–32].

В терапии «цитокинового шторма» широко используются системные глюкокортикостероиды (ГКС) (дексаметазон, метилпреднизалон, гидрокортизон), обладающие иммуномодулирующим действием. Они ингибируют все фазы воспаления, угнетают синтез провоспалительных медиаторов, содержание которых при цитокиновом шторме увеличено и связано с риском развития острого респираторного дистресс-синдрома, сепсиса и неблагоприятных исходов COVID-19. ГКС в настоящее время широко применяют для лечения пациентов с COVID-19 во всем мире, однако эффективность и безопасность ГКС при новой коронавирусной инфекции остается предметом дискуссии, в связи с чем требуются дальнейшие клинические исследования для разрешения спорных вопросов о выборе препарата, его дозировке и способе введения, времени начала терапии и ее

продолжительности, потенциальных рисках применения, среди которых наиболее важными являются отсроченный вирусный клиренс и повышенный риск вторичной инфекции [33].

Моноклональные антитела, специфически связывающие TNF α , IL-6 или рецептор IL-6, представляют собой еще один потенциальный класс терапии при «цитокиновом шторме», в т.ч. при COVID-19.

Фактор некроза опухоли альфа (TNF α , также известный как кахетин) представляет собой природный цитокин млекопитающих, продуцируемый клетками многочисленных типов, включая моноциты и макрофаги, в ответ на эндотоксин или другие стимулы. TNF α является основным медиатором воспалительных, иммунологических и патофизиологических реакций [34].

Растворимый TNF α образуется при расщеплении трансмембранного белка-предшественника [35], секретируемые при этом полипептиды массой 17 кДа подвергаются сборке в растворимые гомотримерные комплексы [36], которые связываются с рецепторами, находящимися на поверхности различных клеток. В результате подобного связывания генерируется ряд провоспалительных эффектов, которые включают: высвобождение других провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин IL-6, IL-8 и IL-1; высвобождение матричных металлопротеиназ и положительную регуляцию экспрессии эндотелиальных адгезивных молекул, которые дополнительно усиливают воспалительный и иммунный каскад привлечением лейкоцитов во внесосудистые ткани.

Выраженность биологических эффектов TNF α зависит от его концентрации. Так, в низких концентрациях он действует преимущественно в месте выработки, опосредуя локальные иммуновоспалительные процессы. Однако в высоких концентрациях он может приводить к гиперактивации цитокинов и развитию иммунопатологической реакции. Неконтролируемая повышенная продукция TNF α может приводить к развитию патологических процессов, например, септического шока при микробных инфекциях или хронических воспалительных заболеваниях: ревматоидном артрите, болезни Крона, анкилозирующем спондилите (болезнь Бехтерева), а также к развитию неоплазий [37]. Участие TNF α в патогенезе широкого круга заболеваний способствовало появлению терапии, направленной на ингибирование данного цитокина.

Одной из групп антагонистов TNF α , разработанных для лечения заболеваний, опосредованных TNF α , являются антитела или фрагменты антител, специфически связывающиеся с TNF α и блокирующие его функцию. При применении анти-TNF α -антител было показано, что блокада TNF α может изменить направленность эффектов TNF α , включая снижение уровня IL-1, GM-CSF, IL-6, IL-8, адгезивных молекул и

разрушение тканей [38]. Моноклональные антитела к TNF α или фрагменты антител к TNF α (инфликсимаб, адалимумаб, этанерцепт, голимумаб, цертолизумаб пэгол) показали клиническую эффективность при лечении состояний хронического воспаления, таких как ревматоидный артрит, псориатический артрит, болезнь Крона и др.

Эффективность терапии, направленной на ингибирование TNF α при системных ревматических заболеваниях, указывает на ее потенциальную эффективность в лечении «цитокинового шторма» различного патогенеза, в том числе и при COVID-19, поскольку иммунопатология «цитокинового шторма» близка к иммунным механизмам развития аутоиммунных ревматических заболеваний [39,40].

В доклинических исследованиях установлено, что TNF α играет важную роль в остром повреждении легких и уменьшает Т-клеточный ответ у мышей, зараженных SARS-CoV. Нейтрализация активности непосредственно TNF α или его рецептора обеспечивает защиту от SARS-CoV и приводит к снижению смертности [41]. Терапия, направленная на ингибирование TNF α , оказалась эффективной в лечении мышей с респираторно-синцитиальным вирусом и вирусом гриппа, была уменьшена продолжительность заболевания, потеря веса, воспаление в легких и содержание в них инфильтрата [42].

По литературным данным TNF α тесно связан с другими провоспалительными цитокинами. Его подавление приводит к быстрому (менее 12 ч) снижению концентраций IL-6 и IL-1 при активном ревматоидном артрите, а также фактора роста эндотелия сосудов, участвующего в регуляции сосудистой проницаемости, и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (G-CSF). Ингибирование TNF α сопровождается уменьшением содержания белков острой фазы: СРБ, гаптоглобина, фибриногена, белка сывороточного амилоида А (SAA1), а также Д-димера и фрагментов протромбина, что потенциально снижает вероятность тромботических осложнений [43].

Мета-анализ показал, что терапия блокаторами TNF α значительно улучшила выживаемость у пациентов с сепсисом [44].

На сегодняшний день в мире зарегистрировано несколько клинических исследований, посвященных изучению новых стратегий лечения COVID-19 с использованием ингибиторов TNF α инфликсимаба или адалимумаба (NCT04705844, NCT04593940, NCT04734678, NCT04425538), однако эффективность и безопасность антагонистов TNF α при лечении COVID-19 еще не была продемонстрирована в решающих многоцентровых клинических испытаниях 3 фазы. Следовательно, существует большая потребность в безопасных и эффективных препаратах, снижающих активность TNF α у пациентов с синдромом цитокинового шторма при лечении COVID-19.

Интерлейкин-6 (IL-6) представляет собой цитокин с плейотропной активностью, секретируемый не только иммунокомпетентными клетками, но и эндотелиальными, мезенхимальными клетками, фибробластами в ответ на активацию Toll-подобных рецепторов и провоспалительные цитокины IL-1 или TNF- α . IL-6 как растворимая сигнальная молекула сообщает информацию о повреждении от очага целому организму. Результатом активации IL-6/IL-6R сигнального пути считаются: запуск синтеза белков острой фазы в печени (С-реактивный белок, сывороточный белок амилоида А, антитрипсин, гепидин и фибриноген), индукция дифференцировки активированных В-клеток в плазматические клетки, наивных CD4⁺ Т-клеток в эффекторные клетки, СВ8⁺ Т-клеток в цитотоксические Т-лимфоциты, индукция созревания мегакариоцитов, активация тромбопластина, индукция секреции VEGF [45].

Рецептор IL-6 (IL-6R), активируясь, запускает каскад реакций в клетке, приводящих к активному синтезу белков, участвующих в реакциях воспалительного ответа. Рецептор активируется при связывании IL-6 с альфа-субъединицей рецептора IL-6 (CD126), и двух молекул gp130, передающих сигнал внутрь клетки [46]. Существуют 2 формы альфа-рецептора: мембранная (mIL-6R) и растворимая (sIL-6R). Растворимая форма образуется в результате протеолиза трансмембранной части mIL-6R или в процессе альтернативного сплайсинга мРНК mIL-6R. sIL-6R постоянно присутствует в сыворотке крови человека и обеспечивает реакцию на IL-6 клеток, не имеющих mIL-6R на поверхности.

Таким образом, проведение сигнала IL-6 внутрь клетки возможно 2 путями. Первый (классический сигналинг), при котором IL-6 связывается с клетками иммунной системы, экспрессирующими на своей поверхности mIL-6R ассоциированный с молекулой gp130. Второй (транс-сигналинг) – IL-6 связывается с циркулирующим sIL-6R, формируя комплекс, который связывается с клетками, имеющими на мембране только молекулы gp130, т.е. потенциально любыми клетками человеческого организма. В этом случае, на мембране клетки происходит сборка полного комплекса рецептора IL-6 и последующий запуск сигнального каскада в клетке. Блокирования действия IL-6 и, следовательно, воспалительной реакции можно добиться, помешав сборке полного комплекса рецептора IL-6, состоящего из альфа-субъединицы, молекул gp130 и IL-6.

Связывание избытка IL-6 и/или блокирование его биологической активности представляются перспективным в лечении «цитокинового шторма».

Известно, что применение тоцилизумаба (моноклонального антитела против рецептора интерлейкина-6 (IL-6R)) и силтуксимаба (моноклонального антитела, направленного на интерлейкин-6 (IL-6)) показало эффективность в лечении «цитокинового шторма»,

индуцированного терапией CAR T-клетками, ГФС, многоочаговой болезнью Кастлемана [3].

Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) одобрило применение препарата тоцилизумаб к человеческому рецептору интерлейкина-6 (IL-6) для лечения вызванного CAR T-клетками тяжелого или жизнеугрожающего синдрома высвобождения цитокинов у пациентов от двух лет и старше [47]. Препарат тоцилизумаб также показал свою эффективность в терапии COVID-19: по результатам исследования RECOVERY (NCT04381936) применение препарата способствует снижению летальности, по результатам исследования EMPACTA (NCT04372186) терапия тоцилизумабом ассоциирована с меньшей частотой подключения пациента к аппарату искусственной вентиляции легких. По результатам данных исследований FDA выдало экстренное разрешение на применение препарата для лечения COVID-19 [48]. Однако в рандомизированном клиническом исследовании 3 фазы (COVACTA, NCT04320615) с участием госпитализированных пациентов с тяжелой пневмонией, вызванной COVID-19, использование тоцилизумаба не привело к значительному улучшению клинического статуса или более низкой смертности по сравнению с плацебо через 28 дней [49]. Рандомизированное двойное слепое многоцентровое исследование фазы III для оценки эффективности и безопасности комбинированной терапии «ремдесивир плюс тоцилизумаб» по сравнению с терапией «ремдесивир плюс плацебо» у госпитализированных пациентов с тяжелой пневмонией COVID-19 (REMDACTA, NCT04409262) не достигло своей первичной конечной точки (сокращения времени до выписки из больницы до 28 дней), и ключевых вторичных конечных точек (смертность, частота подключения к искусственной вентиляции легких, клинический статус) по сравнению с монотерапией ремдесивером [50].

Ингибиторы IL-6 (олокизумаб) или блокаторы рецептора IL-6 (тоцилизумаб, сарилумаб, левилимаб) в соответствии с Временными методическими рекомендациями МЗ РФ по профилактике, диагностике и лечении новой коронавирусной инфекции COVID-19 рекомендуется вводить с целью подавления цитокинового шторма [51]. Эффективность и безопасность олокизумаба и левилимаба при лечении COVID-19 еще не была продемонстрирована в решающих многоцентровых клинических испытаниях 3 фазы.

Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование 3 фазы по оценке эффективности и безопасности сарилумаба у госпитализированных пациентов с тяжелым или критическим COVID-19 (NCT04327388) не показало его эффективность [52].

Таким образом, существует большая потребность в безопасных и эффективных препаратах, снижающих активность IL-6 у пациентов с синдромом цитокинового шторма при лечении COVID-19.

Анализ уровня техники показал, что в настоящее время в терапии «цитокинового шторма» в основном используются глюкокортикостероиды, характеризующиеся высокой токсичностью и риском развития нежелательных реакций [53, 54] и моноклональные антитела, имеющие высокую стоимость и ассоциированные с развитием оппортунистических инфекций [47]. В связи с этим поиск лекарственных препаратов, оказывающих терапевтический эффект в отношении «цитокинового шторма», является актуальным. В условиях пандемии коронавирусной инфекции такие лекарственные препараты являются особенно востребованными. В то же время в уровне техники нет информации о применении в терапии «цитокинового шторма» известного лекарственного средства Кортексин®. Применение препарата Кортексин® в терапии «цитокинового шторма», имеющего лучший профиль безопасности в сравнении с глюкокортикостероидами и моноклональными антителами, позволит уменьшить риск нежелательных побочных явлений.

Кортексин® представляет фармакологическое средство, содержащее в качестве активного начала выделенный целевой продукт в виде комплекса биологически активных полипептидов с молекулярной массой не более 15 000 Да, изоэлектрической точкой 3,5-9,5 и максимумом поглощения в УФ-спектре при длине волны 275 ± 6 нм (RU 2275924). Препарат представляет собой лиофилизированный порошок белого или белого с желтоватым оттенком цвета. Кортексин имеет сложный состав, который практически невозможно охарактеризовать через последовательности аминокислот и их содержание. Так, в аминокислотном составе Кортексина имеется широкий спектр аминокислот, в т.ч. протеиногенных: аспарагиновая кислота и глицин, а также треонин, серин, глутаминовая кислота, пролин, аланин, валин, изолейцин, тирозин, фенилаланин, гистидин, лизин, аргинин и другие аминокислоты.

В настоящее время Кортексин® используется в медицинской практике для нормализации функций головного мозга [55], что может способствовать комплексному воздействию препарата при лечении «цитокинового шторма», направленному не только на снижение системной гипервоспалительной реакции, но и на симптоматическое лечение неврологических нарушений.

Сущность изобретения

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что известный лекарственный препарат Кортексин[®], представляющий собой комплекс низкомолекулярных водорастворимых полипептидных фракций, выделенных из коры головного мозга скота, является эффективным средством в лечении «цитокинового шторма», а именно обладает способностью ингибировать TNF α и IL-6.

В *in vivo* эксперименте на модели септического шока у самцов мышей показано, что эффективность препарата Кортексин[®] в дозах 1,7 и 17 мг/кг превосходит таковую для препарата сравнения левилимаб (рекомбинантное человеческое моноклональное антитело к рецептору ИЛ-6) [56]. В *in vitro* исследовании на модели цитокинового шторма на клеточной линии макрофагов мыши RAW 264.7 показано, что исследуемый препарат Кортексин[®] проявил тенденцию к дозозависимости терапевтического эффекта в отношении уровня TNF α в культуральной среде.

Техническим результатом настоящего изобретения является расширение ассортимента лекарственных средств, применяемых в терапии «цитокинового шторма», а также лучшая эффективность препарата в сравнении с левилимабом, являющимся одним из ближайших аналогов.

Настоящее изобретение относится к применению лекарственного препарата Кортексин[®], активным действующим веществом которого является комплекс низкомолекулярных водорастворимых полипептидных фракций, выделенных из коры головного мозга скота, в терапии «цитокинового шторма» различного патогенеза, в частности в качестве ингибитора TNF α и IL-6.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению комплекса низкомолекулярных водорастворимых полипептидных фракций, выделенных из коры головного мозга скота в терапии «цитокинового шторма», в другом аспекте настоящее изобретение относится к применению лекарственного препарата Кортексин[®] в терапии «цитокинового шторма».

Эффективность препарата Кортексин[®] в терапии «цитокинового шторма» была показана в доклинических исследованиях, программа которых включала два этапа: *in vitro* на модели цитокинового шторма на клеточной линии макрофагов мыши RAW 264.7 (профилактическая схема) и *in vivo* на модели ЛПС-индуцированного септического шока у мышей (лечебная схема).

Материалы и методы

In vitro эксперимент. В качестве тест-системы была использована клеточная линия макрофагов мыши RAW 264.7, полученная из Американской коллекции клеточных культур

(ATCC) [57]. Клетки RAW 264.7 являются моноцитарно-макрофагальной линией, выделенной Рачке и коллегами из опухоли мыши линии BALB/c, индуцированной вирусом лейкемии Абельсона [58]. Данная клеточная линия является стандартным модельным объектом для метаболических исследований [59]. В частности, клетки RAW 264.7, стимулированные ЛПС, широко используются при оценке клеточного ответа на микробные и противовоспалительные агенты [60]. В эксперименте были использованы клетки не старше 30-го пассажа. Клетки рассеивали в стерильные 6-луночные планшеты, обработанные для работы с адгезионными культурами, в концентрации 80.000 клеток/луночка в питательной среде DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л (Биолот, lot. ДМ-20-05-MS) и 10%-й фетальной бычьей сыворотки (Capricorn, lot. C320-3374) (полная питательная среда). Клетки культивировали в течение 24 ± 4 часов в условиях CO₂-инкубатора (5% CO₂, 37°C). На второй день инкубации проводили стимуляцию клеток последовательно растворами объектов исследования и, через 2 часа, ЛПС из *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma Aldrich, lot. 099M4029V) в концентрации 50 нг/мл.

Спустя 24 ± 4 часа инкубации в условиях CO₂-инкубатора, собирали культуральную среду в пробирки, клетки утилизировали. В эксперименте использовали следующие концентрации (мкг/мл) объектов испытания: Кортексин® – 31, 125, 250, 500, 1000; дексаметазон – 31, 125, 250, 400 мкг/мл; левилимаб – 8, 125, 500, 2000; адалимумаб – 35, 141, 563, 2250, 9000.

Для количественного определения уровня TNF α использовали набор Mouse TNF α ELISA Kit (Invitrogen, cat.# BMS607-3TEN). Оптическую плотность измеряли спектрофотометрически при длине волны 450/620 нм.

In vivo эксперимент

В качестве тест-системы использовали самцов мышей линии Balb/C, как широко применяемый вид животных при экспериментальном моделировании сепсиса [61, 62]. Эксперимент выполнен на 140 самцах мышей. Исследование было рассмотрено и одобрено для проведения на биоэтической комиссии на соответствие проекта исследования принципам «Трех R» и Директиве 2010/63/EU. Для моделирования экспериментального сепсиса на мышах в данном исследовании выбрана модель ЛПС-индуцированного септического шока с однократным внутрибрюшинным введением ЛПС в дозе 30 мг/кг экспериментальным животным. Объекты испытания вводили непосредственно после введения ЛПС, далее – через 24 часа. Характеристика экспериментальных групп отражена в таблице 2.

У эвтаназированных через 4 часа после моделирования патологии животных посмертно отбирали кровь из сердца и получали плазму для последующего определения уровня TNF α и IL-6.

Количественное определение медиаторов воспаления (TNF α и IL-6) в культуральной среде и плазме крови мышей проводили с помощью иммуноферментного анализа в варианте неконкурентного метода «сэндвич». Для количественного определения IL-6 использовали набор Mouse IL-6 ELISA Kit (Invitrogen, cat.# BMS603-2TEN), для TNF α использовали набор Mouse TNF α ELISA Kit (Invitrogen, cat.# BMS607-3TEN). Оптическую плотность измеряли спектрофотометрически при длине волны 450/620 нм.

Таблица 2 – Характеристика исследуемых групп

№ гр.	Кол-во самцов	Характеристика исследуемых групп	Объект исследования	Доза, мг/кг	Эвтаназия	
					Через 4 часа после введения ЛПС	Через 72 часа после введения ЛПС
1	20	Интактная	-	-	По 8 животных из каждой группы	Оставшиеся животные
2	20	Формирование патологии без терапии	Носитель	0		
3	20	Формирование патологии + терапия	Дексаметазон	3,6		
4	20		Левилимаб	57		
5	20		Кортексин®	0,17 (1/10 ТД*)		
6	20			1,7 (ТД)		
7	20			17 (10 ТД)		

Примечание - * - ТД – терапевтическая доза для животного, рассчитанная исходя из терапевтической дозы для человека с применением коэффициента пересчета доз [63].

Статистическая обработка данных

Для всех данных была применена описательная статистика. Статистический анализ выполняли с помощью лицензированного программного обеспечения GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Для оценки выживаемости животных применили процедуру Каплана-Мейера с последующей оценкой межгрупповых различий лог-ранговым тестом Мантла-Кокса. Для данных клинического наблюдения рассчитывали медиану и интерквартильный размах. Статистический анализ данных проводили с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса с последующим межгрупповым сравнением методом средних рангов. Различия определяли как статистически значимые при $p < 0,05$. Для статистической оценки медиаторов воспаления использовали программное обеспечение MARS Data Analysis Software 3.42 R3. Зависимость между единицами OD и концентрацией медиаторов воспаления оценивали при помощи калибровочного графика по значениям OD для стандартных образцов в диапазоне концентраций, обеспечивающих линейность и чувствительность методики.

Результаты

Результаты *in vitro* исследования

Результаты оценки уровня TNF α в *in vitro* эксперименте отражены на фигуре 1.

Показано, что внесение индуктора патологии (ЛПС в концентрации 50 нг/мл) привело к увеличению уровня TNF α в культуральной среде через 24 часа после моделирования цитокинового шторма. Внесение препарата сравнения адалимумаб привело к дозозависимому снижению концентрации TNF α в культуральной среде, что также является подтверждением состоятельности модели, поскольку адалимумаб представляет собой рекомбинантное моноклональное антитело, пептидная последовательность которого идентична IgG1 человека, и селективно связывается с фактором некроза опухоли. Дексаметазон стимулировал снижение уровня TNF α на 25% относительно контроля патологии, при этом признаков дозозависимости зафиксировано не было. Препарат сравнения левилимаб не оказал влияния на уровень TNF α в культуральной среде.

Исследуемый препарат Кортексин[®] проявил тенденцию к дозозависимости терапевтического эффекта в отношении уровня TNF α в культуральной среде. Максимальный терапевтический эффект препарата Кортексин[®] был зафиксирован в наименьшей концентрации 31 мкг/кг.

Результаты *in vivo* исследования

Клиническая картина патологии

Первые клинические признаки развития острого воспаления в виде угнетения и взъерошенности шерсти отмечали среди животных всех групп с ЛПС-индуцированным септическим шоком в течение первых 4 часов после введения индуктора патологии. По мере развития патологического процесса клиническое состояние животных усугублялось, что проявлялось в снижении тургора кожи и мышечного тонуса, снижении реакции на внешние раздражители, бледности слизистых оболочек и атаксии. Пик развития септического шока с максимальным количеством летальных исходов наблюдали в группе негативного контроля на 2-й день после индукции патологии. Яркими клиническими проявлениями септического шока у выживших животных были одышка, принятие вынужденного положения тела (лежание на боку), истощение и тремор.

На пике развития септического шока в группе животных, получавших в качестве позитивного контроля дексаметазон в дозе 3,6 мг/кг, выраженность клинических симптомов была значимо ниже по сравнению с группой негативного контроля. На 2-й день после введения ЛПС в группе животных, получавших левилимаб в дозе 57 мг/кг, отмечали терапевтический эффект в виде снижения клинического проявления развития септического шока по сравнению с группой негативного контроля.

Применение тестируемого препарата Кортексин® в максимальной исследуемой дозе 17 мг/кг не оказало терапевтического влияния на развитие септического шока. У животных, выживших после пика развития септического шока, применение тестируемого препарата Кортексин® в дозах 0,17 и 1,7 мг/кг оказало нормализующее действие. Так, начиная со 2-го дня после индукции септического шока, среди животных данных групп отмечалось полное отсутствие клинических симптомов до окончания эксперимента (по 5 самцов мышей в группе). Обнаруженные терапевтические эффекты были сопоставимы с эффектами применения препарата позитивного контроля дексаметазон в дозе 3,6 мг/кг.

Данные по выживаемости животных на 3-е сутки исследования приведены на фигуре 2.

Однократное внутрибрюшинное введение животным ЛПС привело к развитию септического шока, при котором через 48 часов после введения индуктора патологии смертность достигла 100% в группе негативного контроля (патология без лечения). В группе животных, получавших в качестве позитивного контроля дексаметазон в дозе 3,6 мг/кг, гибель отсутствовала на протяжении всего эксперимента. В группе введения препарата левилимаб была зафиксирована гибель животных на уровне 50%. Тестируемый препарат Кортексин® в дозах 0,17 и 1,7 мг/кг проявил фармакологическую активность на модели ЛПС-индуцированного септического шока у самцов мышей, и его применение привело к статистически значимому увеличению выживаемости животных на фоне развития септического шока.

Результаты оценки уровня IL-6 в плазме крови мышей, эвтаназированных через 4 часа после моделирования патологии, отражены на фигуре 3.

Показано, что введение индуктора патологии привело к увеличению уровня IL-6 в плазме крови мышей, перенесших септический шок, по сравнению с интактной группой через 4 часа после моделирования цитокинового шторма. Препарат сравнения дексаметазон стимулировал снижение уровня IL-6 в плазме крови мышей на 86% относительно группы контроля патологии. Введение препарата сравнения Левилимаб привело к снижению уровня IL-6 в плазме крови мышей на 29% относительно контроля патологии. Препарат Кортексин® в дозах 1,7 и 17 мг/кг снизил концентрацию IL-6 в плазме крови мышей по сравнению с препаратом левилимаб на 21% и 40%, соответственно.

Результаты оценки уровня TNF α в плазме крови мышей, эвтаназированных через 4 часа после моделирования патологии, отражены на рисунке 4.

Показано, что введение индуктора патологии (ЛПС в дозе 30 мг/кг) привело к увеличению уровня TNF α в плазме крови мышей, перенесших септический шок, по сравнению с интактной группой через 4 часа после моделирования патологии. Препарат сравнения дексаметазон стимулировал снижение уровня TNF α в плазме крови мышей на

88% относительно группы контроля патологии. Введение препарата сравнения левилимаб привело к снижению уровня TNF α в плазме крови мышей на 33% относительно группы контроля патологии. Препарат Кортексин[®] в дозе 0,17 мг/кг не оказал эффекта в отношении снижения уровня TNF α в плазме крови животных. Препарат Кортексин[®] в дозах 1,7 и 17 мг/кг снизил концентрацию TNF α в плазме крови мышей по сравнению с препаратом левилимаб на 22% и 37%, соответственно. На основании полученных результатов был сделан вывод о том, что эффективность препарата Кортексин[®] в дозах 1,7 и 17 мг/кг превосходит таковую для препарата сравнения левилимаб.

По результатам *in vitro* исследования показано, что исследуемый препарат Кортексин[®] проявил тенденцию к дозозависимости терапевтического эффекта в отношении уровня TNF α в культуральной среде.

В *in vivo* исследовании препарат Кортексин[®] при введении в дозах 0,17 и 1,7 мг/кг проявил терапевтический эффект в отношении ЛПС-индуцированного септического шока. Было отмечено снижение выраженности клинических признаков патологии и смертности животных, а в некоторых случаях регистрировали нормализацию клинического состояния животных вплоть до полного исчезновения клинических проявлений острого воспалительного процесса. Препарат Кортексин[®] (за исключением дозы 0,17 мг/кг) оказал терапевтический эффект в отношении уровня IL-6 и TNF α в плазме крови мышей на модели цитокинового шторма, сопоставимый, либо превосходящий таковой для препарата сравнения левилимаб. Эффективность препарата Кортексин[®] в дозах 1,7 и 17 мг/кг превосходит таковую для препарата сравнения левилимаб.

Таким образом, по результатам исследования, а также учитывая профиль безопасности и низкую стоимость органопрепаратов, был сделан вывод, что препарат Кортексин[®] является перспективным лекарственным кандидатом для дальнейшей разработки в качестве элемента комплексной терапии либо профилактики осложнений заболеваний, патогенетический механизм развития которых включает в себя гиперэкспрессию провоспалительных цитокинов, в том числе осложнений новой коронавирусной инфекции COVID-19. Действие исследуемого препарата в отношении цитокинового шторма, предположительно, развивается за счет ингибирования внутриклеточных каскадов основных провоспалительных цитокинов – TNF α и IL-6. При этом, поскольку уровень цитокинов понижался не полностью, как это было на фоне применения дексаметазона – ингибитора нуклеарных факторов воспаления, вероятно, что точками приложения действия препаратов являются внутриклеточные сигнальные белки.

Список литературы

1. Кетлинский С. А., Симбирцев А. С. Цитокины. СПб: Фолиант, 2008 г. 552 с.
2. Шипилов М. В. Молекулярные механизмы "цитокинового шторма" при острых инфекционных заболеваниях. *Лечебное дело*. 2013; 1:81–85.
3. Fajgenbaum D. C., June C. H. Cytokine Storm. *The New England Journal of Medicine*. 2020; 383:2255–2273. DOI: 10.1056/NEJMra2026131
4. Потапнев М. П. Цитокиновый шторм: причины и последствия. *Иммунология*. 2021; 42 (2):175 –178.
5. Jose R. J., Manuel A. COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2020. doi:10.1016/s2213-2600(20)30216-2
6. Ferrara J. L., Abhyankar S., Gilliland D. G. Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1. *Transplantation proceedings*. 1993; 25(1): 1216–1217.
7. Canna S. W., Behrens E. M. Making Sense of the Cytokine Storm: A Conceptual Framework for Understanding, Diagnosing, and Treating Hemophagocytic Syndromes. *Pediatric Clinics of North America*. 2012; 59(2), 329–344. doi:10.1016/j.pcl.2012.03.002
8. Buszko M., Nita-Lazar A., Park J.-H., Schwartzberg P. L. et al. Lessons learned: new insights on the role of cytokines in COVID-19. *Nature Immunology*. 2021; 22(4): 404–411. doi:10.1038/s41590-021-00901-9
9. Chatenoud L., Ferran C., Reuter A., Legendre C. et al. Systemic Reaction to the Anti-T-Cell Monoclonal Antibody OKT3 in Relation to Serum Levels of Tumor Necrosis Factor and Interferon- α . *New England Journal of Medicine*. 1989; 320(21): 1420–1421. doi:10.1056/nejm198905253202117
10. Lee D. W., Gardner R., Porter D. L. et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood*. 2014; 124(2), 188–195. doi:10.1182/blood-2014-05-552729
11. Shimabukuro-Vornhagen A., Gödel P., Subklewe M. et al. Cytokine release syndrome. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2018; 6(1). doi:10.1186/s40425-018-0343-9
12. Janka G. E., Lehmborg K. Hemophagocytic syndromes – an update. *Blood Rev*. 2014; 28(4):135–142. doi: 10.1016/j.blre.2014.03.002
13. Risdall R. J., McKenna R. W., Nesbit M. E. et al. Virus-associated hemophagocytic syndrome: a benign histiocytic proliferation distinct from malignant histiocytosis. *Cancer*. 1979; 44(3): 993–1002. DOI: 10.1002/1097-0142(197909)44:3<993::aid-cncr2820440329>3.0.co;2-5

14. Tiab M., Mechinaud F., Harousseau J.-L. Haemophagocytic syndrome associated with infections. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2000; 13(2):163–178. doi:10.1053/beha.2000.0066
15. Roupheal N. G., Talati N. J., Vaughan C. et al. Infections associated with haemophagocytic syndrome. *The Lancet Infectious Diseases*. 2007; 7(12), 814–822. doi:10.1016/s1473-3099(07)70290-6
16. Chen J., Wang X., He P., Li Y. et al. Viral etiology, clinical and laboratory features of adult hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Journal of Medical Virology*. 2015; 88(3): 541–549. doi:10.1002/jmv.24359
17. Imashuku S. Clinical features and treatment strategies of Epstein–Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2002; 44(3), 259–272. doi:10.1016/s1040-8428(02)00117-8
18. Hadchouel M., Prieur A.-M., Griscelli C. Acute hemorrhagic, hepatic, and neurologic manifestations in juvenile rheumatoid arthritis: Possible relationship to drugs or infection. *The Journal of Pediatrics*. 1985; 106(4): 561–566. doi:10.1016/s0022-3476(85)80072-x
19. Behrens E. M., Koretzky G. A. Review: Cytokine Storm Syndrome: Looking Toward the Precision Medicine Era. *Arthritis & Rheumatology*. 2017; 69(6): 1135–1143. doi:10.1002/art.40071
20. Kruttgen A., Rose-John S. Interleukin-6 in sepsis and capillary leakage syndrom. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 2012; 32(2):60– 65. DOI10.1089/jir.2011.0062
21. Casey L. C., Balk R. A., Bone R. C. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Annals of Internal Medicine*. 1993; 119 (8): 771–778. DOI: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-119-8-199310150-00001>
22. Tracey K. J., Fong Y., Heese D. G. et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. 1987; 330 (6149): 662–664. doi: <https://doi.org/10.1038/330662a0>
23. Grupp S. A., Kalos M., Barrett D. et al. Chimeric Antigen Receptor – Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2013; 368(16): 1509–1518. doi:10.1056/nejmoa1215134
24. Rouse B. T. Virus-Induced Immunopathology. *Advances in Virus Research*. 1996; 47:353–376. doi:10.1016/s0065-3527(08)60739-3
25. Coomes E. A., Haghighyan H. Interleukin-6 in Covid-19: A systematic review and meta-analysis. *Reviews in Medical Virology*. 2020; 30(6): 1–9. doi:10.1002/rmv.2141

26. Li Y., Hu Y., Yu J., Ma T. Retrospective analysis of laboratory testing in 54 patients with severer critical type 2019 novel coronavirus pneumonia. *Laboratory Investigation*. 2020; 100: 794–800. doi: 10.1038/s41374-020-0431-6
27. Zhu Z., Cai T., Fan L. Lou K. et al. Clinical value of immune-inflammatory parameters to assess the severity of coronavirus disease 2019. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020. 95:332–339. doi:10.1016/j.ijid.2020.04.041
28. Wan S., Yi Q., Fan S., et al. Relationships among lymphocyte subsets, cytokines, and the pulmonary inflammation index in coronavirus (COVID-19) infected patients. *British Journal of Haematology*. 2020; 189(3):428-37. doi: 10.1111/bjh.16659
29. Herold T., Jurinovic V., Arnreixh C. et al. Level pf IL-6 predics respiratory failure in hospiralized symptomatic COVID-19 patients. *medRxiv*. doi: 10.1101/2020.04.01.20047381
30. Aziz M., Fatima R., Assaly R. Elevated interleukin-6 and severe COVID-19: A meta-analysis. *Journal of Medical Virology*. 2020. doi: 10.1002/jmv.25948
31. Wu C., Chen X., Cai Y. et al. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med*. 2020. doi: 10.1001/jamainternmed.2020.0994
32. Gao Y., Li T., Han M. et al. Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19. *Journal of Medical Virology*. 2020; 92:791–796. <https://doi.org/10.1002/jmv.25770>
33. Макарова Е. В., Тюрикова Л. В., Любавина Н. А. Применение системных кортикостероидов при новой коронавирусной инфекции (с позиций международных и российских рекомендаций). *Медицинский альманах*. 2021; 1(66): 74–82.
34. Grell M., Douni E., Wajant H. et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1995; 83(5): 793–802. doi:10.1016/0092-8674(95)90192-2.
35. Kriegler M., Perez C., DeFay K., Albert I., Lu S. D. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*. 1988; 53(1): 45–53. doi:10.1016/0092-8674(88)90486-2
36. Smith R. A., Baglioni C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *Journal of biological chemistry*. 1987; 262 (15): 6951-6954.
37. Ярилин Д. А. Роль фактора некроза опухолей в регуляции воспалительного ответа моноцитов и макрофагов. *Иммунология*. 2014; 4: 195-201.
38. Feldmann M., Elliot M. J., Woody J. N. et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy of rheumatoid arthritis. *Advances in Immunology*. 1997; 64:283–350.

39. Feldmann M., Maini R. N., Woody J. N. et al. Trials of anti-tumour necrosis factor therapy for COVID-19 are urgently needed. *The Lancet*. 2020; 395:1407–1409. doi:10.1016/s0140-6736(20)30858-8
40. Robinson P. C., Liew D. F. L., Liew J. W. et al. The Potential for Repurposing Anti-TNF as a Therapy for the Treatment of COVID-19. *Med*. 2020; 1: 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2020.11.005>
41. McDermott J. E. et al. The effect of inhibition of PP1 and TNF α signaling on pathogenesis of SARS coronavirus. *BMC systems biology*. 2016; 10 (1): 93–105. doi: 10.1186/s12918-016- 0336-6.
42. Hussell T., Pennycook A., Openshaw P. J. M. Inhibition of tumor necrosis factor reduces the severity of virus-specific lung immunopathology. *European Journal of Immunology*. 2001; 31(9):2566–2573. doi:10.1002/1521-4141(200109)31:9<2566::aid-immu2566>3.0.co;2-1
43. Аронова Е. С, Белов Б. С. Перспективы применения ингибиторов фактора некроза опухоли α у больных COVID-19. *Современная ревматология*. 2021; 15(2):89–93. DOI: 10.14412/1996-7012-2021-2-89-93
44. Qiu P. et al. Anti-tumor necrosis factor therapy is associated with improved survival in clinical sepsis trials: a meta-analysis. *Critical care medicine*. 2013; 41(10). doi: 10.1097/CCM.0b013e3182982add
45. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. *Immunotherapy*. 2016; 8(8): 959 – 970. DOI: 10.2217/imt-2016-0020
46. Jones S. A., Horiuchi S., Topley N. et al. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *The FASEB Journal*. 2001; 15(1): 43-58 doi:10.1096/fj.99-1003rev
47. FDA approves tisagenlecleucel for B-cell ALL and tocilizumab for cytokine release syndrome. URL: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-tisagenlecleucel-b-cell-all-and-tocilizumab-cytokine-release-syndrome>. Дата обращения 26.09.21.
48. Frequently Asked Questions on the Emergency Use Authorization for Actemra (Tocilizumab) for Treatment of COVID-19. [<https://www.fda.gov/media/150345/download>]. Дата обращения 26.09.21.
49. Rosas I. O., Bräu N., Waters M., Go R. C. Tocilizumab in Patients with Covid-19 Pneumonia. *The New England Journal of Medicine*. 2021; 384:1503–1516. DOI: 10.1056/NEJMoa2028700.
50. Roche provides update on the phase III REMDACTA trial of Actemra/RoActemra plus Veklury in patients with severe COVID-19 pneumonia.

[<https://www.roche.com/media/releases/med-cor-2021-03-11.htm>]. Дата обращения 28.09.21.

51. Временные методические рекомендации МЗ РФ по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 11. 07.05.21.
52. Lescure F.-X., Honda H., Fowler R. A. et al. Sarilumab in patients admitted to hospital with severe or critical COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2021; 9(5), 522–532. doi:10.1016/s2213-2600(21)00099-0
53. Борисова Е. О. Побочные эффекты системной глюкокортикостероидной терапии. *Атмосфера. Пульмонология и аллергология*. 2004; 3.
54. Комердус И. В., Будул Н. А., Чеканова А. В. Системное действие глюкокортикоидных препаратов: в помощь врачу общей практики (обзор литературы). *Российский медицинский журнал*. 2017; 25(1):45-48.
55. Инструкция по применению лекарственного препарата «Кортексин®». [<https://grls.rosminzdrav.ru/>]. Дата обращения 25.09.21.
56. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата «Илсира®». [<https://grls.rosminzdrav.ru/>]. Дата обращения 25.09.21.
57. RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™). [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/TIB-71.aspx?geo_country=ru#generalinformation]. Дата обращения 25.09.21.
58. Raschke W. C, Baird S., Ralph P., Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*. 1978; 15(1):261–267. DOI: 10.1016/0092-8674(78)90101-0
59. Merly L., Smith S.L. Murine RAW 264.7 cell line as an immune target: are we missing something? *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2017; 39(2):55–58. DOI: 10.1080/08923973.2017.1282511
60. Shigemori S., Namai F., Yamamoto Y., Nigar S., Sato T., Ogita T., Shimosato T. Genetically modified *Lactococcus lactis* producing a green fluorescent protein-bovine lactoferrin fusion protein suppresses proinflammatory cytokine expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Journal of Dairy Science*. 2017; 100(9):7007–7015. DOI: 10.3168/jds.2017-12872
61. Sardari M., Skuljec J., Yin D. et al. Lipopolysaccharide-induced sepsis-like state compromises post-ischemic neurological recovery, brain tissue survival and remodeling via mechanisms involving microvascular thrombosis and brain T cell infiltration. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2021; 91:627–638. DOI: 10.1016/j.bbi.2020.10.015

62. Alsharif K. F., Almalki A. A., Al-Amer O. et al. Oleuropein protects against lipopolysaccharide-induced sepsis and alleviates inflammatory responses in mice. *IUBMB Life*. 2020; 72(10):2121–2132. DOI: 10.1002/iub.2347.
63. Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Guidance for Industry. Rockville: *Food and Drug Administration*; 2005.

ПЕРЕЧЕНЬ ФИГУР, ЧЕРТЕЖЕЙ И ИНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1. Уровень $\text{TNF}\alpha$ в культуральной среде после моделирования цитокинового шторма.

Фигура 2. Соотношение погибших и выживших животных.

Фигура 3. Уровень IL-6 в плазме крови мышей через 4 часа после моделирования патологии.

* – отличие от группы контроля патологии, $p \leq 0,05$ (t-тест)

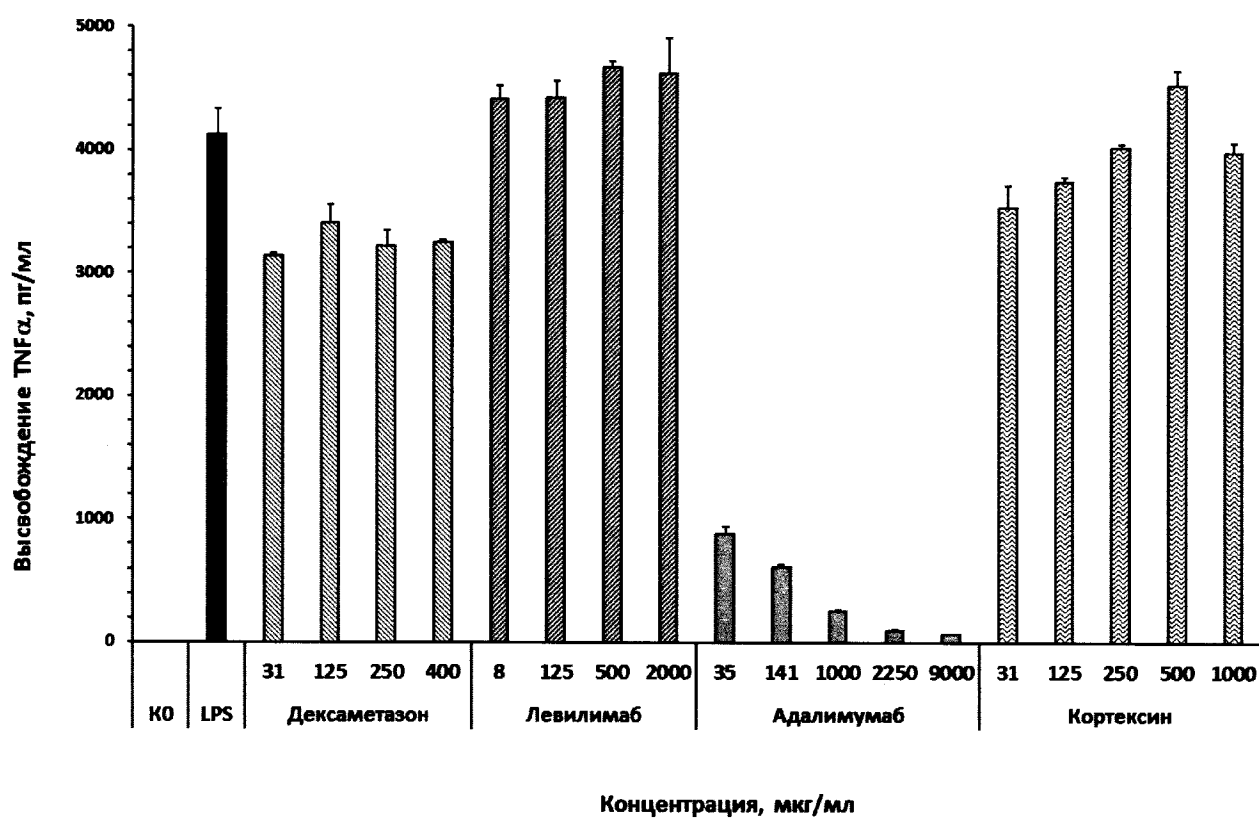
Фигура 4. Уровень $\text{TNF}\alpha$ в плазме крови мышей через 4 часа после моделирования патологии. * – отличие от группы контроля патологии, $p \leq 0,05$ (t-тест)

ПРИМЕНЕНИЕ КОРТЕКСИНА ПРИ ЦИТОКИНОВОМ ШТОРМЕ

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

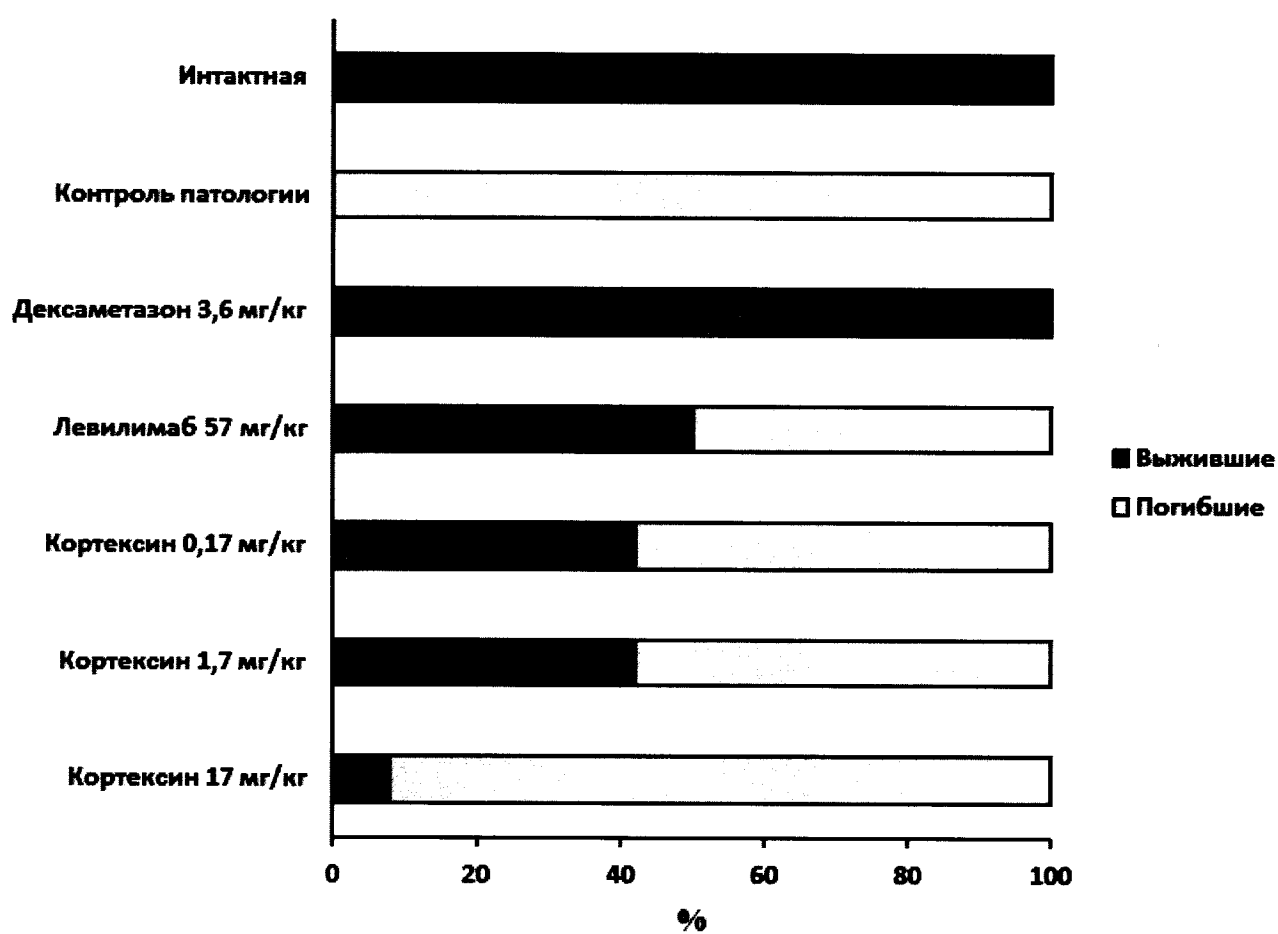
1. Применение комплекса низкомолекулярных водорастворимых полипептидных фракций, выделенных из коры головного мозга скота, в терапии «цитокинового шторма».
2. Применение по п.1 отличающееся тем, что терапия «цитокинового шторма» направлена на ингибирование $\text{TNF}\alpha$ и IL-6.
3. Применение по п.п. 1 и 2, отличающееся тем, что комплекс низкомолекулярных водорастворимых полипептидных фракций, выделенных из коры головного мозга скота, представляет собой лекарственное средство Кортесин®.
4. Применение по любому из п.п 1–3 отличающееся тем, что «цитокиновый шторм» является осложнением лекарственной терапии, инфекционных, аутоиммунных, онкологических, гематологических, генетических заболеваний.
5. Применение по любому из п.п. 1–4, отличающееся тем, что «цитокиновый шторм» является осложнением COVID-19.

ПРИМЕНЕНИЕ КОРТЕКСИНА ПРИ ЦИТОКИНОВОМ ШТОРМЕ



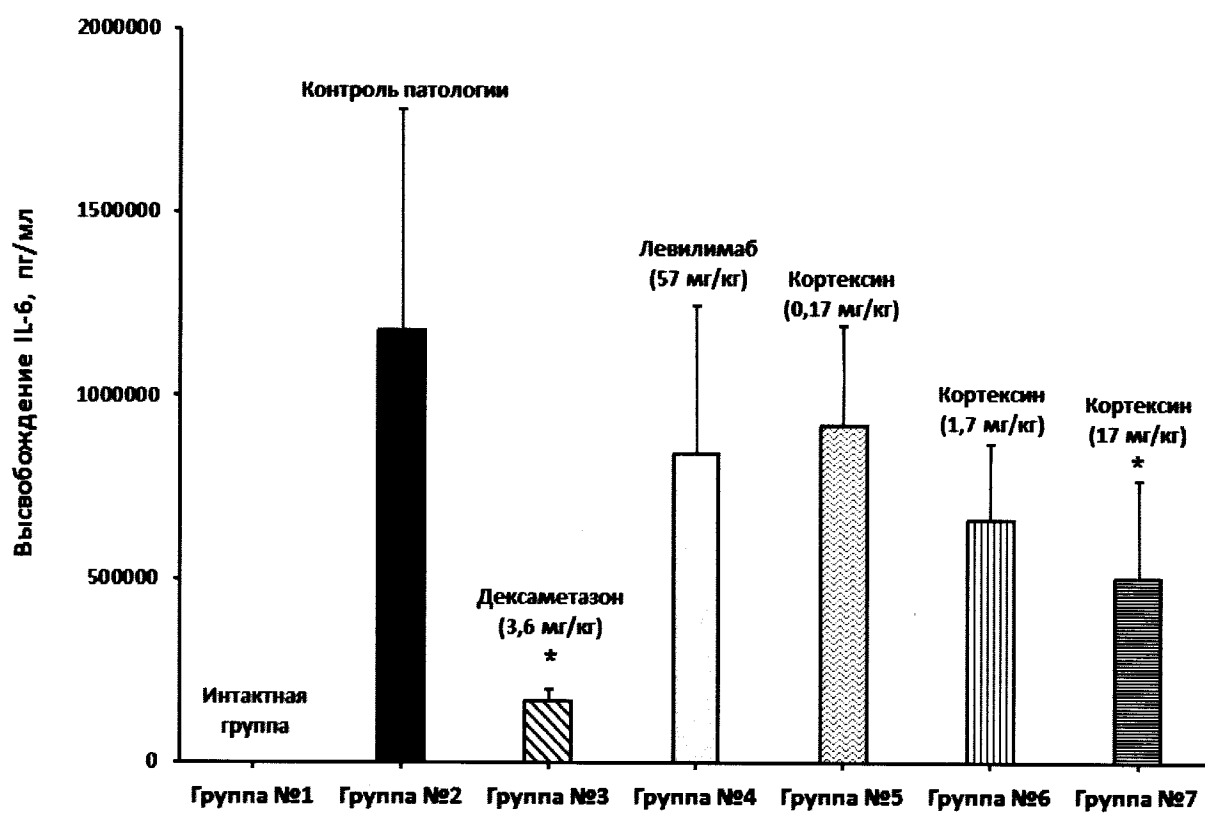
Фиг.1

ПРИМЕНЕНИЕ КОРТЕКСИНА ПРИ ЦИТОКИНОВОМ ШТОРМЕ



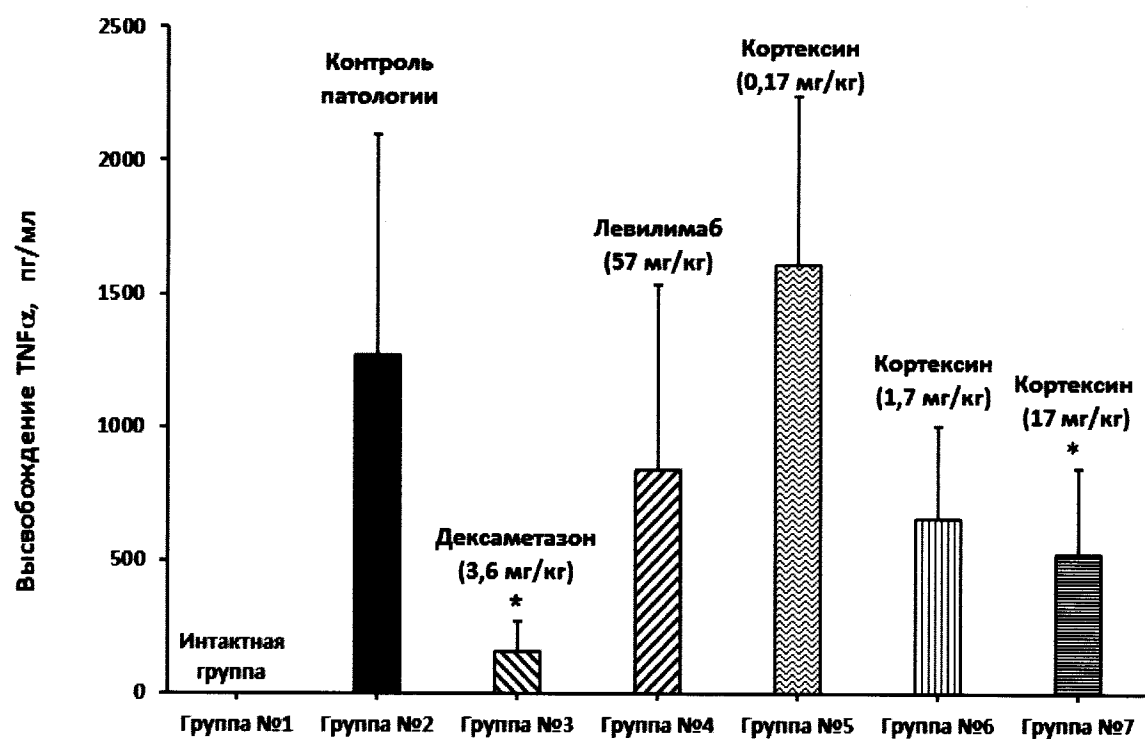
Фиг. 2

ПРИМЕНЕНИЕ КОРТЕКСИНА ПРИ ЦИТОКИНОВОМ ШТОРМЕ



Фиг.3

ПРИМЕНЕНИЕ КОРТЕКСИНА ПРИ ЦИТОКИНОВОМ ШТОРМЕ



Фиг. 4

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202192680

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
A61K 35/30, 38/19, 38/20, A61P 31/14, 43/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, ЕАПАТИС, EPOQUE Net, Reaxys, Google

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	КУЗНИК Б. И. и др. COVID-19: Влияние на иммунитет, систему гемостаза и возможные пути коррекции. Успехи физиологических наук, 2020, Т.51, N4, стр.51-63, страницы 55-56, рисунок 1	1-5
Y	МАДЖИДОВА Е. Н. и др. Клинико-иммунологические аспекты нейропротекции хронической ишемии мозга. Доктор.ру., Фармакотерапия, 2012, N5 (73), стр.93-95, таблица 2	1-5
A	МЕНДЖЕРИЦКИЙ А. М. и др. Регуляция содержания цитокинов в сыворотке крови и активности каспазы-3 в мозгу старых крыс кортексином и пинеалоном в модели острой гипоксической гипоксии. Успехи геронтологии, 2014, т.27, N 1, стр. 94-97	1-5
A	НИКОГОСЯН Н. Р. и др. Особенности лечения цитокинового шторма при Covid-19. Сборник материалов V международного молодежного научно-практического форума. "Медицина будущего: от разработки до внедрения. Оренбург, 22.04.2021, страница 149	1-5

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

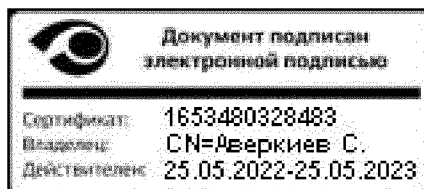
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 04 июля 2022 (04.07.2022)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202192680

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

A61K 35/30 (2015.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 43/00 (2010.01)